

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 937**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2018** **PCT/US2018/063390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019** **WO19108983**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2018** **E 18821882 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023** **EP 3585164**

54 Título: **Ratas que comprenden un locus TRKB humanizado**

30 Prioridad:

**30.11.2017 US 201762592905 P**

**23.04.2018 US 201862661373 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.06.2024**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road**

**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**MUJICA, ALEXANDER O.;**

**TANG, YAJUN;**

**LEE, JEFFREY D.;**

**GAO, MIN;**

**CROLL, SUSAN;**

**MACDONALD, LYNN;**

**HU, YING y**

**ROMANO, CARMELO**

74 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 2 973 937 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

Ratas que comprenden un locus *TRKB* humanizado

### 5 Antecedentes

- La quinasa B receptora de tropomiosina (*TRKB*) es una diana prometedora para la neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas tales como el glaucoma. *TRKB* es uno de los receptores neurotróficos (NTR) más ampliamente distribuidos en el cerebro, que está altamente enriquecido en la neocorteza, el hipocampo, el cuerpo estriado y el tronco del encéfalo. La unión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) al receptor *TRKB* desencadena su dimerización a través de cambios conformacionales y autofosforilación de restos de tirosina en el dominio intracelular, dando como resultado la activación de vías de señalización que implican la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C-γ (PLC-γ).
- TRKB* es importante para la supervivencia, la diferenciación y la función neuronales, y los agonistas de *TRKB* podrían tener potencial terapéutico en numerosos trastornos neurológicos, mentales y metabólicos. 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 *TRKB* humana, permitiendo de este modo someter a ensayo la eficacia y el modo de acción de dichos agentes en cinco animales, así como estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos.

### Sumario

- A lo largo de la presente memoria descriptiva, el animal no humano es una rata. Se proporcionan animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado, así como métodos de uso de dichos animales no humanos. También se proporcionan genomas o células de animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado.

- En un aspecto, se proporcionan células animales no humanas o animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado. Dichas células animales no humanas o animales no humanos comprenden un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína *TRKB*, en donde la proteína *TRKB* comprende un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, y todo o parte del dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga.

- En un aspecto, se proporcionan animales no humanos que comprenden un locus *TrkB* humanizado de acuerdo con la reivindicación 1. Dichos animales no humanos comprenden un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína *TRKB*, en donde la proteína *TRKB* comprende un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, y todo o parte del dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga.

- En otro aspecto, se proporcionan células animales no humanas que comprenden en su genoma un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína *TRKB*, en donde la proteína *TRKB* comprende un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, y todo o parte del dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga de acuerdo con la reivindicación 20.

- Se divulgan genomas de animales no humanos que comprenden un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína *TRKB*, en donde la proteína *TRKB* comprende un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, y todo o parte del dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga

- En dichos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, la proteína *TRKB* comprende un dominio extracelular de *TRKB* humana. Opcionalmente, el dominio extracelular comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 60. Opcionalmente, todo el dominio extracelular está codificado por el segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TRKB* humana ortóloga, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el dominio extracelular comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 72.

- En algunos de estos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, la proteína *TRKB* comprende un péptido señal endógeno. Opcionalmente, el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 55. Opcionalmente, todo el péptido señal está codificado por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 67.

- En dichos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, la proteína *TRKB* comprende un dominio transmembrana de *TRKB* endógeno. Opcionalmente, el dominio transmembrana

comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 57. Opcionalmente, todo el dominio transmembrana está codificado por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 69.

En dichos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, la proteína TRKB comprende un dominio citoplasmático de TRKB endógeno. Opcionalmente, el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 58. Opcionalmente, todo el dominio citoplasmático está codificado por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 70.

En dichos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, la proteína TRKB comprende un péptido señal de TRKB endógeno, un dominio transmembrana de TRKB endógeno y un dominio citoplasmático de TRKB endógeno. Opcionalmente, el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 55, el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 57 y el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 58. Opcionalmente, todo el péptido señal, todo el dominio transmembrana y todo el dominio citoplasmático están codificados por una secuencia de *TrkB* endógena. Opcionalmente, la secuencia codificante para el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 67, la secuencia codificante para el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 69 y la secuencia codificante para el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 70.

Opcionalmente, el dominio extracelular es un dominio extracelular humano de TRKB, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de la proteína TRKB endógeno y el dominio citoplasmático es un dominio citoplasmático de la proteína TRKB endógeno. Opcionalmente, la proteína TRKB comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5. Opcionalmente, la secuencia codificante del locus *TrkB* modificado genéticamente que codifica la proteína TRKB comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13.

Algunos de estos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, son heterocigotos para el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente. Algunos de estos genomas de animales no humanos, células de animales no humanos o animales no humanos, son homocigotas para el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente.

El animal no humano es una rata.

Opcionalmente, la proteína TRKB comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5. Opcionalmente, la secuencia codificante del locus *TrkB* modificado genéticamente que codifica la proteína TRKB comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a TRKB humana *in vivo* utilizando los animales no humanos anteriores. Algunos de estos métodos comprenden: (a) administrar el reactivo dirigido a TRKB humana al animal no humano; y (b) evaluar la actividad del reactivo dirigido a TRKB humana en el animal no humano.

En algunos de estos métodos, la actividad evaluada es la actividad neuroprotectora.

En algunos de estos métodos, la etapa (a) comprende inyectar el reactivo dirigido a TRKB humana al animal no humano.

En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar cambios en uno o más, o todos, de entre el peso corporal, la composición corporal, el metabolismo y la locomoción con respecto a un animal no humano de control. Opcionalmente, la evaluación de cambios en la composición corporal comprende evaluar la masa magra y/o la masa grasa con respecto a un animal no humano de control. Opcionalmente, la evaluación de cambios en el metabolismo comprende evaluar cambios en el consumo de alimentos y/o el consumo de agua.

En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar la fosforilación de TRKB y/o la activación de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt con respecto a un animal no humano de control.

En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar la actividad neuroprotectora. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar la actividad neuroprotectora. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar la viabilidad de las células ganglionares de la retina. Opcionalmente, evaluar la viabilidad de las células ganglionares de la retina comprende evaluar la densidad de las células ganglionares de la retina. Opcionalmente, la densidad de las células ganglionares de la retina se mide en retinas diseccionadas teñidas para determinar las células ganglionares de la retina. Opcionalmente, la viabilidad de las células ganglionares de la retina se evalúa en un modelo de transección completa del nervio óptico después de una lesión del nervio óptico. Opcionalmente, la viabilidad de las células ganglionares de la retina se evalúa en un modelo de aplastamiento del nervio óptico.

En algunos de estos métodos, el reactivo dirigido a TRKB humana es una proteína de unión a antígeno. Opcionalmente, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo agonista de TRKB humana. En algunos de estos métodos, el reactivo dirigido a TRKB humana es una molécula pequeña. Opcionalmente, la molécula pequeña es un agonista de TRKB humana.

Se divulgan vectores de direccionamiento para generar un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína TRKB, en donde la proteína TRKB comprende un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, y todo o parte del dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga, y en donde el vector de direccionamiento comprende un ácido nucleico de inserto que comprende la secuencia de *TRKB* humana ortóloga flanqueada por un brazo de homología 5' dirigido a una secuencia diana 5' en el locus *TrkB* endógeno y un brazo de homología 3' dirigido a una secuencia diana 3' en el locus *TrkB* endógeno.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para producir cualquiera de los animales no humanos descritos anteriormente de acuerdo con la reivindicación 19. Algunos de dichos métodos pueden comprender (a) introducir en una célula pluripotente de animal no humano distinta de un embrión en fase unicelular: (i) un molde de reparación exógeno que comprende un ácido nucleico de inserto flanqueado por un brazo de homología 5' que se hibrida con una secuencia diana 5' en el locus *TrkB* endógeno y un brazo de homología 3' que se hibrida con una secuencia diana 3' en el locus *TrkB* endógeno, en donde el ácido nucleico de inserto comprende la secuencia de *TRKB* humana ortóloga; y (ii) un agente de nucleasa dirigido a una secuencia diana dentro del locus *TrkB* endógeno, en donde el genoma se modifica para comprender el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente; (b) introducir la célula pluripotente animal no humana modificada en un embrión hospedador; y (c) implantar el embrión hospedador en una madre subrogada para producir un animal no humano de generación F0 modificado genéticamente que comprende el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente. Opcionalmente, la célula pluripotente es una célula madre embrionaria (ES). Opcionalmente, el agente nucleasa es una proteína Cas9 y un ARN guía que se dirige a una secuencia diana de ARN guía dentro del locus *TrkB* endógeno. Opcionalmente, la etapa (a) comprende además introducir en la célula pluripotente animal no humana un segundo ARN guía que se dirige a una segunda secuencia diana de ARN guía dentro del locus *TrkB* endógeno. Opcionalmente, el molde de reparación exógeno es un vector de direccionamiento grande que tiene al menos 10 kb de longitud, o en donde el molde de reparación exógeno es un vector de direccionamiento grande en el que la suma total del brazo de homología 5' y el brazo de homología 3' tiene al menos 10 kb de longitud.

Algunos de estos métodos comprenden: (a) introducir en un embrión en fase unicelular de un animal no humano: (i) un molde de reparación exógeno que comprende un ácido nucleico de inserto flanqueado por un brazo de homología 5' que se hibrida con una secuencia diana 5' en el locus *TrkB* endógeno y un brazo de homología 3' que se hibrida con una secuencia diana 3' en el locus *TrkB* endógeno, en donde el ácido nucleico de inserto comprende la secuencia de *TRKB* humana ortóloga; y (ii) un agente de nucleasa dirigido a una secuencia diana dentro del locus *TrkB* endógeno, en donde el genoma se modifica para comprender el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente; y (b) implantar el embrión en fase unicelular de animal no humano modificado en una madre subrogada para producir un animal no humano de generación F0 modificado genéticamente que comprende el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente. Opcionalmente, el agente nucleasa es una proteína Cas9 y un ARN guía que se dirige a una secuencia diana de ARN guía dentro del locus *TrkB* endógeno. Opcionalmente, la etapa (a) comprende además introducir en el embrión en fase unicelular no humano un segundo ARN guía que se dirige a una segunda secuencia diana de ARN guía dentro del locus *TrkB* endógeno.

#### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** (no a escala) muestra un esquema del esquema de direccionamiento para la humanización de la región del locus *TrkB* de ratón (*Ntrk2* de ratón) que codifica el dominio extracelular de TRKB. La porción superior de la figura muestra el locus *TrkB* de ratón endógeno (*Ntrk2* de ratón) y la porción inferior de la figura muestra el vector de direccionamiento grande.

La **Figura 2** (no a escala) muestra un esquema de los ensayos TAQMAN® para el cribado de la humanización del locus *TrkB* de ratón (*Ntrk2* de ratón). Los ensayos de ganancia de alelo (GOA) incluyen 7138hU y 7138hD. Los ensayos de pérdida de alelo (LOA) incluyen 7138U y 7138D.

La **Figura 3** muestra transferencias Western que evalúan los niveles de TRKB total y los niveles de fosfo-TRKB en ratones TRKB humanizados homocigotos 1 hora, 4 horas y 18 horas después de la inyección directa en el hipocampo del anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 o del anticuerpo de control de isotipo.

La **Figura 4** (no a escala) muestra un esquema del esquema de direccionamiento para la humanización de la región del locus *TrkB* de rata (*Ntrk2* de rata) que codifica el dominio extracelular de TRKB. La porción superior de la figura muestra el locus *TrkB* de rata endógeno (*Ntrk2* de rata) y la porción inferior de la figura muestra el vector de direccionamiento grande.

La **Figura 5** (no a escala) muestra un esquema de los ensayos TAQMAN® para el cribado de la humanización del locus *TrkB* de rata (*Ntrk2* de rata) y las posiciones del ARN guía (secuencias diana guía expuestas en las SEQ ID NO: 41-44) para el direccionamiento del locus *TrkB* de rata (*Ntrk2* de rata). Los ensayos de ganancia de alelo (GOA) incluyen 7138hU y 7138hD. Los ensayos de pérdida de alelo (LOA) incluyen rnoTU, rnoTM y rnoTD. Los ensayos CRISPR diseñados para cubrir la región alterada por el direccionamiento de CRISPR/Cas9 incluyen

rnoTGU y rnoTGD. Los ensayos de retención incluyen rnoTAU2 y rnoTAD2.

La **Figura 6** muestra una alineación de las proteínas TRKB (NTRK2) de ratón, de rata y humana.

La **Figura 7** muestra transferencias Western de fosfo-TrkB, TrkB total, fosfo-Akt, AKT total, fosfo-ERK y ERK total a los 15 minutos y 2 horas después del tratamiento de neuronas corticales primarias aisladas de crías de ratón de TRKB humanizada homocigota el día 1 después del nacimiento con diversos anticuerpos agonistas de TrkB o BDNF.

La **Figura 8** muestra perfiles farmacocinéticos del anticuerpo anti-TrkB en H4H9816P2 en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> homocigotos y de tipo silvestre.

La **Figura 9** muestra la supervivencia celular en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano diferenciadas tratadas con diferentes dosis de anticuerpos agonistas de TrkB o BDNF. El mAb1 contra TrkB es H4H9816P2; El mAb2 contra TrkB es un anticuerpo agonista de TrkB de control con afinidad por TrkB humano, TrkB de rata y TrkB de ratón. Se utilizó un anticuerpo de control de isotipo humano como control negativo. Los datos se normalizaron para los medios sin suero y sin anticuerpos.

La **Figura 10** muestra la supervivencia celular en células ganglionares primarias de la retina de ratón tratadas con diferentes dosis de anticuerpo agonista de TrkB o BDNF. El mAb2 contra TrkB es un anticuerpo agonista de TrkB de control con afinidad por TrkB humano, TrkB de rata y TrkB de ratón. Los datos se normalizaron para los medios sin suero y sin anticuerpos.

Las **Figuras 11A y 11B** muestran la densidad de células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratas y ratones de tipo silvestre, respectivamente, después de la transección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF, anticuerpo agonista de TrkB, anticuerpo de control de isotipo o control de vehículo. A las ratas se les administró BDNF (5 µg), anticuerpo agonista de TrkB (18 µg), anticuerpo de control de isotipo (18 µg) o control del vehículo por vía intravítrea 3 días y 10 días después de la transección del nervio óptico. A los ratones se les administró BDNF (2,5 µg), anticuerpo agonista de TrkB (10 µg), anticuerpo de control de isotipo (10 µg) o control del vehículo por vía intravítrea 3 días y 10 días después de la transección del nervio óptico. El mAb2 contra TrkB es un anticuerpo agonista de TrkB de control con afinidad por TrkB humano, TrkB de rata y TrkB de ratón.

Las **Figuras 12 A y 12 B** muestran la densidad de células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratones y ratas de tipo silvestre, respectivamente, después de la transección del nervio óptico o el aplastamiento del nervio óptico y el tratamiento con diversas dosis de BDNF. La **Figura 12A** muestra la respuesta a la dosis de BDNF en un modelo de aplastamiento del nervio óptico (ONC) en ratones de TS. La **Figura 12B** muestra la respuesta a la dosis de BDNF en un modelo de transección del nervio óptico en ratas de TS de 0,13 µg a 30 µg.

La **Figura 13A** muestra la densidad de células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratas de TrkB homocigotas, heterocigotas o de tipo silvestre a las que se les administró anticuerpo agonista de TrkB o anticuerpo de control de isotipo por vía intravítrea 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico (\*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ANOVA bidireccional). Las retinas se diseccionaron 14 días después de la transección. El mAb1 contra TrkB es H4H9816P2.

La **Figura 13B** muestra la densidad de células ganglionares de la retina en ojos no lesionados diseccionados de ratas de TrkB homocigotas, heterocigotas o de tipo silvestre.

La **Figura 13C** muestra el peso corporal de los ratones homocigotos de TRKB humana a los que se les administró el anticuerpo agonista de TrkB (H4H9816P2; TrkB) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945; Control).

La **Figura 14** muestra la densidad de células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratas homocigotas de TRKB humana que recibieron cualquiera de entre anticuerpo agonista de TrkB (hTrkB; H4H9816P2) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945) por vía intravítrea 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Las retinas se diseccionaron 14 días después de la transección.

Las **Figuras 15A y 15B** muestran la densidad de células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratas homocigotas de TRKB humana que recibieron diferentes anticuerpos agonistas de TrkB (H4H9816P2-L9, H4H9814P-L9, H4H9780P-L5 o una combinación de los tres) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945) por vía intravítrea 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico (\*\*  $p < 0,01$ ; ensayo de Kruskal-Wallis comparado con el anticuerpo de control de isotipo). Las retinas se diseccionaron 14 días después de la transección. La **Figura 15A** incluye un control sin tratamiento previo (ojo contralateral no lesionado) y la **Figura 15B**, no.

La **Figura 16** muestra la densidad de las células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratas de tipo silvestre a las que se les administraron diferentes anticuerpos agonistas de TrkB (H4H9780P y H4H9814P) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945) por vía intravítrea 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Las retinas se diseccionaron 14 días después de la transección.

Las **Figuras 17A y 17B** muestran la densidad de células ganglionares de la retina en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina en ratones homocigotos de TRKB humana a los que se les administró anticuerpo agonista de TrkB (H4H9780P) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945) por vía intravítrea 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Las retinas se diseccionaron 14 días después de la transección. La **Figura 17 A** incluye un control normal (ojo contralateral no lesionado) y la **Figura 17 B**, no.

La **Figura 17C** muestra el peso corporal de los ratones homocigotos de TRKB humana a los que se les administró anticuerpo agonista de TrkB (H4H9780P) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945).

## Definiciones

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.

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 (-NH<sub>2</sub>). La expresión "extremo C" se refiere al final de una cadena de aminoácidos (proteína o polipéptido), terminado por un grupo carboxilo libre (-COOH).

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 nucleotídicas naturales, modificadas químicamente, modificadas bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

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'.

La expresión "integrado genómicamente" se refiere a un ácido nucleico que se ha introducido en una célula de manera que la secuencia nucleotídica se integra en el genoma de la célula y es capaz de ser heredada por su descendencia. Puede usarse cualquier protocolo para la incorporación estable de un ácido nucleico en el genoma de una célula.

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.

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.

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).

La expresión "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 *TrkB* endógena de un animal no humano se refiere a una secuencia de *TrkB* nativa que se produce de forma natural en el locus *TrkB* en el animal no humano.

Las moléculas o 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.

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 porciones que no se encuentran juntas de forma natural en la misma molécula. Por ejemplo, el término "heterólogo", cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico o porciones 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.

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 procarionota o eucarionota 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 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).

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

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, 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.

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.

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 eucarionota, 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 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.

"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 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).

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).

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.

"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. 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 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).

"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 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 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 nws gapdna.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 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 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 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 habituales de aminoácidos se resumen a continuación.

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

(continuación)

Glicina	Gly	G	No polar	Neutro	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro	4,5
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 %, 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 un 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.

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.

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 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.

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.

El término "recombinación" incluye cualquier proceso de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos y puede producirse por cualquier mecanismo. La recombinación en respuesta a roturas bicatenarias (DSB) se produce principalmente a través de dos vías de reparación del ADN conservadas: unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (HR). 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.

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 bicatenaria. 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 recombinación también 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; Mandalos *et al.* (2012) *PLOS ONE* 7:e45768:1-9; y Wang *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* 31:530-532.

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)<sub>2</sub>, 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 linfocitos T (BiTE) o un cuerpo de Davis (Patente de los EE.UU. N.º 8.586.713).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-TRKB" incluye tanto anticuerpos monovalentes con una única especificidad, como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a TRKB y un segundo brazo que se une a un segundo antígeno (diana), en donde el brazo anti-TRKB comprende, por ejemplo, cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se expone en la **Tabla 22** del presente documento. La expresión "anticuerpo anti-TrkB" también incluye conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo anti-TRKB o una porción de unión a antígeno del mismo conjugado con un fármaco o toxina (es decir, un agente citotóxico). La expresión "anticuerpo anti-TRKB" también incluye conjugados anticuerpo-radionúclido (ARC) que comprenden un anticuerpo anti-TRKB o una porción de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido.

La expresión "anticuerpo anti-TRKB", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a TRKB o una porción de TRKB o interactúa con él. 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, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C<sub>L1</sub>). Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> 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 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> 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. En distintas realizaciones de la invención, las FR del anticuerpo anti-TRKB (o porción de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal humana, o pueden estar modificadas de forma natural o artificial. Una secuencia de aminoácidos consenso puede definirse basándose en un análisis en paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo de longitud completa. Las expresiones "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo,

"fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se utiliza en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido obtenible enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, mediante cualquier técnica convencional adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas recombinantes de ingeniería genética que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, los constantes, de un anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, fagotecas de anticuerpos) o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o suprimir aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenarias (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", tal como se utiliza en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y en general comprenderá al menos una CDR, que esté adyacente o en marco con una o más secuencias marco conservadas. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V<sub>H</sub> asociado con un dominio V<sub>L</sub>, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden situarse uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener los dímeros V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. De manera alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monomérico.

En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones no limitantes, ilustrativas, de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; y (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una región bisagra o enlazadora completa o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, lo que da como resultado una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Por otra parte, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monoméricos (por ejemplo, mediante enlace o enlaces disulfuro).

Como ocurre con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno diferente o a un epítipo distinto en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ilustrativos que se divulgan en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas rutinarias.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, distintos anticuerpos pueden unirse a distintas áreas de un antígeno y pueden tener distintos efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce mediante aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En una determinada circunstancia, un epítipo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

La expresión "se une de manera específica", o "se une específicamente a", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio de al

menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M o menos (por ejemplo, una  $K_D$  menor indica una unión más estrecha). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos se han identificado mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™, que se une específicamente a TRKB. Por otra parte, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a la proteína TRKB y uno o más antígenos adicionales o a un biespecífico que se une a dos regiones diferentes de TRKB se consideran, no obstante, anticuerpos que "se unen específicamente", tal como se utiliza en el presente documento.

Los anticuerpos anti-TRKB que se divulgan en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones en la estructura y/o regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos que se divulgan en el presente documento con secuencias disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones pueden probarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Se incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general.

También se incluyen anticuerpos anti-TRKB que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-TRKB que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en la **Tabla 22**.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo en el contexto de anticuerpos anti-TRKB, indica que, cuando se alinean de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 95 % y, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, según se mide mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados ejemplos, codificar un polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos o una sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Tal como se aplica a polipéptidos en el contexto de anticuerpos anti-TRKB, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando ponderaciones de hueco predeterminadas, comparten al menos un 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" aplicada a polipéptidos en el contexto de anticuerpos anti-TRKB es aquella en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, p. ej., Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato; y (7) las cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

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".

"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.

- 5 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.

- 10 El término "y/o" se refiere y abarca 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").

- 15 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.

- 20 Estadísticamente significativo significa  $p < 0,05$ .

## Descripción detallada

### 25 I. Descripción general

En el presente documento se divulgan genomas de animales no humanos, células de animales no humanos y animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado y métodos de uso de dichas células de animales no humanos y animales no humanos. Las células de animales no humanos o los animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado expresa una proteína *TRKB* humana o una proteína *TRKB* quimérica que comprende uno o más fragmentos de una proteína *TRKB* humana (por ejemplo, todo o parte del dominio extracelular de *TRKB* humana).

- 35 Un alelo de *TRKB* humanizado (por ejemplo, resultante de reemplazar todo o parte del ADN genómico de un animal no humano uno por uno con ADN genómico humano ortólogo) proporcionará la verdadera diana humana o una aproximación cercana de la verdadera diana humana de reactivos de direccionamiento de *TRKB* humana (por ejemplo, anticuerpos agonistas o moléculas pequeñas agonistas diseñadas para dirigirse a la *TRKB* humana), permitiendo de este modo someter a ensayo la eficacia y el modo de acción de dichos agentes en cinco animales, así como estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos de trabajo divulgados en el presente documento, la administración intravítrea de anticuerpos agonistas de *TRKB* humana tiene un efecto neuroprotector significativo después de la lesión del nervio óptico en ratas de *TrkB* humanizado.

### II. Animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado

- 45 Los genomas de animales no humanos, células de animales no humanos y animales no humanos divulgados en el presente documento comprenden un locus *TRKB* humanizado. Las células o animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado expresan una proteína *TRKB* humana o una proteína *TRKB* quimérica parcialmente humanizada en la que uno o más fragmentos de la proteína *TRKB* nativa se han reemplazado con fragmentos correspondientes de *TRKB* humana (por ejemplo, todo o parte del dominio extracelular).

#### 50 A. *TRKB*

Las células y animales no humanos descritos en el presente documento comprenden un locus *TRKB* humanizado. *TRKB* (también conocido como receptor de factores de crecimiento BDNF-NT-3, GP145-TrkB, Trk-B, TrkB, receptor tirosina quinasa neurotrófico de tipo 2, tirosina quinasa TrkB, quinasa B relacionada con la tropomiosina, quinasa B receptora de tropomiosina, tirosina quinasa receptora neurotrófica 2 y NTRK2) está codificado por el gen *TRKB* (también conocido como *NTRK2*, *OBHD*, *TRK-B* y *GP145-TRKB*). *TRKB* es una tirosina quinasa receptora implicada en el desarrollo y la maduración de los sistemas nerviosos central y periférico a través de la regulación de la supervivencia, la proliferación, la migración, la diferenciación y formación de sinapsis y plasticidad de las neuronas. *TRKB* es un receptor para BDNF/factor neurotrófico derivado del cerebro y NTF4/neurotrofina-4. De manera alternativa, *TRKB* también puede unirse a NTF3/neurotrofina-3, que es menos eficiente para activar el receptor, pero regula la supervivencia de las neuronas a través de *TRKB*. Tras la unión del ligando, *TRKB* experimenta homodimerización, autofosforilación y activación. La isoforma canónica de *TRKB* se expresa en el sistema nervioso central y periférico. En el sistema nervioso central (SNC), la expresión se observa en la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el plexo coroideo, la capa granular del cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal. En el sistema nervioso periférico, se expresa en muchos ganglios craneales, el nervio oftálmico, el sistema vestibular, múltiples

estructuras faciales, las glándulas submaxilares y los ganglios de la raíz dorsal.

*TRKB* humano se cartografía en 9q21.33 humano en el cromosoma 9 (ID del gen NCBI RefSeq 4915; Ensamblaje GRCh38.p7; ubicación NC\_000009.12 (84668368..85027070)). Se ha publicado que el gen tiene 23 exones. A la proteína *TRKB* humana de tipo silvestre se le ha asignado el número de acceso UniProt Q16620. Se conocen al menos siete isoformas (de Q16620-1 a Q16620-7). La secuencia de una isoforma, Q16620-4 (idéntica al número de acceso de NCBI NP\_006171.2), se expone en la SEQ ID NO: 3. A un ARNm (ADNc) que codifica la isoforma canónica se le asigna el N.º de acceso de NCBI AF410899.1 y se expone en la SEQ ID NO: 8. A otro ejemplo de un ARNm (ADNc) que codifica una isoforma de *TRKB* humana se le asigna la ID de ARNm RefSeq NM\_006180.4. Se expone una secuencia codificante (CDS) de ejemplo en la SEQ ID NO: 11. La proteína *TRKB* humana de longitud completa expuesta en la SEQ ID NO: 3 tiene 838 aminoácidos, incluyendo un péptido señal (aminoácidos 1-31), un dominio extracelular (aminoácidos 32-430), un dominio transmembrana (aminoácidos 431-454) y un dominio citoplasmático (aminoácidos 455-838). Las delimitaciones entre estos dominios son las designadas en UniProt. La referencia a la *TRKB* humana incluye las formas canónicas (de tipo silvestre), así como todas las formas alélicas e isoformas. Cualquier otra forma de *TRKB* humana tiene aminoácidos numerados para una máxima alineación con la forma de tipo silvestre, designándose los aminoácidos alineados con el mismo número. Un ejemplo de otra isoforma de *TRKB* humana es Q16620-1 (idéntica al número de acceso del NCBI NP\_001018074.1), expuesta en la SEQ ID NO: 75. A un ARNm (ADNc) que codifica esta isoforma se le asigna el N.º de acceso de NCBI NM\_001018064.2 y se expone en la SEQ ID NO: 76. Una secuencia codificante (CDS) de ejemplo para esta isoforma (ID de CCDS CCDS35050.1) se expone en la SEQ ID NO: 77.

*TrkB* de rata se cartografía en 17p14 de rata en el cromosoma 17 (ID del gen NCBI RefSeq 25054; Ensamblaje Rnor\_6.0; ubicación NC\_005116.4 (5934651..6245778, complemento)). Se ha publicado que el gen tiene 23 exones. A la proteína *TRKB* de rata de tipo silvestre se le ha asignado el número de acceso UniProt Q63604. Se conocen al menos tres isoformas (de Q63604-1 a Q63604-3). La secuencia para la isoforma canónica, Q63604-1 (idéntica al número de acceso de NCBI NP\_036863.1), se expone en la SEQ ID NO: 2. A un ARNm (ADNc) que codifica la isoforma canónica se le asigna el N.º de acceso de NCBI NM\_012731.2 y se expone en la SEQ ID NO: 7. A otro ejemplo de un ARNm (ADNc) que codifica una isoforma de *TRKB* de rata se le asigna la ID de ARNm RefSeq M55291. Se expone una secuencia codificante (CDS) de ejemplo en la SEQ ID NO: 10. La proteína *TRKB* de rata de longitud completa canónica expuesta en la SEQ ID NO: 2 tiene 821 aminoácidos, incluyendo un péptido señal (aminoácidos 1-31), un dominio extracelular (aminoácidos 32-429), un dominio transmembrana (aminoácidos 430-453) y un dominio citoplasmático (aminoácidos 454-821). Las delimitaciones entre estos dominios son las designadas en UniProt. La referencia a la *TRKB* de rata incluye las formas canónicas (de tipo silvestre), así como todas las formas alélicas e isoformas. Cualquier otra forma de *TRKB* de rata tiene aminoácidos numerados para una máxima alineación con la forma de tipo silvestre, designándose los aminoácidos alineados con el mismo número.

*TrkB* de ratón se cartografía al 13 B1 de ratón; 13 31,2 cM en el cromosoma 12 (ID del gen de NCBI RefSeq 18212; Ensamblaje GRCm38.p4 (GCF\_000001635.24); ubicación NC\_000079.6 (58806569..59133970)). Se ha publicado que el gen tiene 23 exones. A la proteína *TRKB* de ratón de tipo silvestre se le ha asignado el número de acceso UniProt P15209. Se conocen al menos cuatro isoformas (de P15209-1 a P15209-4). La secuencia para la isoforma canónica, P15209-1 (idéntica a los números de acceso de NCBI NP\_001020245.1 y NP\_001269890.1), se expone en la SEQ ID NO: 1. A una isoforma de ARNm (ADNc) de ejemplo que codifica la isoforma canónica se le asigna el N.º de acceso de NCBI NM\_001025074.2 y se expone en la SEQ ID NO: 6. Una secuencia codificante (CDS) de ejemplo (ID de CCDS CCDS26573.1) se expone en la SEQ ID NO: 9. La proteína *TRKB* de ratón de longitud completa canónica expuesta en la SEQ ID NO: 1 tiene 821 aminoácidos, incluyendo un péptido señal (aminoácidos 1-31), un dominio extracelular (aminoácidos 32-429), un dominio transmembrana (aminoácidos 430-453) y un dominio citoplasmático (aminoácidos 454-821). Las delimitaciones entre estos dominios son las designadas en UniProt. La referencia a la *TRKB* de ratón incluye las formas canónicas (de tipo silvestre), así como todas las formas alélicas e isoformas. Cualquier otra forma de *TRKB* de ratón tiene aminoácidos numerados para una máxima alineación con la forma de tipo silvestre, designándose los aminoácidos alineados con el mismo número.

## B. Loci *TRKB* humanizados

Un locus *TRKB* humanizado puede ser un locus *TrkB* en el que todo el gen *TrkB* se reemplaza con la correspondiente secuencia de *TRKB* humano ortólogo o puede ser un locus *TrkB* en el que solo una porción del gen *TrkB* se reemplaza con la secuencia de *TRKB* humano ortólogo correspondiente (es decir, humanizado). Opcionalmente, la secuencia de *TRKB* humana ortóloga se modifica para optimizar los codones basándose en el uso de codones en el animal no humano. Las regiones reemplazadas (es decir, humanizadas) pueden incluir regiones codificantes tales como un exón, regiones no codificantes tales como un intrón, una región sin traducir o una región reguladora (por ejemplo, un promotor, un potenciador o un elemento de unión a represor transcripcional), o cualquier combinación de los mismos. Como ejemplo, los exones correspondientes a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o los 23 exones del gen *TRKB* humano pueden humanizarse. Por ejemplo, pueden humanizarse exones correspondientes a los exones 3-10 del gen *TRKB* humano, incluyendo el segmento del exón 2 (exón codificante 1) del codón que codifica el aminoácido 33, comenzando justo después del péptido señal. De manera alternativa, puede humanizarse una región de *TrkB* que codifica un epítipo reconocido por una proteína de unión a antígeno anti-*TRKB* humana o una región dirigida por un reactivo dirigido a *TRKB* humana (por ejemplo, una molécula pequeña). Del

mismo modo, los intrones correspondientes a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o los 22 intrones del gen *TRKB* humano pueden humanizarse o permanecer endógenos. Por ejemplo, pueden humanizarse intrones correspondientes a los intrones entre los exones 2 y 10 (es decir, intrones 2-9, entre el exón codificante 1 y el exón 10) del gen *TRKB* humano, incluyendo opcionalmente parte del intrón después del exón 10 (es decir, el intrón 10). Las regiones flanqueantes no traducidas que incluyen secuencias reguladoras también pueden humanizarse o permanecer endógenas. Por ejemplo, la región no traducida 5' (UTR), la UTR 3', o tanto la UTR 5' como la UTR 3' se pueden humanizar, o la UTR 5', la UTR 3', o tanto la UTR 5' como la UTR 3' pueden permanecer endógenas. En un ejemplo específico, tanto la UTR 5' como la UTR 3' permanecen endógenas. Dependiendo del grado de reemplazo por secuencias ortólogas, las secuencias reguladoras, tales como un promotor, pueden ser endógenas o ser suministradas por la secuencia ortóloga humana de reemplazo. Por ejemplo, el locus *TRKB* humanizado puede incluir el promotor *TrkB* animal no humano endógeno.

Una o más o todas las regiones que codifican el péptido señal, el dominio citoplasmático, el dominio transmembrana o el extracelular pueden humanizarse, o una o más de dichas regiones pueden permanecer endógenas. Se exponen secuencias codificantes de ejemplo para un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático de TRKB de ratón en las SEQ ID NO: 63-66, respectivamente. Se exponen secuencias codificantes de ejemplo para un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático de TRKB de rata en las SEQ ID NO: 67-70, respectivamente. Se exponen secuencias codificantes de ejemplo para un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático de TRKB humana en las SEQ ID NO: 71-74, respectivamente.

Por ejemplo, toda o parte de la región del locus *TrkB* que codifica el péptido señal puede humanizarse, y/o toda o parte de la región del locus *TrkB* que codifica el dominio extracelular puede humanizarse, y/o toda o parte de la región del locus *TrkB* que codifica el dominio transmembrana puede humanizarse, y/o toda o parte de la región del locus *TrkB* que codifica el dominio citoplasmático puede humanizarse. En un ejemplo, toda o parte de la región del locus *TrkB* que codifica el dominio extracelular se humaniza. Opcionalmente, la CDS del dominio extracelular TRKB humano comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 72 (o se degenera con respecto a la misma). La proteína TRKB puede conservar la actividad de la TRKB nativa (por ejemplo, conserva la capacidad de fosforilarse, conserva la capacidad de activar vías de señalización corriente abajo, tales como las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, o conserva la capacidad de regular la supervivencia, la proliferación, la migración, la diferenciación o la formación de sinapsis y la plasticidad de las neuronas o producir cualquiera de los fenotipos divulgados en otra parte del presente documento). Por ejemplo, la región del locus *TrkB* que codifica el dominio extracelular puede humanizarse de manera que se produzca una proteína TRKB quimérica con un péptido señal endógeno, un dominio citoplasmático endógeno, un dominio transmembrana endógeno y un dominio extracelular humanizado.

Una o más de las regiones que codifican el péptido señal, el dominio citoplasmático, el dominio transmembrana o el extracelular pueden permanecer endógenas. Por ejemplo, la región que codifica el péptido señal y/o el dominio citoplasmático y/o el dominio transmembrana puede permanecer endógena. Opcionalmente, la CDS del péptido señal TRKB endógeno comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las SEQ ID NO: 63 o 67 (o se degenera con respecto a las mismas). Opcionalmente, la CDS del dominio transmembrana de TRKB endógeno comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las SEQ ID NO: 65 o 69 (o se degenera con respecto a las mismas). Opcionalmente, la CDS del dominio citoplasmático de TRKB endógeno comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a las SEQ ID NO: 66 o 70 (o se degenera con respecto a las mismas). En cada caso, la proteína TRKB puede conservar la actividad de la TRKB nativa.

La proteína TRKB codificada por locus *TRKB* humanizado puede comprender uno o más dominios que son de una proteína TRKB humana y/o uno o más dominios que son de una proteína TRKB endógena (es decir, nativa). Se exponen secuencias de aminoácidos de ejemplo para un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático de TRKB de ratón en las SEQ ID NO: 51-54, respectivamente. Se exponen secuencias de aminoácidos de ejemplo para un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático de TRKB de rata en las SEQ ID NO: 55-58, respectivamente. Se exponen secuencias de aminoácidos de ejemplo para un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático de TRKB humana en las SEQ ID NO: 59-62, respectivamente.

La proteína TRKB puede comprender uno o más o todos de entre un péptido señal de TRKB humana, un dominio extracelular de TRKB humana, un dominio transmembrana de TRKB humana y un dominio citoplasmático de TRKB humana. Como ejemplo, la proteína TRKB puede comprender un dominio extracelular de TRKB humana.

La proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* humanizado también puede comprender uno o más dominios que son de la proteína TRKB animal no humana endógena (es decir, nativa). Como ejemplo, la proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* humanizado puede comprender un péptido señal de la proteína TRKB de animal no humano endógena (es decir, nativa) y/o un dominio citoplasmático de la proteína TRKB de animal no humano endógena (es decir, nativa) y/o un dominio transmembrana de la proteína TRKB de animal no humano (es decir, nativa).

Los dominios en una proteína TRKB quimérica que son de una proteína TRKB humana pueden estar codificados por una secuencia completamente humanizada (es decir, la secuencia completa que codifica ese dominio se reemplaza con la secuencia de *TRKB* humana ortóloga) o pueden estar codificados por una secuencia parcialmente humanizada (es decir, parte de la secuencia que codifica ese dominio se reemplaza con la secuencia de *TRKB* humana ortóloga, y la secuencia endógena (es decir, nativa) restante que codifica ese dominio codifica los mismos aminoácidos que la secuencia de *TRKB* humana ortóloga de manera que el dominio codificado sea idéntico a ese dominio en la proteína TRKB humana). Del mismo modo, los dominios en una proteína quimérica que son de la proteína TRKB endógena pueden estar codificados por una secuencia completamente endógena (es decir, la secuencia completa que codifica ese dominio es la secuencia de *TrkB* endógena) o pueden estar codificados por una secuencia parcialmente humanizada (es decir, parte de la secuencia que codifica ese dominio se reemplaza con la secuencia de *TRKB* humana ortóloga, pero la secuencia de *TRKB* humana ortóloga codifica los mismos aminoácidos que la secuencia *TrkB* endógena reemplazada de manera que el dominio codificado es idéntico a ese dominio en la proteína TRKB endógena). Por ejemplo, parte de la región del locus *TrkB* que codifica el dominio transmembrana (por ejemplo, que codifica la región N-terminal del dominio transmembrana) se puede reemplazar con secuencia de *TRKB* humana ortóloga, en donde la secuencia de aminoácidos de la región del dominio transmembrana codificada por la secuencia *TRKB* humana ortóloga es idéntica a la secuencia de aminoácidos endógena correspondiente.

Como ejemplo, la proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* humanizado puede comprender un dominio extracelular de TRKB humana. Opcionalmente, el dominio extracelular de TRKB humana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 60. La proteína TRKB conserva la actividad de la TRKB nativa (por ejemplo, conserva la capacidad de fosforilarse, conserva la capacidad de activar vías de señalización corriente abajo, tales como las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, o conserva la capacidad de regular la supervivencia, la proliferación, la migración, la diferenciación o la formación de sinapsis y la plasticidad de las neuronas o producir cualquiera de los fenotipos divulgados en otra parte del presente documento). Como otro ejemplo, la proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* humanizado puede comprender un dominio citoplásmico de TRKB de animal no humano endógeno (por ejemplo, un dominio citoplásmico de TRKB de ratón o un dominio citoplásmico de TRKB de rata). Opcionalmente, el dominio citoplásmico de TRKB de animal no humano comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 54 o 58. Como otro ejemplo, la proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* humanizado puede comprender un dominio transmembrana de TRKB de animal no humano endógeno (por ejemplo, un dominio transmembrana de TRKB de ratón o un dominio transmembrana de TRKB de rata). Opcionalmente, el dominio transmembrana de TRKB de animal no humano comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 53 o 57. Como otro ejemplo, la proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* humanizado puede comprender un péptido señal de TRKB de animal no humano endógeno (por ejemplo, un péptido señal de TRKB de ratón o un péptido señal de TRKB de rata). Opcionalmente, el péptido señal de TRKB de animal no humano comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 51 o 55. En cada caso, la proteína TRKB puede conservar la actividad de la TRKB nativa. Por ejemplo, la proteína TRKB codificada por el locus *TRKB* 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: 4 o 5. Opcionalmente, la CDS de *TRKB* codificada por el locus *TRKB* 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 las SEQ ID NO: 12 o 13 (o se degenera con respecto a las mismas). En cada caso, la proteína TRKB puede conservar la actividad de la TRKB nativa.

Opcionalmente, un locus *TRKB* humanizado puede comprender otros elementos. Los ejemplos de tales elementos pueden incluir casetes de selección, genes indicadores, sitios de reconocimiento de recombinasa u otros elementos. De manera alternativa, el locus *TRKB* humanizado puede carecer de otros elementos (por ejemplo, puede carecer de un marcador de selección o un casete de selección). En otros lugares del presente documento se divulgan ejemplos de genes indicadores y proteínas indicadoras adecuados. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados incluyen neomicina fosfotransferasa (*neo<sub>r</sub>*), higromicina B fosfotransferasa (*hyg<sub>r</sub>*), puromicina-N-acetiltransferasa (*puro<sub>r</sub>*), blasticidina S desaminasa (*bsr<sub>r</sub>*), 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 casetes de selección pueden ser casetes 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 *TRKB* 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.

Un locus *TRKB* humanizado de ejemplo (por ejemplo, un locus *TrkB* de ratón humanizado o un locus *TrkB* de rata humanizado) es aquel en el que una región en el exón 2/exón codificante 1 del codón que codifica el aminoácido 33, comenzando justo después del péptido señal (o el codón correspondiente al codón que codifica el aminoácido 33 en *TrkB* de ratón, *TrkB* de rata o *TRKB* humano cuando está óptimamente alineado con la CDS de *TrkB* de ratón, *TrkB* de rata o *TRKB* humano, respectivamente) hasta el exón 10 (o el exón correspondiente al exón 10 de *TrkB* de ratón, *TrkB* de rata o *TRKB* humano cuando está óptimamente alineado con la CDS de *TrkB* de ratón, *TrkB* de rata o *TRKB* humano, respectivamente), incluyendo opcionalmente una porción del intrón 10, se reemplaza con la secuencia humana correspondiente. La región reemplazada codifica el dominio extracelular de TRKB. Véanse las Figuras 1 y 4 y las SEQ ID NO: 4 y 5.

### **C. Genomas de animales no humanos, células de animales no humanos y animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado**

Se proporcionan genomas de animales no humanos, células de animales no humanos y animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado como se describe en otra parte del presente documento. Los genomas, las células o los animales no humanos pueden ser machos o hembras. Los genomas, las células o los animales no humanos pueden ser heterocigotos u homocigotos para el locus *TRKB* 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.

Los genomas o células de animales no humanos proporcionados en el presente documento pueden ser, por ejemplo, cualquier genoma o célula de animal no humano que comprende un locus *Trtr* o un locus genómico homólogo u ortólogo al locus *TRKB* humano. Los genomas pueden proceder de o las células pueden ser células eucariotas, que incluyen, por ejemplo, células fúngicas (por ejemplo, levadura), células vegetales, células animales, células de mamífero, células de mamífero no humano y células humanas. El término "animal" incluye cualquier miembro del reino animal, que incluye, por ejemplo, mamíferos, peces, reptiles, anfibios, pájaros y gusanos. Una célula de mamífero puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de rata, una 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, toros, ciervos, bisontes, 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). Los pájaros incluyen, por ejemplo, pollos, pavos, avestruz, gansos, patos, etc. También se incluyen animales domesticados y animales agrícolas. La expresión "no humano" excluye a los humanos.

Las células también pueden estar en cualquier tipo de estado diferenciado o indiferenciado. 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 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 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).

Las células proporcionadas 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 neuronas, tales como neuronas del hipocampo o neuronas corticales.

Las células adecuadas proporcionadas 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 pases previos en cultivo tisular o que se ha sometido a pases previos en cultivo tisular pero no puede someterse a pases previos de manera indefinida en cultivo tisular. Dichas células pueden aislarse mediante técnicas convencionales e incluyen, por ejemplo, neuronas del hipocampo o neuronas corticales.

Otras células adecuadas proporcionadas 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 una línea celular de neuroblastoma tal como N18TG2 o T48 o una línea celular tal como la línea celular NIH-3T3. 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.

Las células proporcionadas en el presente documento también incluyen embriones en fase 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*.

Las células proporcionadas en el presente documento pueden ser normales, células sanas o pueden ser células enfermas o portadoras de mutantes.

Los animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado como se describe en el presente documento pueden obtenerse mediante los métodos descritos en otro lugar del presente documento. Los animales no humanos son ratas.

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<sup>av1</sup>*. 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<sup>av1</sup>*. 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 para usar animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado para evaluar la eficacia de reactivos dirigidos a *TRKB* humana *in vivo* o *ex vivo***

Se proporcionan diversos métodos para usar los animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado como se describe en otra parte del presente documento para evaluar u optimizar el suministro o eficacia de reactivos dirigidos a *TRKB* humana (por ejemplo, moléculas agonistas terapéuticas) *in vivo* o *ex vivo*. Debido a que los animales no humanos comprenden un locus *TRKB* humanizado, los animales no humanos reflejarán con mayor precisión la eficacia de un reactivo dirigido a *TRKB* humana.

#### **A. Métodos para someter a ensayo la eficacia de los reactivos dirigidos a *TRKB* humana *in vivo* o *ex vivo***

Se proporcionan diversos métodos para evaluar el suministro o la eficacia de reactivos dirigidos a *TRKB* humana *in vivo* utilizando animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* 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 *TRKB* humana; y (b) evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TRKB* humana.

El reactivo dirigido a *TRKB* humana puede ser un anticuerpo dirigido a *TRKB* humana o una proteína de unión a antígeno, o cualquier otra molécula grande o pequeña que se dirija a *TRKB* humana. De manera alternativa, el reactivo dirigido a *TRKB* humana puede ser cualquier agente biológico o químico que se dirija al locus *TRKB* humano (el gen

*TRKB* humano), el ARNm de *TRKB* humano o la proteína *TRKB* humana. En otra parte del presente documento se divulgan ejemplos de reactivos dirigidos a *TRKB* humana.

- 5 Dichos reactivos dirigidos a *TRKB* humana se pueden administrar mediante cualquier método de suministro (por ejemplo, inyección, 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 moléculas terapéuticas y las vías de administración se divulgan con más detalle en otra parte del presente documento. En métodos particulares, los reactivos se suministran a través de inyección (por ejemplo, inyección directa en el hipocampo, inyección subcutánea o inyección intravítrea).
- 10 Los métodos para evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TRKB* humana son bien conocidos y se proporcionan en otra parte del presente documento. En algunos métodos, evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TRKB* humana (por ejemplo, actividad agonista o actividad inhibidora) comprende evaluar la actividad de *TRKB* (por ejemplo, fosforilación de *TRKB*, activación mediada por *TRKB* de vías de señalización corriente abajo o fenotipos inducidos por *TRKB*) como se divulga 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 el tejido cerebral (por ejemplo, hipocampo o cuerpo estriado) o en las neuronas (por ejemplo, células ganglionares de la retina, neuronas del hipocampo o neuronas corticales).
- 20 Si el reactivo dirigido a *TRKB* es un reactivo de edición genómica (por ejemplo, un agente nucleasa), dichos métodos pueden comprender evaluar la modificación del locus *TRKB* humanizado. Por ejemplo, la evaluación puede comprender secuenciar el locus *TRKB* 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 (por ejemplo, cerebro) o tejido del animal no humano y evaluar la modificación del locus *TRKB* humanizado en el órgano o tejido diana. La evaluación también puede comprender la evaluación de la modificación del locus *TRKB* 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 *TRKB* humanizado locus en el órgano o tejido no diana.
- 25 Dichos métodos también pueden comprender medir los niveles de expresión del ARNm producido por el locus *TRKB* humanizado o medir los niveles de expresión de la proteína codificada por el locus *TRKB* humanizado. Por ejemplo, los niveles de proteína se pueden medir en una célula, tejido, tipo de órgano (por ejemplo, cerebro) particular o los niveles secretados se pueden medir en el suero. En otra parte del presente documento se divulgan y se conocen bien métodos para evaluar la expresión de ARNm de *TRKB* o proteína expresada a partir del locus *TRKB* humanizado.
- 30 Los diversos métodos proporcionados anteriormente para evaluar la actividad *in vivo* también se pueden utilizar para evaluar la actividad de reactivos dirigidos a *TRKB* humana *ex vivo* como se describe en otra parte del presente documento.

#### 40 **B. Métodos para optimizar el suministro o eficacia del reactivo dirigido a *TRKB* humana *in vivo* o *ex vivo***

Se proporcionan diversos métodos para optimizar el suministro de reactivos dirigidos a *TRKB* humana a una célula o animal no humano u optimizar la actividad o eficacia de reactivos dirigidos a *TRKB* humana *in vivo*. Dichos métodos pueden comprender, por ejemplo: (a) realizar el método para someter a ensayo la eficacia de un reactivo dirigido a *TRKB* humana como se ha descrito anteriormente por primera vez en un primer animal no humano o una primera célula; (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 con la variable cambiada; y (c) comparar la actividad del reactivo dirigido a *TRKB* humana en la etapa (a) con la actividad del reactivo dirigido a *TRKB* humana en la etapa (b) y seleccionar el método que dé como resultado la mayor eficacia o actividad.

50 En otra parte del presente documento se divulgan métodos de medición del suministro, la eficacia o la actividad de los reactivos dirigidos a *TRKB* humana. Una mayor eficacia puede significar diferentes cosas dependiendo del efecto deseado dentro de la célula o animal no humano. Por ejemplo, una mayor eficacia puede significar una mayor actividad y/o una mayor especificidad. Una mayor actividad puede ser, por ejemplo, actividad en la activación de *TRKB* o actividad en la inhibición de *TRKB*. Puede referirse a un mayor porcentaje de células dirigidas dentro de un tipo de célula diana particular (por ejemplo, neuronas tales como células ganglionares de la retina) o dentro de un tejido u órgano diana particular (por ejemplo, cerebro). Una mayor especificidad puede referirse a una mayor especificidad con respecto a *TRKB* en comparación con los efectos inespecíficos, una mayor especificidad con respecto al tipo celular diana o una mayor especificidad con respecto al tipo de tejido u órgano diana.

60 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 *TRKB* humana se introduce en la célula o en el animal no humano. En otra parte del presente documento se divulgan ejemplos de métodos de suministro. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser la vía de administración para la introducción del reactivo o reactivos dirigidos a *TRKB* humana en la célula o animal no humano. En otra parte del presente documento se divulgan ejemplos de vías de administración.

Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser la concentración o cantidad del reactivo o reactivos dirigidos a TRKB humana introducidos. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser el momento de introducir el reactivo o reactivos dirigidos a TRKB humana con respecto al 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 TRKB humana. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser el reactivo o reactivos dirigidos a TRKB humana que se introducen (por ejemplo, comparando un reactivo con un reactivo diferente).

### C. Reactivos dirigidos a TRKB humana

Un reactivo dirigido a TRKB humana puede ser cualquier reactivo que se dirija a una proteína TRKB humana, un gen *TRKB* humano o un ARNm de *TRKB* humano. Un reactivo dirigido a TRKB humana puede ser, por ejemplo, un agonista (es decir, una molécula que activa directa o indirectamente la TRKB humana) o puede ser un antagonista (es decir, un inhibidor o reactivo inhibidor que bloquea la actividad de la TRKB humana). En un ejemplo específico, el reactivo dirigido a TRKB humana es un agonista de TRKB. Los reactivos dirigidos a TRKB humana en los métodos divulgados en el presente documento pueden ser reactivos dirigidos a TRKB humana conocidos, pueden ser supuestos reactivos dirigidos a TRKB humana (por ejemplo, reactivos candidatos diseñados para dirigirse a TRKB humana) o pueden ser reactivos en los que se está cribando la actividad dirigida a TRKB humana.

Por ejemplo, un reactivo dirigido a TRKB humana puede ser una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo agonista) dirigida a un epítipo de una proteína TRKB humana. Un ejemplo de dicho reactivo es el anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2. En otra parte del presente documento se divulgan otros anticuerpos anti-TRKB. En algunos casos, los anticuerpos anti-TRKB se unen a la TRKB humana con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 200 nM medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o a 37 °C. En otros casos, los anticuerpos anti-TRKB se unen a la TRKB humana con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 600 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 150 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 80 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, inferior a aproximadamente 40 pM, inferior a aproximadamente 30 pM, inferior a aproximadamente 20 pM, inferior a aproximadamente 10 pM, inferior a aproximadamente 5 pM, inferior a aproximadamente 3 pM o inferior a aproximadamente 1 pM. En algunos casos, los anticuerpos anti-TRKB se unen a la TRKB humana con una semivida de disociación ( $t_{1/2}$ ) superior a aproximadamente 10 minutos medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C. En otros casos, los anticuerpos anti-TRKB se unen a la TRKB humana con una  $t_{1/2}$  superior a aproximadamente 20 minutos, superior a aproximadamente 50 minutos, superior a aproximadamente 100 minutos, superior a aproximadamente 120 minutos, superior a aproximadamente 150 minutos, superior a aproximadamente 300 minutos, superior a aproximadamente 350 minutos, superior a aproximadamente 400 minutos, superior a aproximadamente 450 minutos, superior a aproximadamente 500 minutos, superior a aproximadamente 550 minutos, superior a aproximadamente 600 minutos, superior a aproximadamente 700 minutos, superior a aproximadamente 800 minutos, superior a aproximadamente 900 minutos, superior a aproximadamente 1000 minutos, superior a aproximadamente 1100 minutos o superior a aproximadamente 1200 minutos. Como ejemplo específico, el anticuerpo anti-TRKB puede comprender un conjunto de seis CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) seleccionadas de los grupos expuestos en la **Tabla 22** o secuencias sustancialmente similares que tengan al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Otros reactivos dirigidos a TRKB humana incluyen moléculas pequeñas (por ejemplo, agonistas) que se dirigen a una proteína TRKB humana. Los ejemplos de agonistas de TRKB de molécula pequeña incluyen 7,8-dihidroxiavona (7,8-DHF), desoxigedunina, LM22A-4 (*N,N,N'*-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-bencenotricarboxamida) y LM22B-10 (2-[[4-[[4-Bis-(2-hidroxietil)-amino]-fenil]-(4-cloro-fenil)-metil]-fenil]-(2-hidroxietil)-amino]-etanol). Véase, p. ej., Liu *et al.* (2015) *Translational Neurodegeneration* 5:2; Massa *et al.* (2010) *J. Clin. Invest.* 120(5):1774-1785; y Yang *et al.* (2016) *Neuropharmacology* 110:343-361. Un ejemplo de un reactivo dirigido a TRKB que es un inhibidor es K252a. Véase, p. ej., Yang *et al.* (2016) *Neuropharmacology* 110:343-361.

Otros reactivos dirigidos a TRKB humana incluyen péptidos o peptidomiméticos (por ejemplo, agonistas) dirigidos a una proteína TRKB humana. Se divulgan ejemplos de peptidomiméticos que sirven como agonistas de TRKB humana, por ejemplo, en O'Leary *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278(28):25738-25744.

Otros reactivos dirigidos a TRKB humana pueden incluir reactivos de edición genómica tales como un agente nucleasa (por ejemplo, una nucleasa de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas (CRISPR)/asociada a CRISPR (Cas) (CRISPR/Cas), una nucleasa de dedos de zinc (ZFN) o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN)) que escinde un sitio de reconocimiento dentro del gen *TRKB* humano. Del mismo modo, un reactivo de direccionamiento a TRKB humana puede ser un ácido nucleico donante exógeno (por ejemplo, un vector de direccionamiento o un oligodesoxinucleótido monocatenario (ssODN)) diseñado para recombinarse con el gen *TRKB* humano).

Otros reactivos dirigidos a TRKB humana pueden incluir oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARNip o ARNhc) dirigidos a un ARNm de *TRKB* humano. 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).

La actividad de cualquier otro reactivo dirigido a TRKB 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 TRKB humana utilizando los animales no humanos divulgados en el presente documento.

#### **D. Administración de reactivos dirigidos a TRKB humana a células o animales no humanos**

Los métodos divulgados en el presente documento pueden comprender introducir en una célula o animal no humano diversas moléculas (por ejemplo, reactivos dirigidos a TRKB humana tales como anticuerpos o moléculas pequeñas), incluidos ácidos nucleicos, proteínas, complejos de ácido nucleico y proteína, peptidomiméticos, proteínas de unión a antígeno o moléculas pequeñas. "Introducir" incluye presentar a la célula o al animal no humano la molécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína o molécula pequeña) 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 realizar por cualquier medio. Si se introducen múltiples componentes, se pueden introducir simultánea o secuencialmente en cualquier combinación. 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.

Las moléculas 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 poli(ácido láctico) (PLA), microesferas de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), liposomas, micelas, micelas inversas, coqueatos lipídicos y microtúbulos lipídicos.

En el presente documento se proporcionan diversos métodos y composiciones para permitir la introducción de un reactivo dirigido a TRKB humana 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 reactivos dirigidos a TRKB humana 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 reactivos dirigidos a TRKB humana 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 o un polinucleótido que codifica una proteína 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 en el citoplasma y es necesario dirigirla al núcleo, puede

comprender una señal de localización nuclear para garantizar la entrega al 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 reactivos dirigidos a TRKB humana 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 poli(ácido láctico) (PLA), una microesfera de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (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 reactivos dirigidos a TRKB humana 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 reactivos dirigidos a TRKB humana 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. 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.

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.

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.

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.

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.

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 concatémoros, 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.

La introducción de reactivos dirigidos a TRKB humana también se puede lograr mediante suministro mediado por nanopartículas lipídicas (LNP). 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*. Se pueden encontrar ejemplos de lípidos catiónicos adecuados, lípidos neutros, lípidos aniónicos, lípidos auxiliares y lípidos ocultos en el documento WO 2016/010840 A1. Una nanopartícula lipídica 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.

El modo de administración se puede seleccionar para disminuir la inmunogenicidad. Por ejemplo, si se suministran múltiples componentes, pueden suministrarse mediante modos diferentes (por ejemplo, suministro bimodal). Estos modos diferentes pueden conferir diferentes propiedades farmacodinámicas o farmacocinéticas a la molécula suministrada en cuestión. 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).

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 intravítrea son otros ejemplos específicos. Los modos locales de administración incluyen, por ejemplo, las vías intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa (por ejemplo, suministro intraparenquimatoso localizado en el cuerpo estriado (por ejemplo, en el caudado o en el putamen), corteza cerebral, giro precentral, hipocampo (por ejemplo, en el giro dentado o en la región CA3), corteza temporal, amígdala, corteza frontal, tálamo, cerebelo, médula, hipotálamo, tectum, tegumento o sustancia negra), intraocular, intraorbital, subconjuntival, intravítrea, 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 intraparenquimatosa o intravítrea) 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. En un ejemplo específico, se administra un reactivo dirigido a TRKB humana mediante inyección directa en el hipocampo, inyección subcutánea o inyección intravítrea.

Las composiciones que comprenden reactivos dirigidos a TRKB humana se pueden formular utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares. 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 reactivos dirigidos a TRKB humana y de la vía de administración, entre otros factores. La introducción de reactivos dirigidos a TRKB humana en la célula o 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 dieciséis 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 TRKB humana in vivo o ex vivo**

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además detectar o medir la actividad de reactivos dirigidos a TRKB humana. Medir la actividad de dichos reactivos (por ejemplo, actividad agonista o actividad inhibidora) puede comprender medir la actividad de TRKB. La actividad de TRKB puede medirse por cualquier medio conocido. Por ejemplo, se puede evaluar la fosforilación de TRKB (por ejemplo, en el cerebro o las neuronas), se puede evaluar la activación de vías corriente abajo tales como PI3K/AKT y MAPK/ERK por TRKB (por ejemplo, en el cerebro o las neuronas, tales como las neuronas corticales primarias) o se puede evaluar la supervivencia celular (por ejemplo, la supervivencia de las células neuronales, tal como la supervivencia de las células ganglionares de la retina). Por ejemplo, la fosforilación o la activación de vías de señalización corriente abajo se pueden evaluar 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 18 horas después de la dosificación. Aumentos en la fosforilación de TRKB, la activación de vías de señalización corriente abajo o la supervivencia celular pueden ser indicios de activación de TRKB, mientras que las disminuciones pueden ser indicios de inhibición de TRKB.

En animales no humanos, la evaluación puede comprender evaluar uno o más o todos de entre el peso corporal, la composición corporal, el metabolismo y la locomoción con respecto a un animal no humano de control (por ejemplo, a 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 120 horas después de la dosis). Véase, p. ej., Lin *et al.* (2008) PLoS ONE 3(4):e1900; Rios *et al.* (2013) Trends in Neurosciences 36(2):83-90; y Zorner *et al.* (2003) Biol. Psychiatry 54:972-982. La evaluación de los cambios en la composición corporal puede comprender, por ejemplo, la evaluación de la masa magra y/o la masa grasa. La evaluación de los cambios en el metabolismo puede comprender, por ejemplo, evaluar cambios en el consumo de alimentos y/o consumo de agua. Las disminuciones de peso corporal, grasa corporal, masa magra, ingesta de alimentos e ingesta de agua pueden ser indicios de activación de TRKB, mientras que los aumentos pueden ser indicios de inhibición de TRKB. Los aumentos en la locomoción pueden ser indicios de activación de TRKB, mientras que las disminuciones pueden ser indicios de inhibición de TRKB.

La evaluación puede comprender evaluar la actividad neuroprotectora. Como ejemplo, la supervivencia celular se puede evaluar en animales no humanos. Por ejemplo, las células ganglionares de la retina de roedores CGR (RGC por sus siglas en inglés) se utilizan a menudo para estudiar procesos neurodegenerativos asociados con la lesión axonal, así como para analizar terapias neuroprotectoras. Véase, p. ej., Nadal-Nicolás *et al.* (2009) Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 50(8):3860-3868. La supervivencia/viabilidad de las células ganglionares de la retina se puede evaluar (por ejemplo, en un modelo de transección completa del nervio óptico después de una lesión del nervio óptico) después del tratamiento con un reactivo dirigido a TRKB humana con respecto a un animal no humano de control. Por ejemplo, la supervivencia/viabilidad de las células ganglionares de la retina se puede evaluar en un modelo de transección completa del nervio óptico después de una lesión del nervio óptico. Véase, p. ej., Nadal-Nicolás *et al.* (2009) Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 50(8):3860-3868. Como otro ejemplo, la supervivencia/viabilidad de las células ganglionares de la retina se puede evaluar en un modelo de aplastamiento del nervio óptico. En este modelo, la lesión por aplastamiento del nervio óptico provoca una apoptosis gradual de las células ganglionares de la retina. Véase, por ejemplo, Tang *et al.* (2011) J. Vis. Exp. 50:2685. Se puede evaluar la supervivencia/viabilidad de las células ganglionares de la retina, por ejemplo, midiendo la densidad de las células ganglionares de la retina (por ejemplo, en retinas diseccionadas y teñidas para detectar células ganglionares de la retina). Una mayor supervivencia/viabilidad puede ser un indicio de activación de TRKB, mientras que la disminución de la supervivencia/viabilidad puede ser un indicio de inhibición de TRKB.

Si el reactivo dirigido a TRKB humana es un reactivo de edición genómica, la medición puede comprender la evaluación del locus *TRKB* humanizado con respecto a las modificaciones. 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, por ejemplo, el documento US 2005/0144655. También se puede utilizar para el cribado

5 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.

10 La evaluación en un animal no humano puede realizarse 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 (por ejemplo, el cerebro) o en células de múltiples ubicaciones dentro del tejido u órgano (por ejemplo, hipocampo y cuerpo estriado). 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

15 *TRKB* 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.

20 Si el reactivo está diseñado para inactivar el locus *TRKB* humanizado, afectar la expresión del locus *TRKB* humanizado o impedir la traducción del ARNm de *TRKB* humanizado, la medición puede comprender la evaluación del ARNm de *TRKB* humanizado o la expresión de la proteína. Esta medición puede realizarse dentro del cerebro o en tipos de células particulares (por ejemplo, neuronas tales como las células ganglionares de la retina).

#### 25 **IV. Métodos para producir animales no humanos que comprenden un locus *TRKB* humanizado**

Se proporcionan diversos métodos para producir un genoma de animal no humano, célula de animal no humano o animal no humano que comprende un locus *TRKB* humanizado como se divulga en otra parte del presente documento. Cualquier método o protocolo conveniente para producir un organismo modificado genéticamente es adecuado para

30 producir dicho animal no humano modificado genéticamente. Véase, p. ej., Cho et al. (2009) Current Protocols in Cell Biology 42:19.11:19.11.1-19.11.22 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 *TrkB* diana.

35 Por ejemplo, el método para producir un animal no humano que comprende un locus *TRKB* humanizado puede comprender: (1) modificar el genoma de una célula pluripotente para que comprenda el locus *TRKB* humanizado; (2) identificar o seleccionar la célula pluripotente modificada genéticamente que comprende el locus *TRKB* humanizado; (3) introducir la célula pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador de animal no humano; y (4) implantar y gestar el embrión hospedador en una madre subrogada. Por ejemplo, el método para producir un animal

40 no humano que comprende un locus *TRKB* humanizado puede comprender: (1) modificar el genoma de una célula pluripotente para que comprenda el locus *TRKB* humanizado; (2) identificar o seleccionar la célula pluripotente modificada genéticamente que comprende el locus *TRKB* humanizado; (3) introducir la célula pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador de animal no humano; y (4) gestar el embrión hospedador en una madre subrogada. Opcionalmente, el embrión hospedador que comprende una célula pluripotente modificada (por ejemplo,

45 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 *TRKB* humanizado.

Los métodos pueden comprender además identificar una célula o animal que tenga un locus genómico diana modificado. Se pueden usar diversos métodos para identificar células y animales que tienen una modificación genética

50 dirigida.

La etapa de modificar el genoma puede utilizar, por ejemplo, moldes de reparación exógenas (por ejemplo, vectores de direccionamiento) para modificar un locus *TrkB* para comprender un locus *TRKB* humanizado divulgado en el

55 presente documento. Como ejemplo, el vector de direccionamiento puede ser para generar un gen *TRKB* humanizado en un locus *TrkB* endógeno (por ejemplo, locus *TrkB* de animal no humano endógeno), en donde el vector de direccionamiento comprende un brazo de homología 5' que se dirige a una secuencia diana 5' en el locus *TrkB* endógeno y un brazo de homología 3' dirigido a una secuencia diana 3' en el locus *TrkB* endógeno. Los moldes de reparación exógenos también pueden comprender inserciones de ácido nucleico que incluyen segmentos de ADN

60 para integrarse en el locus *TrkB*. Integración de un inserto de ácido nucleico en el locus *TrkB* puede ser resultado además de una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TrkB*, la eliminación de una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TrkB* o el reemplazo de una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TrkB* (es decir, eliminación e inserción). Los brazos de homología pueden flanquear un ácido nucleico de inserto que comprende la secuencia de *TRKB* humana para generar el locus *TRKB* humanizado (por ejemplo, para eliminar un segmento del

65 locus *TrkB* endógeno y reemplazarlo con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga).

Las plantillas de reparación exógenas pueden ser para inserción mediada por unión de extremos no homólogos o para recombinación homóloga. Las plantillas de reparación exógenas pueden comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden tener forma lineal o circular. Por ejemplo, un molde de reparación puede ser un oligodesoxinucleótido monocatenario (ssODN).

5 Las plantillas de reparación exógenas también pueden comprender una secuencia heteróloga que no está presente en un locus *TrkB* endógeno no dirigido. Por ejemplo, un molde de reparación exógeno puede comprender un casete de selección, tal como un casete de selección flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa.

10 Algunos moldes de reparación exógenos comprenden brazos de homología. Si el ácido molde de reparación 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 molde de reparación exógeno. Los brazos de homología 5' y 3' corresponden a regiones dentro del locus *TrkB*, que se denominan en el presente documento "secuencia diana 5'" y "secuencia diana 3'", respectivamente.

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 molde de reparación exógeno puede ser cualquier grado de identidad de secuencia que permita que se produzca la recombinación homóloga. Por ejemplo, la cantidad de identidad de secuencia compartida por el brazo de homología del molde de reparación exógeno (o un fragmento del mismo) y la secuencia diana (o un fragmento de la misma) puede ser de 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. En algunos vectores de direccionamiento, la mutación prevista en el locus *TrkB* endógeno está incluida en un ácido nucleico de inserto flanqueado por los brazos de homología.

En células distintas de los embriones en fase unicelular, el molde de reparación exógeno puede ser un "vector de direccionamiento grande" o "LTVEC", que incluyen vectores de direccionamiento que comprenden brazos de homología que corresponden a y derivan de secuencias de un ácido nucleico más grandes que las usadas típicamente por otros enfoques destinados a realizar recombinación homóloga en células. Los LTVEC también incluyen vectores de direccionamiento que comprenden insertos de ácido nucleico que tienen secuencias de ácido nucleico más grandes que las usadas normalmente por otras estrategias destinadas a realizar recombinación homóloga en células. Por ejemplo, los LTVEC hacen posible la modificación de grandes locus que no pueden ser alojados por los vectores de direccionamiento tradicionales basados en plásmidos debido a sus limitaciones de tamaño. Por ejemplo, un locus dirigido puede ser (es decir, los brazos de homología 5' y 3' pueden corresponder a) un locus de la célula que no se puede someter a modificación dirigida utilizando un método convencional o que puede ser modificado únicamente de forma incorrecta o únicamente con una eficacia significativamente baja en ausencia de una muesca o rotura bicatenaria inducida por un agente nucleasa (por ejemplo, Proteína Cas). Los LTVEC pueden tener cualquier longitud y normalmente tienen al menos 10 kb de longitud. La suma total del brazo de homología 5' y el brazo de homología 3' en un LTVEC es normalmente de al menos 10 kb.

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.

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).

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, a través de recombinación mediante (a) introducción en la célula de uno o más ácidos nucleicos donantes exógenos (por ejemplo, vectores de direccionamiento) que comprenden un ácido nucleico de inserto flanqueado, por ejemplo, por brazos de homología 5' y 3' correspondientes a los sitios diana 5' y 3', en donde el ácido nucleico de inserto comprende una secuencia de *TRKB* humana para generar un locus *TRKB* humanizado; y (b) identificar al menos una célula que comprende en su genoma el ácido nucleico de inserto integrado en el locus *TrkB* endógeno (es decir, identificar al menos una célula que comprende el locus *TRKB* humanizado). 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 *TRKB* humanizado; y (b) identificar al menos una célula que comprende en su genoma el ácido nucleico de inserto integrado en el locus genómico diana.

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 bicatenaria en un sitio diana dentro del locus *TrkB* endógeno; y (ii) uno o más ácidos nucleicos donantes exógenos (por ejemplo, vectores de direccionamiento) que comprenden opcionalmente un ácido nucleico de inserto flanqueado por, por ejemplo, brazos de homología 5' y 3' correspondientes a sitios diana 5' y 3' ubicados en suficiente proximidad al sitio diana de nucleasa, en donde el ácido nucleico de inserto comprende una secuencia de *TRKB* humana para generar un locus *TRKB* humanizado; y (c) identificar al menos una célula que comprende en su genoma el ácido nucleico de inserto integrado en el locus *TrkB* endógeno (es decir, identificar al menos una célula que comprende el locus *TRKB* humanizado). 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 bicatenaria en un sitio de reconocimiento dentro del locus genómico diana; 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 al sitio de reconocimiento, en donde el ácido nucleico de inserto comprende el locus *TRKB* humanizado; y (c) identificar al menos una célula que comprende una modificación (por ejemplo, integración del ácido nucleico de inserto) en el locus genómico diana. Puede usarse cualquier agente nucleasa que induzca una mella o rotura bicatenaria en un sitio de reconocimiento deseado. 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)/asociadas a CRISPR (Cas) (por ejemplo, sistemas CRISPR/Cas9) o componentes de dichos sistemas (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Véase, p. ej., los documentos US 2013/0309670 y US 2015/0159175,

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 los EE.UU. N.º 7.294.754,

De manera alternativa, el 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 que comprenda el locus *TRKB* humanizado utilizando 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. De manera alternativa, el 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 que comprenda el locus *TRKB* humanizado utilizando los métodos descritos anteriormente para modificar células pluripotentes; (2) seleccionar el embrión modificado genéticamente; y (3) gestar el embrión modificado genéticamente en una madre subrogada. Se generan descendientes que pueden transmitir la modificación genética a través de la línea germinal.

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) enucleación de 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 los EE. UU. N.º 7.612.250.

Los diversos métodos proporcionados 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 *TRKB* humanizado. Se reconoce que dependiendo del método utilizado para generar el animal F0, el número de células dentro del animal F0 que tienen el locus *TRKB* 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.

Las células del animal F0 modificado genéticamente pueden ser heterocigotas para el locus *TRKB* humanizado o pueden ser homocigotas para el locus *TRKB* humanizado.

Si diferentes versiones de una secuencia están asociadas con un número de referencia en diferentes momentos, se entiende la versión asociada con el número de referencia en la fecha de entrada en vigor de presentación de esta solicitud. La fecha de entrada en vigor de presentación significa la primera entre la fecha de presentación real o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de referencia, si corresponde. Del mismo modo, si diferentes versiones de una publicación, sitio web o similares se publican en diferentes momentos, se entiende la versión publicada más recientemente en la fecha de entrada en vigor de presentación de la solicitud, a menos que se indique lo contrario.

### Breve descripción de las secuencias

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. Cuando se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos, se entiende que también se proporcionan variantes degeneradas de codones del mismo que codifican la misma secuencia de aminoácidos. 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 1. Descripción de Secuencias.**

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
1	Proteína	Proteína TRKB/NTRK2 de ratón (P15209-1; NP_001020245.1; NP_001269890.1)
2	Proteína	Proteína TRKB/NTRK2 de rata (Q63604-1; NP_036863.1)
3	Proteína	Proteína TRKB/NTRK2 humana (Q16620-4; NP_006171.2)
4	Proteína	Proteína TRKB/NTRK2 híbrida de ratón/humana
5	Proteína	Proteína TRKB/NTRK2 híbrida de rata/humana
6	ADN	ADNc de <i>TrkBIntrk2</i> de ratón (NM_001025074.2)
7	ADN	ADNc de <i>TrkBIntrk2</i> de rata (NM_012731.2)
8	ADN	ADNc de <i>TRKB/NTRK2</i> humana (AF410899.1)
9	ADN	CDS <i>TrkBIntrk2</i> de ratón (ID de CCDS CCDS26573.1)
10	ADN	CDS de <i>TrkBIntrk2</i> de rata
11	ADN	CDS de <i>TRKB/NTRK2</i> humana
12	ADN	CDS de <i>TRKB/NTRK2</i> de ratón/humana
13	ADN	CDS de <i>TRKB/NTRK2</i> de rata/humana
14	ADN	7138 hU Dir
15	ADN	Sonda 7138 hU (FAM)
16	ADN	7138hU Inv
17	ADN	7138 HD Dir
18	ADN	Sonda 7138 hD (Cal)

(continuación)

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
19	ADN	7138 hD Inv
20	ADN	7138U Dir
21	ADN	Sonda 7138U (FAM)
22	ADN	7138U Inv
23	ADN	7138D Dir
24	ADN	Sonda 7138D (Cal)
25	ADN	7138D Inv
26	ADN	rnoTU Dir
27	ADN	Sonda rnoTU (FAM)
28	ADN	rnoTU Inv
29	ADN	rnoTD Dir
30	ADN	Sonda rnoTD (Cal-Orange)
31	ADN	rnoTD Inv
32	ADN	rnoTM Dir
33	ADN	Sonda rnoTM (FAM)
34	ADN	rnoTM Inv
35	ADN	rnoTAU2 Dir
36	ADN	Sonda rnoTAU2 (FAM)
37	ADN	rnoTAU2 Inv
38	ADN	rnoTAD Dir
39	ADN	Sonda rnoTAD(Cal)
40	ADN	rnoTAD Inv
41	ADN	Diana de guía de rnoGU
42	ADN	Diana de guía de rnoGU2
43	ADN	Diana de guía de rnoGD
44	ADN	Diana de guía de rnoGD2
45	ADN	rnoTGU Dir
46	ADN	Sonda rnoTGU (FAM)
47	ADN	rnoTGU Inv
48	ADN	rnoTGD Dir
49	ADN	Sonda rnoTGD (Cal)
50	ADN	rnoTGD Inv
51	Proteína	Péptido señal de TRKB/NTRK2 de ratón
52	Proteína	Dominio extracelular de TRKB/NTRK2 de ratón
53	Proteína	Dominio transmembrana de TRKB/NTRK2 de ratón
54	Proteína	Dominio citoplasmático de TRKB/NTRK2 de ratón

(continuación)

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
55	Proteína	Péptido de señal de TRKB/NTRK2 de rata
56	Proteína	Dominio extracelular de TRKB/NTRK2 de rata
57	Proteína	Dominio transmembrana de TRKB/NTRK2 de rata
58	Proteína	Dominio citoplásmico de TRKB/NTRK2 de rata
59	Proteína	Péptido señal de TRKB/NTRK2 humana
60	Proteína	Dominio extracelular de TRKB/NTRK2 humana
61	Proteína	Dominio transmembrana de TRKB/NTRK2 humana
62	Proteína	Dominio citoplásmico de TRKB/NTRK2 humana
63	ADN	CDS de péptido señal de <i>TrkB/intrk2</i> de ratón
64	ADN	CDS de dominio extracelular de <i>TrkB/intrk2</i> de ratón
65	ADN	CDS de dominio transmembrana de <i>TrkB/intrk2</i> de ratón
66	ADN	CDS de dominio citoplásmico de <i>TrkB/intrk2</i> de ratón
67	ADN	CDS de péptido señal de <i>TrkB/intrk2</i> de rata
68	ADN	CDS de dominio extracelular de <i>TrkB/intrk2</i> de rata
69	ADN	CDS de dominio transmembrana de <i>TrkB/intrk2</i> de rata
70	ADN	CDS de dominio citoplasmático de <i>TrkB/intrk2</i> de rata
71	ADN	CDS de péptido señal de <i>TRKB/NTRK2</i> humana
72	ADN	CDS de dominio extracelular de <i>TRKB/NTRK2</i> humana
73	ADN	CDS de dominio transmembrana de <i>TRKB/NTRK2</i> humana
74	ADN	CDS de dominio citoplasmático de <i>TRKB/NTRK2</i> humana
75	Proteína	Proteína TRKB/NTRK2 humana (Q16620-1; NP_001018074.1)
76	ADN	ADNc de <i>TRKB/NTRK2</i> humana (NM_001018064.2)
77	ADN	CDS de <i>TRKB/NTRK2</i> humana (ID de CCDS CCDS35050.1)
78-125	ADN/Proteína	Regiones variables de cadena pesada y ligera y CDR de anticuerpos anti-TRKB seleccionados en la <b>Tabla 22</b> y la <b>Tabla 23</b>

## Ejemplos

### Referencia

5

#### Ejemplo 1. Generación de ratones que comprende un locus *TRKB* humanizado

Un vector de direccionamiento grande (LTVEC) que comprende un brazo de homología 5' que comprende 41,6 kb del locus *TrkB* de ratón y un brazo de homología 3' que comprende 62,4 kb del locus de *TrkB* de ratón se generó para reemplazar una región de 65,7 kb del gen *TrkB* de ratón que codifica el dominio extracelular de TRKB de ratón con 74,4 kb de la secuencia humana correspondiente de *TRKB*. Se proporciona información sobre TRKB de ratón y humana en la **Tabla 2**. Se proporciona una descripción de la generación del vector de direccionamiento grande en la **Tabla 3**. Se describe la generación y el uso de vectores de direccionamiento grandes (LTVEC) derivados del ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) mediante reacciones de recombinación homóloga bacteriana (BHR) utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE®, por ejemplo, en el documento US 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) Nat. Biotechnol. 21(6):652-659. Se describe la generación de LTVEC a través de métodos de ensamblaje *in vitro*, por ejemplo, en los documentos US 2015/0376628 y WO 2015/200334.

Tabla 2. TRKE/INTRK2 de ratón y humana.

	Símbolo oficial	ID del gen de NCBI	Fuente principal	ID de ARNm de RefSeq	ID de UniProt	Ensamblaje genómico	Ubicación
Ratón	Ntrk2	18212	MGI:97384	NM_001025074	P15209	GRChm38/mm10	Cr 13: 58.806.569-59.133.970 (+)
Ser humano	Ntrk2	4915	HGNC:8032	AF410899	Q16620	GRCh38/hg38	Cr 9: 84.669.778 - 85.027.070 (+)

Tabla 3. Vector de direccionamiento grande de *TrkB*/*Intrk2* de ratón.

	Construcción del genoma	Inicio	Final	Longitud (pb)
Brazo de ratón 5'	GRCm38/mm10	Cr13: 58.767.209	Cr13: 58.808.821	41.613
Inserto humano	GRCh38/hg38	Cr9: 84.670.730	Cr9: 84.745.139	74.409
Brazo de ratón 3'	GRCm38/mm10	Cr13: 58.874.563	Cr13: 58.936.986	62.424

Específicamente, una región que comienza en el exón 2 (exón codificante 1; desde el aminoácido 32, conservando el péptido señal) hasta el exón 10, incluyendo los primeros 137 pares de bases del intrón 10 y todos los intrones entre los exones 2 y 10 (es decir, entre el exón codificante 1 y el exón 10) se eliminó del locus *TrkB* de ratón (conservando el dominio transmembrana del ratón codificado por los exones 10 y 11). Una región que incluye el exón 2/exón codificante 1 (desde el aminoácido 32, comenzando después del péptido señal) hasta el exón 10, incluyendo los primeros 177 pares de bases del intrón 10 y todos los intrones entre los exones 2 y 10 (es decir, entre el exón codificante 1 y el exón 10) se insertó en lugar de la región de rata eliminada (conservando el dominio transmembrana de rata codificado por los exones 10 y 11).

Se exponen secuencias del péptido señal de TRKB de ratón, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático en las SEQ ID NO: 51-54, respectivamente, con la secuencia codificante correspondiente expuesta en las SEQ ID NO: 63-66, respectivamente. Se exponen secuencias del péptido señal de TRKB humana, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático en las SEQ ID NO: 59-62, respectivamente, con las secuencias codificantes correspondientes expuestas en las SEQ ID NO: 71-74, respectivamente. La proteína TRKB química codificada esperada tiene dominios intracelular y transmembrana de TRKB de ratón, un péptido señal TRKB de ratón y un dominio extracelular de TRKB humana. Véase la **Figura 1**. Una alineación de las proteínas TRKB de ratón y humana en la **Figura 6**. Las secuencias codificantes de *TrkB*/*TRKB* de ratón y humana se exponen en las SEQ ID NO: 9 y 11, respectivamente. Las secuencias de proteínas TRKB de ratón y humana se exponen en las SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente. Las secuencias para la secuencia codificante de *TRKB* de ratón/humana y la proteína TRKB de ratón/humana química esperada se exponen en las SEQ ID NO: 12 y 4, respectivamente.

Para generar el alelo mutante, el vector de direccionamiento grande se introdujo en células madre embrionarias de ratón F1H4. Después de la selección de antibióticos, se seleccionaron colonias, se expandieron y se cribaron mediante TAQMAN®. Véase la **Figura 2**. Se realizaron ensayos de pérdida de alelo para detectar la pérdida del alelo endógeno de rata, y se realizaron ensayos de ganancia de alelo para detectar la ganancia del alelo humanizado utilizando los cebadores y sondas expuestos en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ensayos de cribado.

Ensayo	Descripción	Cebador/Sonda	Secuencia
7138 hU	Inserción humana en dirección 5'	Dir	AGGTGGGTAGGTCCTGGAAGTG (SEQ ID NO: 14)
		Sonda (FAM)	AATGCTGTCCCAAGAGTGGG (SEQ ID NO: 15)
		Inv	GTCCTGCATCCCTTGTCTTTG (SEQ ID NO: 16)
7138 hD	Inserción humana en dirección 3'	Dir	ATGTGGGCGTTGTGCAGTCTC (SEQ ID NO: 17)
		Sonda (Cal)	CGCTGCAGTGCATTGAACTCAGCA (SEQ ID NO: 18)
		Inv	CTGTGGAGGGACGTGACCAG (SEQ ID NO: 19)
7138U	LOA de ratón en dirección 5'	Dir	TCCGCTAGGATTTGGTGTACTG (SEQ ID NO: 20)
		Sonda (FAM)	AGCCTTCTCCAGGCATCGTGGCAT (SEQ ID NO: 21)
		Inv	TCCGGGTCAACGCTGTTAG (SEQ ID NO: 22)
7138D	LOA de ratón en dirección 3'	Dir	TCCTGCGAGGGTTCTGAC (SEQ ID NO: 23)
		Sonda (Ca)	TGGTGCTCATATGCCAGAGAAATTGTCA (SEQ ID NO: 24)
		Inv	CGATCTGTGATGGCCTGCTTAC (SEQ ID NO: 25)

Se describen ensayos de modificación de alelo (MOA), incluidos ensayos de pérdida de alelo (LOA) y ganancia de alelo (GOA), por ejemplo, en los documentos US 2014/0178879; US 2016/0145646; WO 2016/081923; y Frendewey et al. (2010) *Methods Enzymol.* 476:295-307. El ensayo de pérdida de alelo (LOA) invierte la lógica de detección convencional y cuantifica el número de copias en una muestra de ADN genómico del locus nativo al que se dirigió la mutación. En un clon celular heterocigoto dirigido correctamente, el ensayo de LOA detecta uno de los dos alelos nativos (para genes que no están en el cromosoma X o Y), alterándose el otro alelo por la modificación diana. El

mismo principio se puede aplicar a la inversa como un ensayo de ganancia de alelo (GOA) para cuantificar el número de copias del vector de direccionamiento insertado en una muestra de ADN genómico.

Se generaron ratones F0 utilizando el método VELOCIMOUSE®. Véase, p. ej., el documento US 7.576.259; el documento US 7.659.442; US 7.294.754; el documento US 2008/0078000; y Poueymirou *et al.* (2007) Nat. Biotechnol. 25(1):91-99,

En el método de VELOCIMOUSE®, se inyectan células madre embrionarias (ES) de ratón específicas mediante inyección asistida por láser en embriones en fase previa a la mórula, por ejemplo, embriones en fase de ocho células, lo que produce de manera eficiente ratones de generación F0 que son totalmente derivados de células ES. Todos los experimentos realizados en ratones TRKB humanizados como se describe a continuación se realizaron en ratones en los que el casete de selección de autoeliminación se autoeliminó.

## Referencia

**Ejemplo 2. Comparación *in vivo* del efecto de los anticuerpos H4H9816 y REGN1945 de control de isotipo sobre el peso corporal y el metabolismo en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> (MAID7139)**

## Procedimiento experimental

Para determinar el efecto de un anticuerpo agonista de TRKB, H4H9816P2, sobre el peso y la composición corporal, se realizó un estudio metabólico de ratones homocigotos para la expresión del receptor TRKB humano en lugar del receptor TRKB de ratón (ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>) después de una única inyección subcutánea de anticuerpos. Estos estudios se realizaron en parte basándose en estudios previos de agonistas de TrkB y ratones inactivados para TrkB. Véase, p. ej., Lin *et al.* (2008) PLoS ONE 3(4):e1900; Rios *et al.* (2013) Trends in Neurosciences 36(2):83-90; y Zorner *et al.* (2003) Biol. Psychiatry 54:972-982. En primer lugar se transfirieron ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> (machos, 20 semanas de edad) de una jaula grupal a una jaula individual durante dos semanas de aclimatación. Después de este período, los ratones se transfirieron a jaulas metabólicas (CLAMS, Columbus Instruments) para evaluar los cambios en el consumo de alimentos y agua, la locomoción, el gasto de energía y la respiración después de la administración de anticuerpos. La comida en polvo regular se almacenó en una cámara en el suelo sobre una báscula accionada por muelle (Mettler Toledo, PL602E) para medir el consumo de alimentos a través de cambios en el peso total del pienso. Se podía acceder al agua a través de un pico en la parte superior de la jaula y la ingesta se midió mediante el seguimiento de los cambios en el volumen de la línea de bomba (Oxymax®/Unidad de líquidos CLAMS). Las jaulas metabólicas CLAMS midieron cada uno de estos parámetros en intervalos continuos, de 16-18 minutos durante la duración del estudio. Los datos metabólicos se analizaron en medidas individuales y se resumieron en intervalos de 24 horas que contenían un ciclo completo de luz y oscuridad utilizando el software OXYMAX®/CLAMS (Columbus instruments, v5.35). Después de aclimatación a las jaulas durante dos semanas, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> recibieron una dosis subcutánea única de 50 mg/kg de un anticuerpo agonista de TRKB, H4H9816P2, o un anticuerpo de control de isotipo IgG4 en PBS a pH 7,2. Un grupo de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> de control sin tratamiento previo no recibieron una inyección. Los ratones se pesaron inmediatamente antes de la dosificación y 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosificación. Con el fin de medir la composición corporal de cada ratón, se realizó una Relajometría por Resonancia Magnética Nuclear, también conocida como Resonancia Magnética Cuantitativa, utilizando un Analizador EchoMRI™-500 (EchoMRI LLC). Antes de la dosificación, los ratones se colocaron en un soporte de plástico transparente y se insertaron en el dispositivo de RMN-IRM para medir la masa magra, la masa grasa y el estado de hidratación de cada sujeto. Las mediciones se realizaron en el transcurso de 0,5-3,2 minutos por ratón y se volvieron a tomar aproximadamente 120 horas después de la dosificación.

## Resultados y conclusiones

Se realizó un control diario del peso corporal para determinar si una única inyección subcutánea de H4H9816P2 induce la pérdida de peso en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>. Antes de la dosificación, no hubo diferencias significativas en el peso corporal promedio de los tres grupos de tratamiento, ya que cada uno tenía un peso corporal promedio antes de la dosis de 28,39 - 29,85 g (**Tabla 5**). 48 horas después de la dosificación, sin embargo, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 perdieron un promedio de 1,70 g o el 5,96 % de su peso corporal antes de la dosis. Al mismo tiempo, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con anticuerpos de control de isotipo y sin tratamiento previo ganaron entre el 1,79-2,37 % de su peso corporal antes de la dosis. Los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 continuaron perdiendo peso durante todo el transcurso del estudio, y 72 y 96 horas después de la dosificación, estos ratones habían perdido un promedio del 8,42 % y el 11,80 % de su peso corporal antes de la dosis, respectivamente. 120 horas después de la dosificación, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 habían perdido un promedio del 12,67 % de su peso corporal antes de la dosis. Por el contrario, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con control de isotipo y sin tratamiento previo no presentaron ninguna pérdida del peso corporal antes de la dosis durante todo el estudio. Como el peso corporal en los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 se redujo significativamente con respecto a los controles sin tratamiento previo y de isotipo 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosis, se determinó que el anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 indujo una pérdida de peso corporal significativa en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>.

**Tabla 5. Peso corporal de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> después de la dosificación con anticuerpo agonista de TRKB**

## H4H9816P2.

Grupo experimental	Peso corporal medio antes de la dosis (g) ( $\pm$ SD)	Peso corporal medio (g) 24 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Peso corporal medio (g) 48 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Peso corporal medio (g) 72 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Peso corporal medio (g) 96 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Peso corporal medio (g) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
	Porcentaje de cambio con respecto al peso corporal antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Porcentaje de cambio con respecto al peso corporal antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Porcentaje de cambio con respecto al peso corporal antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Porcentaje de cambio con respecto al peso corporal antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Porcentaje de cambio con respecto al peso corporal antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Porcentaje de cambio con respecto al peso corporal antes de la dosis ( $\pm$ SD)
Sin tratamiento previo (n = 3)	28,85 (+/- 0,81)	29,69 (+/- 0,97)	29,36 (+/- 1,10)	29,32 (+/- 1,29)	29,29 (+/- 1,10)	28,88 (+/- 1,04)
	N/A	+2,91 % (+/- 0,62)	+1,79 % (+/- 1,62)	+1,65 % (+/- 2,24)	+1,54 % (+/- 1,22)	+0,10 % (+/- 1,05)
Control de isotipo (n = 4)	29,21 (+/- 2,68)	30,27 (+/- 2,51)	29,90 (+/- 2,63)	30,08 (+/- 2,69)	29,87 (+/- 2,52)	29,69 (+/- 2,68)
	N/A	+3,61 % (+/- 1,68)	+2,37 % (+/- 1,50)	+2,98 % (+/- 1,09)	+2,25 % (+/- 1,56)	+1,65 % (+/- 0,81)
H4H9816P2 (n = 4)	28,39 (+/- 1,35)	27,87 (+/- 1,29)	26,69 (+/- 0,87)	26,00* (+/- 0,98)	25,04** (+/- 1,03)	24,79** (+/- 1,36)
	N/A	-1,83 % (+/- 0,56)	-5,96 % (+/- 1,88)	-8,42 % (+/- 1,85)	-11,80 % (+/- 1,52)	-12,67 % (+/- 1,66)

Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA bidireccional con el ensayo a posteriori de comparación múltiple de Tukey (\*= p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, \*\*\*\* = p < 0,0001, en comparación con el grupo de control de isotipo: Ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> a los que se les administró anticuerpo contra control de isotipo 50 mg/kg.

El efecto de la inyección de anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 sobre la composición corporal también se midió realizando RMN-IRM en cada sujeto antes y después de la dosificación. Antes de la dosificación, ninguno de los tres grupos de tratamiento de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> presentó diferencias significativas en la masa grasa o masa magra, ya que cada grupo tenía un promedio de 4,19 - 4,75 g de masa grasa y 21,32 - 21,70 g de masa magra (Tabla 6). Después de la administración de anticuerpos, sin embargo, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> que recibieron dosis de H4H9816P2 perdieron un promedio del 48,90 % de su masa grasa corporal total durante el transcurso del estudio (Tabla 6). Los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> sin tratamiento previo y tratados con anticuerpo de control de isotipo perdieron un promedio del 8,49 % y el 9,48 % de su masa grasa antes de la dosis, respectivamente, que fue significativamente inferior que en los sujetos tratados con H4H9816P2 (Tabla 6). Asimismo, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 perdieron un promedio del 7,84 % de su masa magra durante todo el estudio, lo que fue significativamente superior al 2,41 % y al 1,75 % de la masa magra promedio antes de la dosis perdida por los grupos sin tratamiento previo y tratados con anticuerpo de control de isotipo, respectivamente (Tabla 6). Por ende, la pérdida de peso corporal descrita podría explicarse por una pérdida significativa de masa grasa y una pérdida modesta de masa magra después de la inyección del anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>.

**Tabla 6: Composición corporal de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> después de la dosificación con anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2.**

Grupo experimental	Masa grasa media antes de la dosis (%) ( $\pm$ SD)	Masa grasa media (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Cambio medio de masa grasa (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Masa magra media antes de la dosis (%) ( $\pm$ SD)	Masa magra media (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Cambio medio de masa magra (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
Sin tratamiento previo (n = 3)	4,65 (+/- 0,32)	4,27 (+/- 0,55)	-8,49 (+/- 7,18)	21,45 (+/- 0,79)	20,94 (+/- 0,98)	-2,41 (+/- 1,81)
Control de isotipo (n = 4)	4,75 (+/- 2,98)	4,40 (+/- 2,98)	-9,48 (+/- 6,00)	21,70 (+/- 0,50)	21,32 (+/- 0,35)	-1,75 (+/- 0,98)

(continuación)

Grupo experimental	Masa grasa media antes de la dosis (%) ( $\pm$ SD)	Masa grasa media (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Cambio medio de masa grasa (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Masa magra media antes de la dosis (%) ( $\pm$ SD)	Masa magra media (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Cambio medio de masa magra (%) 120 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
H4H9816P2 (n = 4)	4,19 (+/- 1,15)	2,14 (+/- 0,64)	-48,90**** (+/- 5,06)	21,32 (+/- 1,87)	19,64 (+/- 1,69)	-7,84*** (+/- 0,94)
Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA bidireccional de Kruskal-Wallis con el ensayo a posteriori de comparación múltiple de Tukey (* = $p < 0,05$ , ** = $p < 0,01$ , *** = $p < 0,001$ , **** = $p < 0,0001$ , en comparación con el grupo de control de isotipo: Ratones TrkB <sup>hu/hu</sup> a los que se les administró anticuerpo contra control de isotipo 50 mg/kg.						

Además de evaluar los efectos de la inyección del anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 sobre el peso y la composición corporal en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>, la alimentación, la bebida y la actividad locomotora se midieron de forma continua mediante jaulas metabólicas. Antes de la dosificación, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> consumieron un promedio de 3,49 - 3,73 g de pienso al día. Dentro de las 24 horas posteriores a la dosificación, sin embargo, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 redujeron significativamente su ingesta de alimentos a 2,20 g de alimento por día. El nivel promedio de ingesta de alimentos en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 no superó los 2,49 g de pienso por día durante el resto del estudio, mientras que los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> sin tratamiento previo y tratados con anticuerpo de isotipo consumieron uniformemente un promedio de 3,62 - 4,07 g de pienso por día (Tabla 7).

De forma similar, no hubo diferencias significativas en el consumo diario de agua entre los grupos de tratamiento antes de la dosificación. Los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> consumieron un promedio de 4,67 - 5,55 ml de agua por día en cada grupo de tratamiento (Tabla 8). Después de la dosificación, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 redujeron su consumo de agua a 2,05 - 3,24 ml de agua por día. Esto fue significativamente inferior que en los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> sin tratamiento previo y tratados con anticuerpo de control de isotipo, que consumieron uniformemente 4,50 - 5,77 ml de agua por día durante todo el estudio (Tabla 8). Por lo tanto, la inyección del anticuerpo agonista de TRKB, H4H9816P2, pareció dar como resultado una reducción significativa de la ingesta de alimentos y agua en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> con respecto a controles tanto sin tratamiento previo como de isotipo.

**Tabla 7: Consumo de alimento de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> después de la dosificación con anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2.**

Grupo experimental	Ingesta de alimento total media (g) 0-24 horas antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de alimento total media (g) 0-24 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de alimento total media (g) 24-48 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de alimento total media (g) 48-72 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de alimento total media (g) 72-96 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
Sin tratamiento previo (n = 3)	3,51 (+/- 0,53)	3,98 (+/- 0,08)	3,76 (+/- 0,19)	3,62 (+/- 0,35)	3,91 (+/- 0,18)
Control de isotipo (n = 4)	3,73 (+/- 0,48)	4,07 (+/- 0,23)	3,99 (+/- 0,17)	3,89 (+/- 0,22)	3,80 (+/- 0,22)
H4H9816P2 (n = 4)	3,49 (+/- 1,07)	2,20**** (+/- 0,16)	2,08**** (+/- 0,36)	2,18**** (+/- 0,37)	2,49*** (+/- 0,47)
Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA bidireccional de Kruskal-Wallis con el ensayo a posteriori de comparación múltiple de Tukey (* = $p < 0,05$ , ** = $p < 0,01$ , *** = $p < 0,001$ , **** = $p < 0,0001$ , en comparación con el grupo de control de isotipo: Ratones TrkB <sup>hu/hu</sup> a los que se les administró anticuerpo contra control de isotipo 50 mg/kg.					

**Tabla 8: Consumo de agua de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> después de la dosificación con anticuerpo agonista de TrkB H4H9816P2.**

Grupo experimental	Ingesta de agua total media (ml) 0-24 horas antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 0-24 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 24-48 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 48-72 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 72-96 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
Sin tratamiento previo (n = 3)	4,79 (+/- 0,21)	5,42 (+/- 0,94)	4,96 (+/- 0,91)	4,57 (+/- 0,56)	4,88 (+/- 0,32)

(continuación)

Grupo experimental	Ingesta de agua total media (ml) 0-24 horas antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 0-24 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 24-48 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 48-72 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Ingesta de agua total media (ml) 72-96 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
Control de isotipo (n = 4)	5,55 (+/- 1,23)	4,50 (+/- 1,08)	5,08 (+/- 1,39)	5,09 (+/- 1,10)	5,77 (+/- 1,62)
H4H9816P2 (n = 4)	4,67 (+/- 1,13)	2,25** (+/- 0,55)	3,24* (+/- 1,10)	2,05*** (+/- 0,29)	2,25**** (+/- 0,24)

Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA bidireccional de Kruskal-Wallis con el ensayo a posteriori de comparación múltiple de Tukey (\*= p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, \*\*\*\* = p < 0,0001, en comparación con el grupo de control de isotipo: Ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> a los que se les administró anticuerpo contra control de isotipo 50 mg/kg.

Para determinar los efectos del tratamiento con anticuerpos sobre la actividad, se analizó la locomoción mediante el software OXYMAX®/CLAMS (Columbus Instruments, v5.35), que midió de forma continua el número total de deambulaciones en el plano X de cada ratón. Un ratón mostró hiperactividad antes de la dosificación y se eliminó del análisis estadístico después de la dosis. Aunque los sujetos sin tratamiento previo y tratados con anticuerpos de isotipo registraron uniformemente un promedio de 11 000 - 15 000 ambulaciones por día durante todo el estudio, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 registraron 28.260 deambulaciones entre 24 y 48 horas después de la dosis, y registraron 21.193 y 27.028 deambulaciones entre 48-72 y 72-96 horas después de la dosis, respectivamente (Tabla 9). Los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> tratados con H4H9816P2 registraron más recuentos totales de deambulación en cada punto temporal después de la administración de anticuerpos, lo que sugiere que la hiperactividad es un efecto adicional de la inyección de H4H9816P2. En combinación, estos efectos sugieren que una única inyección subcutánea del anticuerpo agonista de TRKB, H4H9816P2, indujo cambios significativos en el peso corporal, la composición corporal, el metabolismo y la locomoción en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>.

**Tabla 9: Locomoción de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> después de la dosificación con anticuerpo agonista de TrkB H4H9816P2.**

Grupo experimental	Deambulaciones totales medias (recuentos) 0-24 horas antes de la dosis ( $\pm$ SD)	Deambulaciones totales medias (recuentos) 0-24 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Deambulaciones totales medias (recuentos) 24-48 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Deambulaciones totales medias (recuentos) 48-72 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)	Deambulaciones totales medias (recuentos) 72-96 horas después de la dosis ( $\pm$ SD)
Sin tratamiento previo (n = 3)	16562 (+/- 3380)	14692 (+/- 2792)	14387 (+/- 6126)	13279 (+/- 3607)	12525 (+/- 4121)
Control de isotipo REGN1945 (n = 4)	18105 (+/- 4085)	13380 (+/- 2730)	13049 (+/- 3376)	11371 (+/- 2552)	11468 (+/- 2088)
H4H9816P2 (n = 4)	13292 (+/- 5294)	16575 (+/- 6836)	28260 (+/- 19874)	21193 (+/- 6668)	27028* (+/- 10969)

Se indica la significancia estadística determinada mediante ANOVA bidireccional de Kruskal-Wallis con el ensayo a posteriori de comparación múltiple de Tukey (\*= p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, \*\*\*\* = p < 0,0001, en comparación con el grupo de control de isotipo: Ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> a los que se les administró anticuerpo contra control de isotipo 50 mg/kg.

Referencia

**Ejemplo 3. Comparación *in vivo* del efecto del anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 y el control de isotipo IgG4 REGN1945 sobre la fosforilación de TRKB en el cerebro después de una inyección estereotáctica en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> (MAID 7139)**

### Procedimiento experimental

La tirosina quinasa receptora B (TRKB) se activa a través de la unión de su ligando factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el dominio del receptor extracelular, lo que induce la dimerización y autofosforilación de restos de tirosina en el dominio receptor intracelular y la activación posterior de las vías de señalización citoplasmática. Véase, p. ej., Haniu *et al.* (1997) J. Biol. Chem. 272(40):25296-25303 y Rogalski *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275(33):25082-

25088. Con el fin de determinar el efecto de un anticuerpo agonista de TRKB, H4H9816P2, sobre la cinética de activación de TRKB, se realizó un estudio temporal de la fosforilación de TRKB después de una inyección directa en el hipocampo en ratones homocigotos para un receptor TRKB quimérico de ratón/humano en el que el dominio extracelular se ha humanizado (MAID 7139) (denominados ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>). Los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> (N = 48) recibieron inyecciones estereotáxicas bilaterales de 2 µl de cualquiera de vehículo (PBS), REGN1945 indicado en el presente documento como anticuerpo de control del isotipo IgG4 (concentración final de 27,5 mg/ml) o anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 (concentración final de 27,5 mg/ml) en el hipocampo, -2 mm posterior y +1,5 mm lateral al bregma. Con el fin de minimizar el daño tisular, la inyección y la extracción de la aguja se realizaron gradualmente en intervalos de 5 minutos. Después, los ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> se sacrificaron con eutanasia por CO<sub>2</sub> aproximadamente 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 18 horas después de la inyección. Se realizó una hemorragia terminal a través de punción cardíaca para recoger sangre y después se perfundió a los ratones por vía transcardíaca con solución salina heparinizada fría. El cerebro se extrajo cuidadosamente del cráneo y se disecó una sección de 2 mm<sup>3</sup> de tejido que rodeaba el sitio de la inyección, se recogió en un tubo Eppendorf y se almacenó en hielo. Después, la sección de cerebro se lisó en 300 µl de tampón de lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 89901) que contenía 2x inhibidores de proteasa y fosfatasa (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 78444) y se almacenó en hielo. Después, el tejido lisado se homogeneizó para su posterior procesamiento, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

Para evaluar la fosforilación de TRKB en el tejido cerebral, se realizó inmunoprecipitación y transferencia Western. El anticuerpo anti-TRKB humano H4H10108N que no compite por la unión con H4H9816P2 se acopló a perlas de Sefarosa activadas por NHS (preparadas utilizando el protocolo del fabricante; GE Healthcare, N.º de cat. 17-0906) y se lavó con DPBS tres veces para retirar cualquier solución de conservación residual. Los lisados cerebrales homogeneizados se descongelaron en hielo y se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml (peso de cerebro con respecto a volumen de tampón) en un tampón compuesto por NP-40 al 1 %, Tween-20 al 0,1 %, inhibidores de proteasas y fosfatasas en TBST. La concentración de proteína del lisado cerebral homogeneizado se cuantificó realizando un ensayo BCA convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific Pierce, N.º de cat. 23225). Por cada 100 µg de proteína, se añadieron 15 µl de perlas de Sefarosa activadas por NHS del anticuerpo anti-TRKB humano (H4H10108N) a la solución de lisado cerebral y la mezcla se incubó durante la noche a 4 °C con agitación suave a 20 rpm (rotador Thermo). El día siguiente, las muestras se centrifugaron a 1000 × g durante un minuto y después el sobrenadante se retiró cuidadosamente. Posteriormente, las perlas se lavaron dos veces con 400 µl de solución salina tamponada con Tris (Bio-Rad, N.º de cat. 1706435) con Tween-20 al 1 % (Sigma Aldrich, N.º de cat. P9416) (TBST). Después de aspirar cuidadosamente el tampón de lavado, se añadieron 60 µl de ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA; Sigma-Aldrich, T62200) en agua a pH 3,0 a cada muestra. La solución se mezcló y se dejó reposar durante dos minutos antes de recogerla y transferirla a un tubo separado. Este proceso se repitió con otros 60 µl de TFA al 0,1 % a pH 3,0. Después, las dos soluciones de TFA al 0,1 % para cada muestra se combinaron y se añadieron 2 µl de Tris-HCl 1M (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 15567-027), a pH 8,5.

La solución se secó utilizando un vacío rápido y después se resuspendió y se redujo con una mezcla de 20 µl de tampón Laemmli 1X (Bio-Rad, N.º de cat. 1610737) más 2-mercaptoetanol 355 nM (BME; Gibco, N.º de cat. 21985-023). Las muestras se hirvieron a 95 °C durante 10 minutos y se cargaron en un recipiente de 10 pocillos, Gel Mini-Protean 4-15 % Tris-Glicina (Bio-Rad, N.º de cat. 4561086). Después de la electroforesis, las muestras de proteínas se transfirieron del gel de Tris-Glicina a una membrana de PVDF (Bio-Rad, N.º de cat. 170-4156) a través del sistema de transferencia Turbo Trans-Blot (Bio-Rad, N.º de cat. 1704156) en el transcurso de 30 minutos a una velocidad constante de 1,3 A y 25 V. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche al 2,5 % (Bio-Rad, N.º de cat. 170-6406) en TBST durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se sondeó durante la noche con un anticuerpo anti-fosfo-TRKB (Novus, N.º de cat. NB100-92656) diluido 1:1000 en una solución de BSA al 2,5 % o anticuerpo anti-TRKB primario (Cell Signaling, N.º de cat. 4603) diluido a 1:1000 en TBST de leche al 2,5 % a 4 °C en un agitador a 30 rpm. El día siguiente, las transferencias se lavaron con TBST y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson, N.º de cat. 111-035-144) a 1:1000 en leche al 1 % en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las transferencias se lavaron nuevamente, se revelaron con solución de ECL (PerkinElmer, Inc., N.º de cat. RPN2106) y se tomaron exposiciones de imágenes posteriores cada 30 segundos.

### Resultados y conclusiones

La inmunoprecipitación y la posterior transferencia Western de proteína derivada de lisados de cerebro de ratón TrkB<sup>hu/hu</sup> demostraron que la fosforilación de TRKB en el hipocampo era detectable en ratones inyectados con un anticuerpo agonista de TRKB, H4H9816P2, pero no en ratones tratados con vehículo o anticuerpo de control de isotipo, como se muestra en la **Figura 3**. Entre los puntos temporales evaluados, la fosforilación de TRKB alcanzó su punto máximo 4 horas después de la inyección estereotáxica en ratones a los que se les administró H4H9816P2. La fosforilación de TRKB también se detectó mediante transferencia Western 18 horas después de la administración en algunos ratones, pero no en todos. Por el contrario, la inyección de vehículo y anticuerpo de control de isotipo IgG4 no indujo la fosforilación de TRKB en ningún punto temporal. La transferencia Western también indicó que los niveles totales del receptor TRKB estaban regulados negativamente en algunos ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>, pero no en todos, tratados con H4H9816P2 con respecto a los ratones tratados con vehículo y control de isotipo. Los niveles totales de TRKB parecían estar ligeramente regulados negativamente en los sujetos tratados con H4H9816P2 18 horas después de la dosificación. Por lo tanto, estos resultados indican que la inyección directa del anticuerpo agonista de TRKB,

H4H9816P2, induce la fosforilación de los receptores TRJB del hipocampo en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>.

#### Referencia

- 5 **Ejemplo 4. Activación de vías de señalización corriente abajo por anticuerpos agonistas de TrkB en neuronas corticales primarias de ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> el día 1 después del nacimiento**

#### *Procedimiento experimental*

- 10 Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración ARVO para el uso de animales en investigaciones oftálmicas y de la visión y el IACUC de Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Se aislaron y cultivaron neuronas corticales primarias de ratón a partir de ratones TrkB humanizados (MAID 7139). Véase, p. ej., Beaudoin *et al.* (2012) Nat. Protoc. 7(9):1741-1754. Se realizaron transferencias Western para determinar los efectos de los anticuerpos agonistas de TrkB sobre las vías corriente abajo de Akt y Erk (p-Akt, p-Erk1/2). Se cultivaron neuronas corticales primarias de crías de ratón TrkB humanizadas el día 1 después del nacimiento (P1) durante 4 días (DIV-4) en Medio basal NeuralQ (Global Stem, N.º de cat. GSM-9420) suplementado con el Suplemento Neural GS21 (Global Stem, N.º de cat. GSM-3100), Glutamax (Invitrogen, N.º de cat. 35050-061) y Penicilina/Estreptomicina. Las células se trataron con el anticuerpo agonista de TrkB H4H9816P-L1 (10 µg/ml), anticuerpo agonista de TrkB H4H9780P-L1 (10 µg/ml), anticuerpo agonista de TrkB H4H9814P-L1 (10 µg/ml), control de isotipo de IgG4 REGN1945 (10 µg/ml), anticuerpo de control H1M8037C-L1 (10 µg/ml) o BDNF (1 µg/ml), durante de 15 minutos o 2 horas. Se realizaron transferencias Western para determinar si los agonistas tienen una diferencia en el mantenimiento y la intensidad de la señalización corriente abajo. Las células tratadas se aclararon y rasparon en PBS frío que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa al 1 % (Sigma). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Pierce). Las muestras (50 µg) se separaron mediante SDS-PAGE en geles reducidos de Tris-acetato al 3-8 % (Novex) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad).

- La membrana se incubó durante 1 hora en una solución de bloqueo que contenía leche al 5 % y Tween-20 al 0,1 %, pH 7,6. A esto le siguió una incubación durante la noche a 4 °C en el tampón de bloqueo que contenía BSA al 5 %, Tween-20 al 0,1 % y anti-fosfoTrk de conejo (Cell Signaling, N.º de cat. 9141, 1:500), anti-fosfo-Akt de conejo (Cell Signaling, N.º de cat. 9271, 1:1000) o anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 de conejo (Sigma, N.º de cat. E7028, 1:5000). Posteriormente, las proteínas marcadas se visualizaron mediante incubación con un conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-IgG de cabra, ratón o conejo seguido de revelado con un sustrato de quimioluminiscencia para HRP (Pierce). Para determinar las cantidades totales de TrkB, MAPK o Akt presentes en cada calle, se extrajeron los anticuerpos de las membranas de nitrocelulosa en tampón de extracción (Pierce) durante 20 minutos y se incubaron con anticuerpo anti-TrkB de conejo (Cell Signaling, N.º de cat. 4603, 1:1000), anticuerpo anti-Erk1/2 de conejo (Cell Signaling, N.º de cat. 06-182, 1:1000) o anticuerpo anti-Akt de conejo (Cell Signaling, N.º de cat. 9272, 1:1000) y después se visualiza como se ha descrito anteriormente. Beta-actina (Sigma, N.º de cat. A5316, 1:20000 y GAPDH (Sigma, N.º de cat. G9295) se sondaron como control de carga de muestra.

#### 40 *Materiales*

Tabla 10. ID de los clones de mAb.

REGN	AbPID	Lote
	H4H9816P	L1
REGN1945		L1
	H4H9780P	L1
	H4H9814P	L1
	H1M8037C	L1
	Comparador, Anticuerpo de control	

Tabla 11. Reactivos.

Reactivo/Equipo	Fuente	Identificador	N.º de lote
Penicilina/Estreptomicina	Invitrogen	15140	
Suero bovino fetal	Invitrogen	10082-147	
Suplemento neuronal GS21 (50X)	GlobalStem	GSM-3100	18130001
Medio basal NeuralQ	GlobalStem	GSM-9420	18190001

(continuación)

Reactivo/Equipo	Fuente	Identificador	N.º de lote
Glutamax	Invitrogen	35050-061	
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	P8340	
Cóctel inhibidor de fosfatasa 3	Sigma	P0044	034M4010V
Tampón de lisis RIPA 1x	Rockland	MB-030-0250	24805
BSA	Sigma	A8806	
Geles reducidos de Tris-Acetato al 4-8 %	Invitrogen	WG1602BX10	14022684
Kit de ensayo de proteína BCA	Pierce	23227	
ECL	Pierce	32209	
Restaurar el tampón de extracción de transferencia Western	Pierce	21059	
Membrana de nitrocelulosa	Bio-Rad Laboratories	1620112	

**Tabla 12. Medio Neurobasal.**

50 ml de medio Basal NeuralQ (Global Stem, GSM-9420)
10 ml de suplemento Neural GS21 (50X) (Global Stem, GSM-3100)
0,5 ml de Glutamax (Invitrogen, 35050-061)
5 ml de Penicilina/Estreptomicina

5

**Tabla 13. Anticuerpos.**

Lote 1 de H4H9816P (10 µg/ml)
Lote 1 de H4H9780P (10 µg/ml)
Lote 1 de H4H9814P (10 µg/ml)
Lote 1 de IgG4 humana contra REGN1945 (10 µg/ml)
Lote 1 de C2 H1M8037C (10 µg/ml)

**Tabla 14. Transferencias Western.**

Rb de p-Trk (Cell Signaling, 9141), 1:500
Rb de TrkB (Cell Signaling, 4603) total 1:1000
Rb de p-Akt (Cell Signaling, 9271) 1:1000
Rb de Akt-total (Cell Signaling, 9272) 1:1000
p-Erk1/2 (Sigma, E7028) 1:5000
Rb de Erk1/2 (Cell Signaling, 06-182) total 1:1000
Ms de b-Actina (Sigma, A5316) 1:20000
Conjugado de HRP de GAPDH (Sigma, G9295) 1:20000

**Resultados y conclusiones**

10

Como se muestra en la **Figura 7**, aunque todos los anticuerpos agonistas de TrkB mostraron activación de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt 15 minutos después de la incubación, sólo BDNF y H4H9814P mostraron fosforilación de TrkB. 2 horas de la incubación, todos los anticuerpos agonistas de TrkB mostraron activación de TrkB.

15 Referencia

**Ejemplo 5. Evaluación farmacocinética de un anticuerpo anti-TrkB en ratones TrkB humanizados y de tipo silvestre****20 Procedimiento experimental**

Se realizó una evaluación de la farmacocinética de un anticuerpo anti-TrkB, H4H9816P2 (Lote H4H9816P2-L7), en ratones TrkB humanizados (ratones homocigotos para la expresión de TrkB de ratón/humano quimérico, TrkB<sup>hu/hu</sup>) (MAID7139) y ratones de tipo silvestre (TS). Las cohortes contenían 5 ratones por cepa de ratón. Todos los ratones

recibieron una única dosis subcutánea (SC) de 10 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre 6 horas y 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 y 30 días después de la dosificación. La sangre se procesó en suero y se congeló a -80 °C hasta que se analizó.

Las concentraciones de anticuerpos circulantes se determinaron mediante el análisis de anticuerpos IgG4/hIgG1 humanos totales utilizando GyroLab xPlore™ (Gyros, Uppsala, Suecia). En síntesis, se capturó anticuerpo monoclonal específico de ratón biotinilado anti-IgG4/IgG1 humana (REGN2567; Lote RSCH15088) diluido a 100 µg/ml en tampón de dilución de anticuerpos (Tween-20 al 0,05 % + PBS) en un CD Gyrolab Bioaffy 200, que contenía columnas de afinidad precargadas con perlas recubiertas de estreptavidina (Dynospheres™). El patrón utilizado para la calibración en este ensayo fue H4H9816P en concentraciones que variaban de 0,488 a 2000 ng/ml en tampón de dilución (BSA al 0,5 % + PBS) que contenía suero de ratón normal al 0,1 % (NMS). Las muestras de suero se diluyeron 1:100 en el tampón de dilución de anticuerpos. La IgG humana capturada en las columnas de afinidad recubiertas con anticuerpo anti-REGN2567 en el CD, ejecutada a temperatura ambiente, se detectó mediante la adición de anticuerpo monoclonal anti-kappa humana de ratón conjugado con Alexa-647 0,5 µg/ml (REGN654; Lote RSCH13067) diluido en tampón de detección (tampón Rexpip F); y la señal fluorescente resultante se registró en unidades de respuesta (UR) mediante el instrumento GyroLab xPlore. Las concentraciones de las muestras se determinaron mediante la interpolación a partir de una curva convencional que se ajustó utilizando un ajuste de curva logística de 5 parámetros utilizando el programa informático Gyrolab Evaluator. Se utilizaron concentraciones promedio de 2 experimentos repetidos para el análisis FC posterior.

Los parámetros FC se determinaron mediante análisis no compartimental (NCA) utilizando el software Phoenix®WinNonlin® versión 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) y un modelo de dosificación extravascular. Con los respectivos valores de concentración media para cada anticuerpo, todos los parámetros FC, incluida la concentración máxima observada en suero ( $C_{\max}$ ), la semivida estimada observada ( $t_{1/2}$ ) y el área bajo la curva de concentración frente al tiempo hasta la última concentración medible ( $ABC_{\text{última}}$ ) se determinaron mediante una regla trapezoidal lineal con interpolación lineal y ponderación uniforme.

#### Resultados y conclusiones

Después de la administración de 10 mg/kg s.c. de anticuerpo anti-TrkB, H4H9816P2, se observaron concentraciones máximas similares ( $C_{\max}$ ) de anticuerpos el día 1 o 2 en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> y de TS (135 y 131 µg/ml, respectivamente). El día 9, H4H9816P2 presentó una eliminación de fármaco más pronunciada en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> que en ratones de TS, indicando un efecto mediado por la diana. Las concentraciones de anticuerpos del día 30 fueron aproximadamente 35 veces menores en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup>. La exposición a anticuerpos ( $ABC_{\text{última}}$ ) para H4H9816P2 en ratones de TS fue aproximadamente ~1,7 veces mayor que la observada en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> (1730 y 1020 d\*µg/ml, respectivamente). Los ratones de TS también presentaron un aumento de aproximadamente 3 veces en la semivida ( $T_{1/2}$ ) sobre ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> (8,4 y 2,9 días, respectivamente).

Un resumen de los datos para las concentraciones totales de anticuerpos anti-TrkB se resume en la **Tabla 15**, los parámetros FC medios se describen en la **Tabla 16** y las concentraciones medias totales de anticuerpos frente al tiempo se muestran en la **Figura 8**. En la **Figura 8**, a los ratones se les administró una dosis subcutánea única de 10 mg/kg el día 0. Las concentraciones de H4H9816P2 total en suero se midieron utilizando un inmunoensayo Gyros. Los puntos de datos 6 horas, 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 y 30 días después de la dosis indican la concentración media de anticuerpos. Las concentraciones totales de anticuerpos de H4H9816P2 se representan como círculos sólidos para ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> y cuadrados sólidos para ratones de tipo silvestre. Los datos se representan como media ± SD.

**Tabla 15. Concentraciones medias (± SD) de IgG total en suero después de una única inyección subcutánea de 10 mg/kg de H4H9816P2 en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> y de tipo silvestre a lo largo del Tiempo.**

Anticuerpo	Tiempo (d)	Concentración total de mAb en suero de ratón	
		10 mg/kg	
		Media (µg/ml)	+/- SD
Ratones TrkB <sup>hu/hu</sup>	0,25	72,42	4,06
	1	132,0	18,0
	2	124,9	15,9
	3	113,4	11,8
	6	78,72	9,98
	9	37,74	14,0
	16	5,592	4,97
	21	2,060	2,11
	30	0,447	0,506

(continuación)

Anticuerpo	Tiempo (d)	Concentración total de mAb en suero de ratón	
		10 mg/kg	
		Media (µg/ml)	+/- SD
Ratones de TS	0,25	56,73	14,5
	1	120,8	6,26
	2	131,2	7,54
	3	125,7	7,46
	6	101,9	11,4
	9	75,94	7,06
	16	42,61	16,1
	21	27,75	16,9
	30	15,52	13,0

Abreviaturas: Tiempo = tiempo en días después la inyección de la dosis única; d = día de estudio; SD = desviación típica.

Tabla 16. Sumario de parámetros farmacocinéticos.

Parámetro	Unidades	H4H9816P2	
		Ratones TrkB <sup>hu/hu</sup>	Ratones de TS
C <sub>máx</sub>	µg/ml	135 ± 15	131 ± 7,5
T <sub>1/2</sub>	d	2,94 ± 1,1	8,36 ± 3,9
ABC <sub>última</sub>	d•µg/ml	1020 ± 150	1730 ± 310

Los parámetros farmacocinéticos derivaron de los perfiles de concentración media frente al tiempo. T<sub>1/2</sub> y ABC<sub>última</sub> se basan en concentraciones hasta el día 30.  
 Abreviaturas: C<sub>máx</sub> = concentración máxima; ABC = área bajo la curva de concentración-tiempo; ABC<sub>última</sub> = ABC calculada desde el momento cero hasta el momento de la última concentración positiva; T<sub>1/2</sub> = semivida terminal de eliminación.

##### 5 Ejemplo 6. Generación de ratas que comprende un locus *TRKB* humanizado

Un vector de direccionamiento grande que comprende un brazo de homología 5' que comprende 7 kb del locus *TrkB* de rata y un brazo de homología 3' que comprende 47 kb del locus de *TrkB* de rata se generó para reemplazar una región de 68,5 kb del gen *TrkB* de rata que codifica el dominio extracelular de TRKB de rata con 74,4 kb de la secuencia humana correspondiente de *TRKB*. Se describe la generación y el uso de vectores de direccionamiento grandes (LTVEC) derivados del ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) mediante reacciones de recombinación homóloga bacteriana (BHR) utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE®, por ejemplo, en el documento US 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) Nat. Biotechnol. 21(6):652-659. Se describe la generación de LTVEC a través de métodos de ensamblaje *in vitro*, por ejemplo, en los documentos US 2015/0376628 y WO 2015/200334. Se proporciona información sobre TRKB de ratón y humana en la **Tabla 17**. Se proporciona una descripción de la generación del vector de direccionamiento grande en la **Tabla 18**.

Tabla 17. TRKB/NTRK2 de rata y humana.

	Símbolo oficial	ID del gen de NCBI	Fuente principal	ID de ARNm de RefSeq	ID de UniProt	Ensamblaje genómico	Ubicación
Rata	Ntrk2	25054	RGD:3213	NM_012731.2	Q63604	RGSC 5.0/rn5	Cr 17: 8.156.432 - 8.464.507 (-)
Ser humano	Ntrk2	4915	HGNC:8032	AF410899	Q16620	GRCh38/hg38	Cr 9: 84,669,778 - 85,027,070 (+)

Tabla 18. Vector de direccionamiento grande de *TrkB/ntrk2* de rata.

	Construcción del genoma	Inicio	Final	Longitud (pb)
Brazo de rata 5'	RGSC 5.0/rn5	Cr17: 8.470.615	Cr17: 8.463.379	7.236
Inserto humano	GRCh38/hg38	Cr9: 84.670.730	Cr9: 84.745.139	74.409
Brazo de rata 3'	RGSC 5.0/rn5	Cr17: 8.394.967	Cr17: 8.347.889	47.078

Específicamente, una región que comienza en el exón 2 (exón codificante 1; desde el aminoácido 32, conservando el péptido señal) hasta el exón 10, incluyendo los primeros 50 pares de bases del intrón 10 y todos los intrones entre los exones 2 y 10 (es decir, entre el exón codificante 1 y el exón 10) se eliminó del locus *TrkB* de rata (conservando el dominio transmembrana de rata codificado por los exones 10 y 11). Una región que incluye el exón 2/exón codificante 1 (desde el aminoácido 32, comenzando después del péptido señal) hasta el exón 10, incluyendo los primeros 66 pares de bases del intrón 10 y todos los intrones entre los exones 2 y 10 (es decir, entre el exón codificante 1 y el exón 10) se insertó en lugar de la región de rata eliminada (conservando el dominio transmembrana de rata codificado por los exones 10 y 11).

Se exponen secuencias del péptido señal de TRKB de rata, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático en las SEQ ID NO: 55-58, respectivamente, con la secuencia codificante correspondiente expuesta en las SEQ ID NO: 67-70, respectivamente. Se exponen secuencias del péptido señal de TRKB humana, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio citoplasmático en las SEQ ID NO: 59-62, respectivamente, con la secuencia codificante correspondiente expuesta en las SEQ ID NO: 71-74, respectivamente. La proteína TRKB quimérica codificada esperada tiene dominios intracelular y transmembrana de TRKB de rata, un péptido señal TRKB de rata y un dominio extracelular de TRKB humana. Véase la **Figura 4**. Una alineación de las proteínas TRKB de rata y humana en la **Figura 6**. Las secuencias codificantes de *TrkB/TRKB* de rata y humana se exponen en las SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente. Las secuencias de proteínas TRKB de rata y humana se exponen en las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente. Las secuencias para la secuencia codificante de *TRKB* de rata/humana quimérica y la proteína TRKB de rata/humana quimérica esperada se exponen en las SEQ ID NO: 13 y 5, respectivamente.

Para generar el alelo mutante, los componentes de CRISPR/Cas9, incluyendo cuatro ARN guía (secuencias diana de ARN guía expuestas en las SEQ ID NO: 41-44) se introdujeron en células madre embrionarias de rata junto con el vector de direccionamiento grande. Específicamente, se electroporaron  $4 \times 10^6$  células ES de rata (línea Agutí Oscuro DA2B) con lo siguiente: 2 mg de LTVEC de TrkB; 5 mg de plásmido de expresión de Cas9; y 5 mg de cada uno de los ARNg: gU, gU2, gD y gD2. Las condiciones de electroporación fueron: voltaje de 400 V; capacitancia de 100 mF; y resistencia de 0 W. La selección de antibióticos se realizó utilizando G418 a una concentración de 75 mg/ml. Se seleccionaron colonias, se expandieron y se cribaron mediante TAQMAN®. Véase la **Figura 5**. Se realizaron ensayos de pérdida de alelo para detectar la pérdida del alelo endógeno de rata, se realizaron ensayos de ganancia de alelo para detectar la ganancia del alelo humanizado y se realizaron ensayos de CRISPR y de retención utilizando los cebadores y sondas expuestos en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Ensayos de cribado.

Ensayo	Descripción	Cebador/Sonda	Secuencia
rnoTU	LOA en dirección 5'	Dir	GGGCTCAGGCAGGTATATGTTG (SEQ ID NO: 26)
		Sonda (FAM)	ACAGATGCTGTCCCAAACATAGCAAGA (SEQ ID NO: 27)
		Inv	CCAACCCTAAGCCAGTGAAACAG (SEQ ID NO: 28)
rnoTM	LOA media	Dir	GCAGACACTGGATGGGTCA (SEQ ID NO: 32)
		Sonda (FAM)	CCATTTCGCGAGTTATGAGAAGCTGCA (SEQ ID NO: 33)
		Inv	ACAGGGTTAGCTGGTGAATGGA (SEQ ID NO: 34)
rnoTD	LOA en dirección 3'	Dir	GTGCTGGAGACCAGGAGACT (SEQ ID NO: 29)
		Sonda (Cal-Naranja)	TGCCATACTCAGTTTATACGGTGCTGAC (SEQ ID NO: 30)
		Inv	GCCTGGTGGCTCAGTCAATG (SEQ ID NO: 31)
7138 hU	Inserción humana en dirección 5'	Dir	AGGTGGGTAGGTCCTGGAAGTG (SEQ ID NO: 14)
		Sonda (FAM)	AATGCTGTCCCAAGAGTGGG (SEQ ID NO: 15)
		Inv	GTCCTGCATCCCTTGTCTTTG (SEQ ID NO: 16)

(continuación)

Ensayo	Descripción	Cebador/Sonda	Secuencia
7138 hD	Inserción humana en dirección 3'	Dir	ATGTGGGCGTTGTGCAGTCTC (SEQ ID NO: 17)
		Sonda (Cal)	CGCTGCAGTGCATTGAACTCAGCA (SEQ ID NO: 18)
		Inv	CTGTGGAGGGACGTGACCAG (SEQ ID NO: 19)
rnoTAU2	Retención en dirección 5'	Dir	TCGGAGCACAGGACTACAG (SEQ ID NO: 35)
		Sonda (FAM)	CAAGAGGAACTGTGTCCAGGAAAGC (SEQ ID NO: 36)
		Inv	AGCGTGCCTCACCTAACCTCTA (SEQ ID NO: 37)
rnoTAD2	Retención en dirección 3'	Dir	GCACAGCACTGTAAAGGCA (SEQ ID NO: 38)
		Sonda (Cal)	ACGGAAGTGAAGGAATTGGTATTGTTGT (SEQ ID NO: 39)
		Inv	ACACAGCTATGGGAGAAAGACTG (SEQ ID NO: 40)
rnoTGU	Ensayo de CRISPR en dirección 5'	Dir	CTGGGTGATTGGGACTGAGAAAG (SEQ ID NO: 45)
		Sonda (FAM)	CAGCCTTGAAAGTATGGCTTGGGC (SEQ ID NO: 46)
		Inv	GCACTCGCCAACCGGAAG (SEQ ID NO: 47)
rnoTGD	Ensayo de CRISPR en dirección 3'	Dir	GACCAGCTCACCCTTACTTATGG (SEQ ID NO: 48)
		Sonda (Cal)	ACTGAATGCCAAGGGTGC GTTGA (SEQ ID NO: 49)
		Inv	TCTTGAAATCCGCTGAAGAGTT (SEQ ID NO: 50)

Se describen ensayos de modificación de alelo (MOA), incluidos ensayos de pérdida de alelo (LOA) y ganancia de alelo (GOA), por ejemplo, en los documentos US 2014/0178879; US 2016/0145646; WO 2016/081923; y Friendewey et al. (2010) Methods Enzymol. 476:295-307. El ensayo de pérdida de alelo (LOA) invierte la lógica de detección convencional y cuantifica el número de copias en una muestra de ADN genómico del locus nativo al que se dirigió la mutación. En un clon celular heterocigoto dirigido correctamente, el ensayo de LOA detecta uno de los dos alelos nativos (para genes que no están en el cromosoma X o Y), alterándose el otro alelo por la modificación diana. El mismo principio se puede aplicar a la inversa como un ensayo de ganancia de alelo (GOA) para cuantificar el número de copias del vector de direccionamiento insertado en una muestra de ADN genómico.

Se describen ensayos de retención en los documentos US 2016/0145646 y WO 2016/081923. Los ensayos de retención distinguen entre inserciones dirigidas correctas de un inserto de ácido nucleico en un locus genómico diana de inserciones transgénicas aleatorias del inserto de ácido nucleico en ubicaciones genómicas fuera del locus genómico diana mediante la evaluación de números de copias de moldes de ADN de secuencias diana 5' y 3' correspondientes a los brazos de homología 5' y 3' del vector de direccionamiento, respectivamente. Específicamente, los ensayos de retención determinan los números de copias en una muestra de ADN genómico de un molde de ADN de secuencia diana 5' destinado a ser conservado en el locus genómico diana modificado y/o el molde de ADN de secuencia diana 3' destinado a ser conservado en el locus genómico diana modificado. En las células diploides, los clones correctamente dirigidos conservarán un número de copias de dos. Los números de copias superiores a dos generalmente indican la integración transgénica del vector de direccionamiento aleatoriamente fuera del locus genómico diana en lugar de en el locus genómico diana. Un número de copias inferior generalmente indica eliminaciones grandes que se extienden más allá de la región diana para la eliminación.

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.

El clon positivo CB1 se descongeló, se expandió y se reconfirmó mediante TAQMAN®. También se confirmó CB1 mediante PCR exitosa desde el extremo 5' de la secuencia de reemplazo humana hasta la secuencia genómica flanqueante de rata, más allá del final del brazo de homología 5'. Se confirmó que el amplicón de PCR era correcto mediante la secuenciación de los extremos.

Se generaron ratas F0 y F1 utilizando métodos como se describe en los documentos US 2014/0235933, US 2014/0310828, WO 2014/130706 y WO 2014/172489. En dichos métodos, se microinyectan clones de células ES de rata dirigidos confirmados (por ejemplo, clones de células ES de Agutí Oscuro) en blastocistos (por ejemplo, blastocistos de Sprague Dawley (SD)), que después se transfieren a hembras receptoras pseudoprefiadas (por ejemplo, hembras receptoras de SD) para su gestación utilizando técnicas convencionales. Las quimeras se identifican

(por ejemplo, por el color del pelaje) y las quimeras F0 macho se cruzan con ratas hembras de tipo silvestre de la misma cepa (por ejemplo, hembras SD). Después, las crías F1 de la línea germinal (por ejemplo, agutí) se genotipan para determinar la presencia del alelo diana. Todos los experimentos realizados en ratas TRKB humanizados como se describe a continuación se realizaron en ratas en las que el casete de selección de autoeliminación se autoeliminó.

**Ejemplo 7. Comparación *in vivo* del efecto del anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 y el control de isotipo de IgG4 REGN1945 sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR) en ratas TrkB<sup>hu/hu</sup>**

**Procedimiento experimental**

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración ARVO para el uso de animales en investigaciones oftálmicas y de la visión y el IACUC de Regeneron Pharmaceutical Inc. Se usaron ratas humanizadas TrkB hembras adultas (MAID100010), de 8-10 semanas de vida, cada una con un peso de 200-250 g. Todos los procedimientos quirúrgicos en ratas se realizaron con anestesia general utilizando una inyección intraperitoneal de ketamina (63 mg/kg) y xilazina (6,0 mg/kg). Se aplicó una pomada ocular que contenía eritromicina (0,5 %, Bausch & Lomb) para proteger la córnea.

**Axotomía e inyección intravítrea del nervio óptico intraorbitario.** El nervio óptico izquierdo (ON) quedó expuesto por vía intraorbitaria, se abrió su duramadre. ON se transeccionó aproximadamente 1,5 mm detrás del globo. Se tuvo cuidado para evitar dañar el suministro de sangre a la retina. Las inyecciones intravítreas se realizaron justo detrás de la pars plana con una pipeta de vidrio conectada a una jeringa Hamilton de 50 µl. Se tuvo cuidado de no dañar el cristalino. Se excluyeron ratas con complicaciones postoperatorias importantes (por ejemplo, isquemia retiniana, cataratas) de análisis adicionales. Los animales se asignaron a diferentes grupos experimentales. Un grupo de control recibió inyecciones intravítreas de 3 µl de control de isotipo REGN1945 (46,6 µg/ µl); el otro grupo recibió una inyección de 3 µl de anticuerpo anti-TRKB humano H4H9816P2 (45,7 µg/µl) 3 y 10 días después de la axotomía de ON.

**Tinción inmunohistoquímica y recuento de células ganglionares de la retina viables (CGR).** Se utilizó BRN3A (proteína 3A del dominio homeobox/POU específica del cerebro) como marcador para células ganglionares de la retina (CGR) supervivientes, porque se ha demostrado que es un método eficiente y fiable para el marcaje selectivo de CGR viables en montajes completos de retina después de una lesión de ON. Véase, p. ej., Nadal-Nicolás *et al.* (2009) Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 50(8):3860-3868. Para la inmunotinción de BRN3A, las retinas se bloquearon en suero de burro normal al 10 % y Triton X-100 al 0,5 % durante 1 h, después se incubaron en el mismo medio con anticuerpo contra BRN3A (1:400; N.º de cat: sc-31984, Santa Cruz) 2 h a temperatura ambiente. Después de más lavados, las retinas se incubaron con anticuerpo secundario de burro anti-cabra conjugado con Alexa594 (1:400; N.º de cat: A-11058, Invitrogen) durante la noche a 4 °C.

**Resultados y conclusiones**

Para evaluar el efecto del anticuerpo agonista de TRKB sobre la supervivencia de CGR *in vivo*, los intentores utilizaron un modelo de transección completa del nervio óptico. Se aplicó el anticuerpo agonista de TRKB (H4H9816P2) o el anticuerpo de control de isotipo 3 y 10 días después de la cirugía. Los animales se sacrificaron 14 días después de la axotomía. La densidad de CGR en el ojo contralateral ileso es similar en los tres genotipos de TRKB (humanizado homocigótico, humanizado heterocigoto y de tipo silvestre), con un promedio de aproximadamente 1600 por mm<sup>2</sup> como se muestra en la **Tabla 20**. La densidad de las CGR supervivientes se evaluó en montajes completos de retina utilizando tinción con BRN3A. Los inventores descubrieron que en ratas TrkB<sup>hu/hu</sup> humanizadas homocigotas, el anticuerpo agonista de TRKB (H4H9816P2) aumentó significativamente ( $p < 0,01$ , ensayo de Mann-Whitney) la supervivencia de las CGR en comparación con los controles ( $685 \pm 106$  frente a  $255 \pm 66$  CGR por mm<sup>2</sup>). En ratas humanizadas TrkB<sup>hu/+</sup> heterocigotas, también es significativo ( $p < 0,05$ , ensayo de Mann-Whitney) el efecto de supervivencia del Ab agonista de TrkB ( $444 \pm 90$  frente a  $208 \pm 50$  CGR por mm<sup>2</sup>). En ratas de tipo silvestre, hubo un aumento ligero pero no significativo del número de CGR en ratas tratadas con anticuerpo agonista de TRKB en comparación con el control de isotipo (**Tabla 21**). En conclusión, el anticuerpo agonista de TRKB (H4H9816P2) aumentó significativamente la supervivencia de CGR en ratas TrkB<sup>hu/hu</sup> humanizadas.

**Tabla 20. Cuantificación de CGR (CGR /mm<sup>2</sup>) en ojo de control ileso.**

hu/hu	hu/+	+/+
1637,3	1720,4	1636,3
1551,5	2064,6	1670,2
1651,4	1738,8	1873,4
1628,2	2029,8	1725,4
1804,7	1929,6	1973,4

(continuación)

hu/hu	hu/+	+/+
1741,3	1645,9	
1739,7	1761,5	
1698,8	1787,5	
1862,5	1914,0	
1779,4		

**Tabla 21. Cuantificación de CGR (CGR /mm<sup>2</sup>) después de una lesión del nervio óptico.**

	H4H9816P2					Ab de control de isotipo				
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5
Hu/Hu	790,1	737,1	756,3	587,8	555,7	322,8	295,0	286,9	171,3	197,9
Hu/+	530,4	457,5	522,9	390,6	319,2	231,0	184,6	265,1	151,3	
+/+	320,9	355,5	256,9	342,7		112,3				

**5 Ejemplo 8. Secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpos anti-TRKB utilizados en los Ejemplos.**

En los ejemplos se sometieron a ensayo varios anticuerpos anti-TRKB totalmente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos), incluyendo aquellos designados como H4H9780P, H4H9814P y H4H9816P2. La **Tabla 22** expone los identificadores de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de anticuerpos anti-TRKB utilizados en los ejemplos. La **Tabla 23** expone los identificadores de secuencias de ácidos nucleicos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de anticuerpos anti-TRKB utilizados en los ejemplos. Estos anticuerpos se describen con más detalle en la solicitud de patente de los EE. UU. N.º 16/202.881, presentada el 28 de noviembre de 2018.

**Tabla 22. SEQ ID NO de aminoácidos para anticuerpos anti-TRKB.**

Nombre de Ab	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VK	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H9780P	79	81	83	85	87	89	91	93
H4H9814P	95	97	99	101	103	105	107	109
H4H9816P2	111	113	115	117	119	121	123	125

**Tabla 23. SEQ ID NO de ácidos nucleicos para anticuerpos anti-TRKB.**

Nombre de Ab	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VK	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H9780P	78	80	82	84	86	88	90	92
H4H9814P	94	96	98	100	102	104	106	108
H4H9816P2	110	112	114	116	118	120	122	124

Los anticuerpos se denominan normalmente en el presente documento de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo de Fc (por ejemplo, "H4H"), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "9780", "9816", etc., como se muestra en la **Tabla 22**), seguido de un sufijo "P" o "P2". Los prefijos H4H en las designaciones de anticuerpos indican el isotipo de región Fc particular del anticuerpo. Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede denominarse en el presente documento, por ejemplo, "H4H9780P", lo que indica una región Fc de IgG4 humana. Las regiones variables son completamente humanas si se indican por la primera "H" en la designación del anticuerpo. Como apreciará un experto habitual en la materia, un anticuerpo que tiene un isotipo de Fc particular se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo de Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con una Fc de IgG1 de ratón se puede convertir en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluyendo las CDR), que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la **Tabla 22**, seguirán siendo los mismos, y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

**Ejemplo 9. Efecto neuroprotector de los anticuerpos agonistas anti-TrkB humanos en ratas TrkB humanizadas**

Los siguientes experimentos se realizaron para evaluar el efecto neuroprotector del agonista de TRKB endógeno, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y un anticuerpo monoclonal agonista de TRKB (mAb) en ratones y ratas de tipo silvestre (TS) y en ratones y ratas TrkB humanizados.

Los efectos *in vitro* de BDNF y Ab contra TRKB se cuantificaron mediante ensayos de supervivencia celular utilizando la línea celular de neuroblastoma humano diferenciado SH-SY5Y. *In vitro*, BDNF o Ab contra TRKB aumentaron significativamente la supervivencia celular en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico. Los efectos mostraron respuestas a la dosis en forma de campana con la dosis óptima de 1 µg/ml para BDNF o 10 µg/ml para Ab contra TRKB. La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y se cultivó en medios de diferenciación que contenían ácido retinoico todo trans 10 µM durante 4 días. El cultivo se cambió a un medio de diferenciación sin suero que contenía diferentes dosis de anticuerpos (0,01-100 µg/ml). Dos días después, se añadió reactivo CCK8, las placas se incubaron durante 3-4 horas y se midió la DO450 para determinar el porcentaje de células supervivientes. Los datos se normalizaron para los medios sin suero y sin anticuerpos. Como se muestra en la **Figura 9**, los mAb contra TRKB (mAb1 contra TrkB es H4H9816P2; mAb2 contra TrkB es un anticuerpo agonista de TrkB de control) aumentaron de forma dependiente de la dosis la supervivencia de las células SH-SY5Y. El control del isotipo humano no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de células SH-SY5Y. Los medios sin suero y sin anticuerpos dieron como resultado una supervivencia del 100 %.

Después se diseccionaron y disociaron las retinas de ratones P2 C57BL/6J. Las células ganglionares de la retina se purificaron mediante inmunopanelaje y se cultivaron en una placa de 96 pocillos con tratamiento o sin tratamiento. Después de 24 horas, se añadió MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a cada pocillo para calcular la supervivencia celular de cada grupo. Como se muestra en la **Figura 10**, el BDNF tuvo una curva de respuesta en forma de campana y una dosis óptima a 1 µg/ml. El mAb2 contra TrkB (un anticuerpo agonista de TrkB de control con afinidad por TrkB humano, TrkB de ratón y TrkB de rata) también puede tener una curva en forma de campana a dosis más altas, pero muestran un efecto neuroprotector.

Para someter a ensayo el efecto neuroprotector *in vivo*, se utilizaron ratones y ratas de TS y de TrkB humanizado. Los animales recibieron inyecciones intravítreas (IVT) de BDNF o mAb contra TRKB los días 3 y 10 después de la transección del nervio óptico (ONT). El número de células ganglionares de la retina (CGR) se cuantificó utilizando el software HALO (Indica Labs) a 1 semana para ratón o 2 semanas para rata después de la transección del nervio óptico mediante IHC de Brn3a en montajes planos de retina.

La muerte de CGR en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> fue similar a la de los ratones de TS 1 o 2 semanas después de la transección del nervio óptico. BDNF o Ab contra TRKB tuvieron un efecto neuroprotector pequeño o nulo significativo en ratones de TS o TrkB<sup>hu/hu</sup>. Por el contrario, hubo neuroprotección significativa de CGR en ratas TrkB<sup>hu/hu</sup> con Ab contra TRKB IVT. Se observó una disminución del peso corporal en ratones TrkB<sup>hu/hu</sup> pero no en ratas después del tratamiento con Ab contra TRKB IVT. El BDNF no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal ni en ratones ni en ratas.

Las **Figuras 11A y 11B** muestran los resultados de un experimento que evalúa la neuroprotección en un modelo de transección del nervio óptico en ratones y ratas de TS. En la **Figura 11A**, a ratas Agutí Oscuro de 8-9 semanas de edad se les administró BDNF (5 µg), mAb2 contra TrkB (18 µg), anticuerpo de control de isotipo (18 µg) o control de vehículo por vía intravítrea 3 días y 10 días después de la transección. El mAb2 contra TrkB es un anticuerpo agonista de TrkB de control con afinidad por TrkB humano, TrkB de ratón y TrkB de rata. Las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar células ganglionares de la retina 14 días después de la transección. BDNF y mAb contra TRKB mostraron una neuroprotección significativa medida por la densidad de las células ganglionares de la retina (CGR). En la **Figura 11B**, a ratones C57BL/6J de TS de 8 semanas de edad se les administró BDNF (2,5 µg), mAb2 contra TrkB (10 µg), anticuerpo de control de isotipo (10 µg) o control de vehículo por vía intravítrea 3 días y 10 días después de la transección. El mAb2 contra TrkB es un anticuerpo agonista de TrkB de control con afinidad por TrkB humano, TrkB de ratón y TrkB de rata. No hubo neuroprotección significativa. Por lo tanto, el tratamiento con BDNF y mAb contra TRKB dio como resultado aumentos significativos en la densidad de CGR en retinas diseccionadas en ratas de tipo silvestre después de la transección del nervio óptico, mientras que no se observó ningún efecto significativo sobre la densidad de CGR en el mismo modelo en ratones de tipo silvestre.

Las **Figuras 12A y 12B** muestran la respuesta a la dosis de BDNF en ratones y ratas de TS. En la **Figura 12A**, la respuesta a la dosis de BDNF en un modelo de aplastamiento del nervio óptico (ONC) en ratones de TS muestra una pequeña ventana de neuroprotección. La **Figura 12B** muestra una respuesta a la dosis de BDNF en un modelo de transección del nervio óptico en ratas de TS de 0,13 µg a 30 µg. Existe una respuesta en forma de campana similar a la de los datos *in vitro*, con la dosis óptima a 0,8 µg. Las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar células ganglionares de la retina 14 días después de la transección. Por lo tanto, el tratamiento con BDNF dio como resultado una curva dosis-respuesta mucho más pronunciada medida por la densidad de CGR en retinas diseccionadas en ratas de tipo silvestre después de la transección del nervio óptico en comparación con la curva de dosis-respuesta de BDNF mucho menos pronunciada medida por la densidad de CGR en retinas diseccionadas en ratones de tipo silvestre después del aplastamiento del nervio óptico.

A continuación se sometió a ensayo el efecto neuroprotector de Ab contra TRKB en ratas TrkB humanizadas. Los

resultados de las **Figuras 13A y 13B** muestran que la inyección intravítrea de mAb contra TRKB en ratas TrkB humanizadas con transección del nervio óptico muestra una neuroprotección significativa de las células ganglionares de la retina. A ratas homocigotas para TRKB humana, heterocigotas para TRKB humana o TrkB de tipo silvestre se les administró mAb1 contra TrkB o anticuerpo de control de isotipo por vía intravítrea (3 µl) 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Catorce días después de la transección, las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar CGR. Las ratas eran hembras que tenían 17-19 semanas de edad. Como se muestra en la **Figura 13A**, las ratas tratadas con mAb1 contra TrkB (H4H9816P2) mostraron neuroprotección en los tres genotipos en comparación con las ratas correspondientes tratadas con anticuerpo de control de isotipo. Las ratas homocigotas y heterocigotas tratadas con control de isotipo para TRKB humana tienen una mayor densidad de CGR que las ratas de tipo silvestre tratadas con control de isotipo. La **Figura 13B** no muestra ninguna diferencia en el número de CGR en ojos sin tratamiento previo entre genotipos. La **Figura 13C** muestra el peso corporal de ratones homocigotos para TRKB humana a los que se les administró anticuerpo agonista de TrkB (H4H9816P2) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945) 14 días después de la transección.

Después se crearon mapas de isodensidad de CGR de montaje completo de retina de rata que muestran células marcadas con Brn3a de ojos ilesos y lesionados tratados en los tres genotipos (datos no mostrados). La reconstrucción del montaje completo se preparó con la ayuda de una platina motorizada en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti). Las CGR se contaron utilizando un software de análisis de imágenes (HALO®; Indica Labs, Corrales, Nuevo México, EE.UU.). Los mapas de isodensidad se generaron a través de Matlab. Se observó una mayor densidad de CGR en las ratas de TrkB humanizado tratadas con mAb1 contra TrkB (H4H9816P2) en comparación con las ratas tratadas con control de isotipo (datos no mostrados).

En conjunto, los datos mostrados en las **Figuras 11A, 11B, 12A, 12B y 13A-13C** demuestran que la administración intravítrea del mAb agonista de TRKB tiene un efecto neuroprotector significativo después de una lesión del nervio óptico en ratas TrkB humanizadas, en contraste con el efecto neuroprotector pequeño o nulo significativo observado después de la lesión del nervio óptico en ratones TrkB humanizados.

Para evaluar más a fondo el efecto de los anticuerpos agonistas de TRKB sobre la supervivencia de CGR en ratas en el modelo de transección del nervio óptico (ONT), se realizó un estudio de dosis-respuesta. Se usaron ratas homocigotas para TRKB humana (MAID100010; 75 % de SD, 25 % de DA) que tenían 1-9 meses de edad. Se utilizaron seis ratas en cada grupo. A ratas homocigotas TRKB humanas se les administraron dosis diferentes de mAb1 contra TrkB o de anticuerpo de control de isotipo (REGN1945) por vía intravítrea (3 µl) 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Catorce días después de la transección, las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar CGR. Como se muestra en la **Figura 14**, el mAb1 contra TrkB aumentó de forma dependiente de la dosis la supervivencia de las CGR en las ratas humanizadas con TrkB.

A continuación, se comparó el efecto neuroprotector de diferentes anticuerpos agonistas de TrkB en ratas homocigotas para TRKB humana en el modelo de transección del nervio óptico (ONT). Se utilizaron ratas TrkB humanizadas (MAID100010; 75 % de SD, 25 % de DA) que tenían 8-10 semanas de edad. Se utilizaron de cinco a seis ratas en cada grupo. A ratas homocigotas para TRKB humana se les administró H4H9816P2-L9 (10 µg), H4H9814P-L9 (10 µg), H4H9780P-L5 (10 µg) o una combinación de los tres (3,3 µg cada uno) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945; 10 µg) por vía intravítrea (3 µl) 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Catorce días después de la transección, las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar CGR. Los resultados se muestran en las **Figuras 15A y 15B**. Cada anticuerpo agonista de TrkB tuvo un efecto neuroprotector en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. El peso corporal en cada grupo fue similar (datos no mostrados).

Por el contrario, los anticuerpos agonistas de TrkB H4H9780P y H4H9814P no tuvieron ningún efecto neuroprotector en ratas de tipo silvestre. El efecto neuroprotector se evaluó en ratas de tipo silvestre utilizando el modelo de transección del nervio óptico (ONT). Se utilizaron ratas hembra de tipo silvestre que tenían 8-10 semanas de edad. Se utilizaron de cinco a seis ratas en cada grupo. A las ratas de tipo silvestre se les administró H4H9780P (120 µg), H4H9814P (120 µg) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945; 120 µg) por vía intravítrea (3 µl) 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Catorce días después de la transección, las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar CGR. Como se muestra en la **Figura 16**, ninguno de los anticuerpos agonistas de TrkB tuvo un efecto neuroprotector significativo en ratas de tipo silvestre.

Adicionalmente, el anticuerpo agonista de TrkB (H4H9780P) no tuvo un efecto neuroprotector en ratones homocigotos para TRKB humana. Se utilizaron ratones macho homocigotos para TRKB humana (MAID7139; 75 % de C57BL/6, 25 % de 129) que tenían 5 meses de edad. Se utilizaron de cinco a seis ratones en cada grupo. A ratones homocigotos para TRKB humana se les administró H4H9780P (40 µg por ojo) o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945; 40 µg por ojo) por vía intravítrea (1 µl) 3 y 10 días después de la transección del nervio óptico. Catorce días después de la transección, las retinas se diseccionaron y se tiñeron para detectar CGR. Como se muestra en las **Figuras 17A y 17B**, el anticuerpo agonista de TrkB no tuvo un efecto neuroprotector en ratones homocigotos para TRKB humana a diferencia del efecto neuroprotector observado en ratas homocigotas para TRKB humana. La **Figura 17C** muestra el peso corporal de ratones homocigotos para TRKB humana a los que se les administró H4H9780P o anticuerpo de control de isotipo 14 días después de la transección.

## REIVINDICACIONES

1. Una rata que comprende un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína quinasa B receptora de tropomiosina (TRKB),  
 5 en donde la proteína TRKB comprende un péptido señal de TRKB endógeno, un dominio citoplasmático de TRKB endógeno, un dominio transmembrana de TRKB endógeno y un dominio extracelular de TRKB humano, y todo el dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga.
- 10 2. La rata de la reivindicación 1, en donde el dominio extracelular comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 60, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el dominio extracelular comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 72.
- 15 3. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde:
  - (I) el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 55; o
  - (II) todo el péptido señal está codificado por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 67.
- 20 4. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde:
  - (I) el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 57; o
  - (II) todo el dominio transmembrana está codificado por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 69.
- 25 5. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde:
  - (I) el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 58; o
  - (II) todo el dominio citoplasmático está codificado por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 70.
- 30 6. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 55, el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 57 y el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 58.
- 35 7. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde todo el péptido señal, todo el dominio transmembrana y todo el dominio citoplasmático están codificados por una secuencia de *TrkB* endógena, opcionalmente en donde la secuencia codificante para el péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 67, la secuencia codificante para el dominio transmembrana comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 69 y la secuencia codificante para el dominio citoplasmático comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 70.
- 40 8. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína TRKB comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5.
- 45 9. La rata de la reivindicación 8, en donde la secuencia codificante del locus *TrkB* modificado genéticamente que codifica la proteína TRKB comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13.
- 50 10. La rata de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata es heterocigota u homocigota para el locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente.
11. Un método para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a TRKB humana *in vivo*, que comprende:
  - (a) administrar el reactivo dirigido a TRKB humana a la rata de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y
  - (b) evaluar la actividad del reactivo dirigido a TRKB humana en la rata.
- 55 12. El método de la reivindicación 11, en donde la etapa (a) comprende inyectar el reactivo dirigido a TRKB humana a la rata.
- 60 13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la etapa (b) comprende evaluar cambios en uno o más, o todos, de entre el peso corporal, la composición corporal, el metabolismo y la locomoción con respecto a una rata de control, opcionalmente, en donde la evaluación de cambios en la composición corporal comprende evaluar la masa magra y/o la masa grasa con respecto a una rata de control, y opcionalmente en donde la evaluación de cambios en el metabolismo comprende evaluar cambios en el consumo de alimentos y/o consumo de agua.
- 65 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la etapa (b) comprende evaluar la fosforilación

de TRKB y/o la activación de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt con respecto a una rata de control.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde la etapa (b) comprende evaluar la actividad neuroprotectora.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde la etapa (b) comprende evaluar la viabilidad de las células ganglionares de la retina, opcionalmente en donde la viabilidad de las células ganglionares de la retina se evalúa en un modelo de transección completa del nervio óptico después de una lesión del nervio óptico o se evalúa en un modelo de aplastamiento del nervio óptico.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el reactivo dirigido a TRKB humana es una proteína de unión a antígeno, opcionalmente en donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo agonista de TRKB humana.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el reactivo dirigido a TRKB humana es una molécula pequeña, opcionalmente en donde la molécula pequeña es un agonista de TRKB humana.

19. Un método para producir la rata de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:

(I)

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

(II)

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

20. Una célula de rata que comprende un locus *TrkB* endógeno modificado genéticamente que codifica una proteína quinasa B receptora de tropomiosina (TRKB), en donde la proteína TRKB comprende un péptido señal de TRKB endógeno, un dominio citoplasmático de TRKB endógeno, un dominio transmembrana de TRKB endógeno y un dominio extracelular de TRKB humano, y todo el dominio extracelular está codificado por un segmento del locus *TrkB* endógeno que se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TRKB* humana ortóloga.

**Nota:**

El documento completo que incluye las tablas de referencia y el listado de secuencias se puede descargar de la página web de la EPO (<https://register.epo.org>)

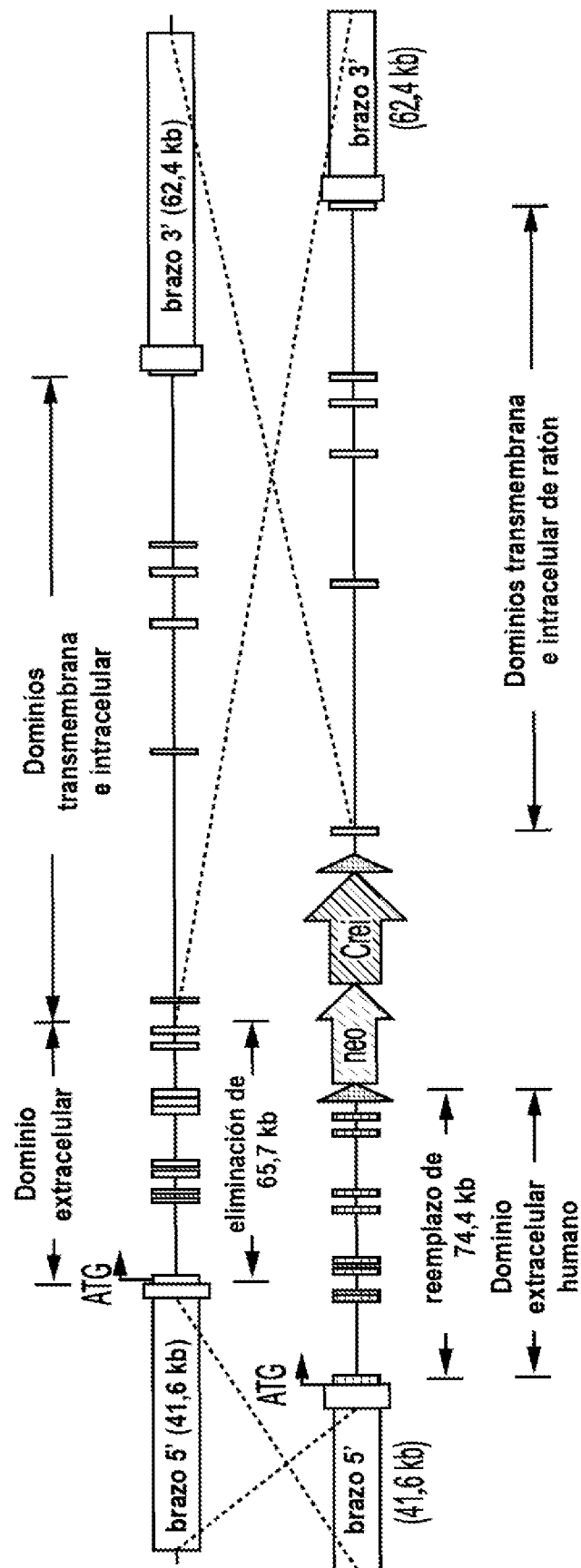


FIG. 1

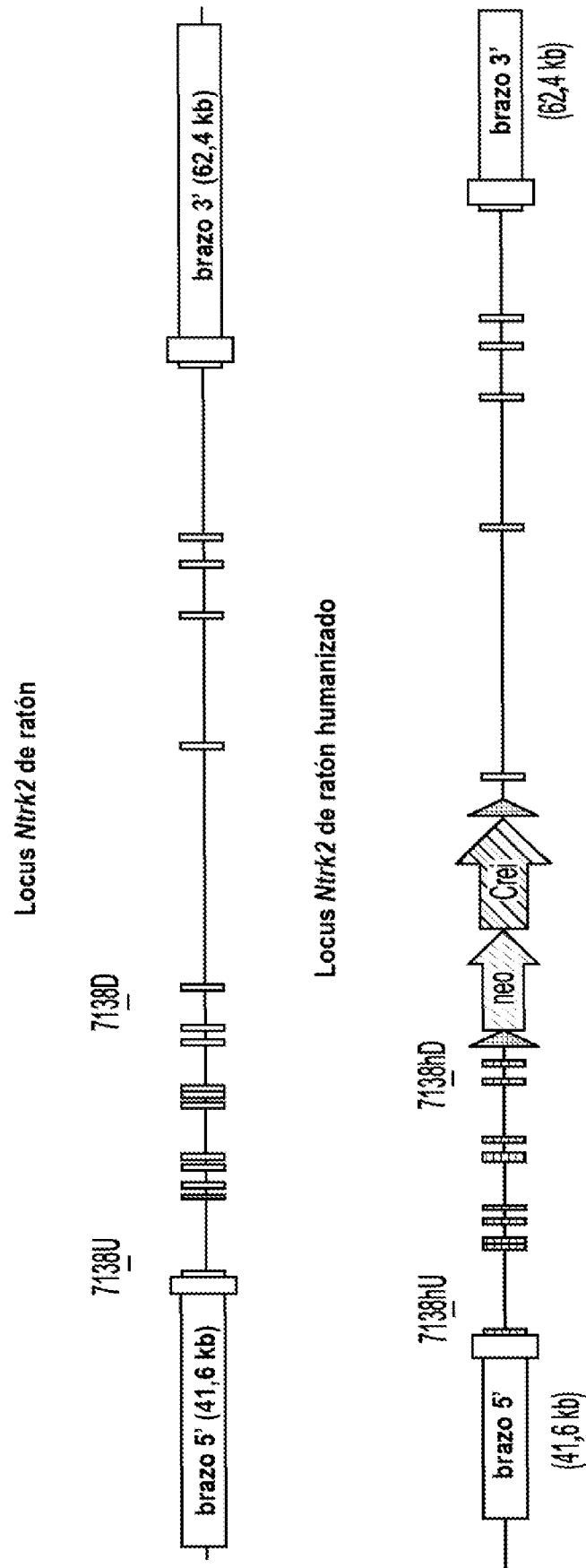


FIG. 2

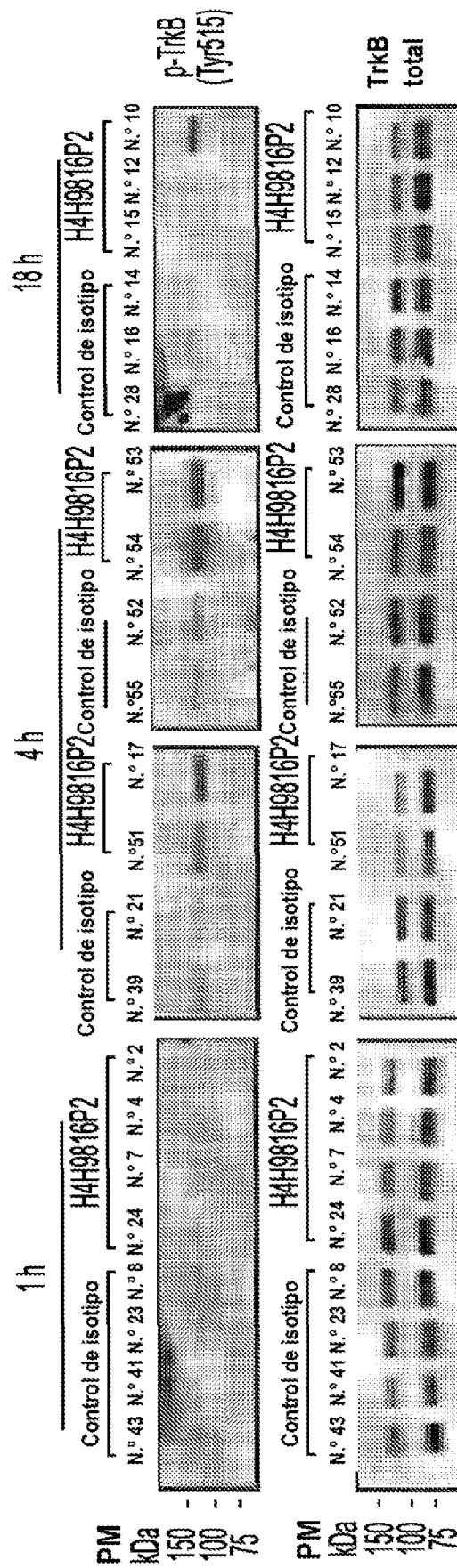


FIG. 3

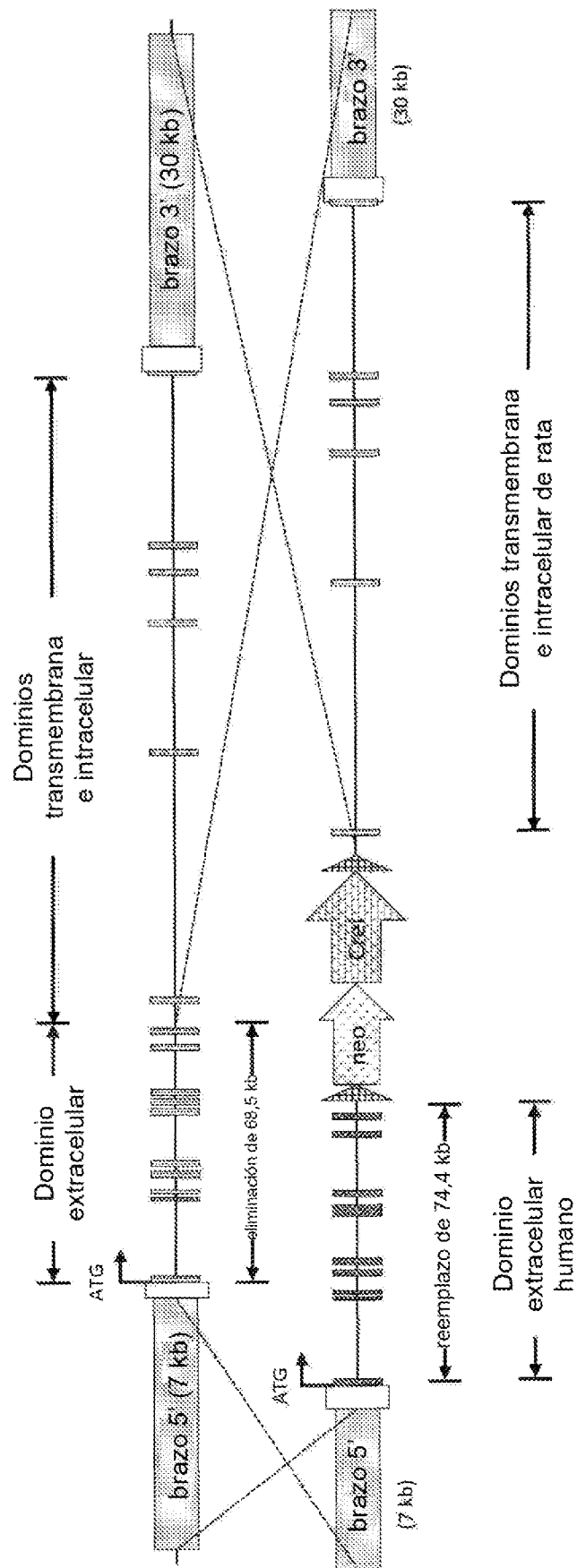
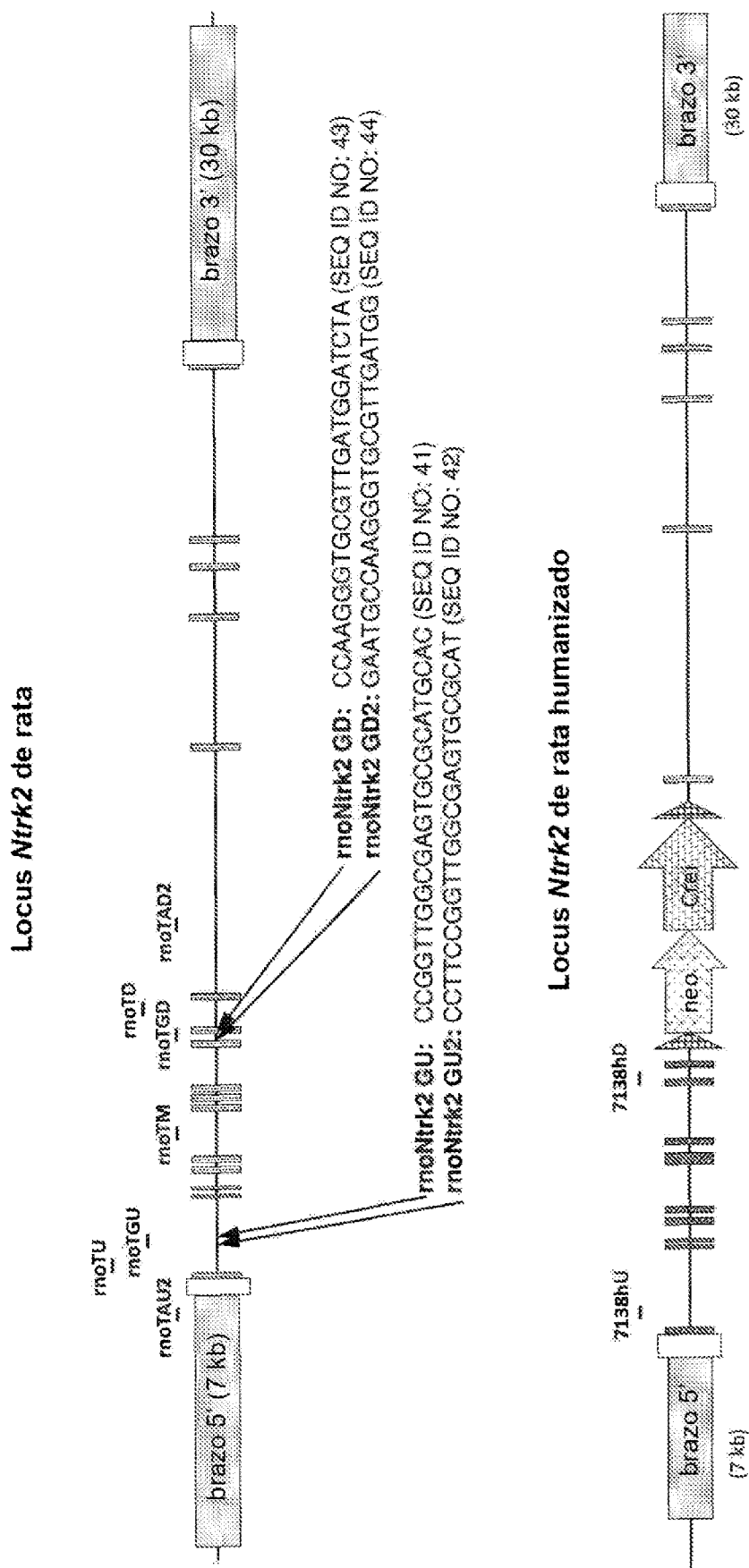


FIG. 4



**FIG. 5**

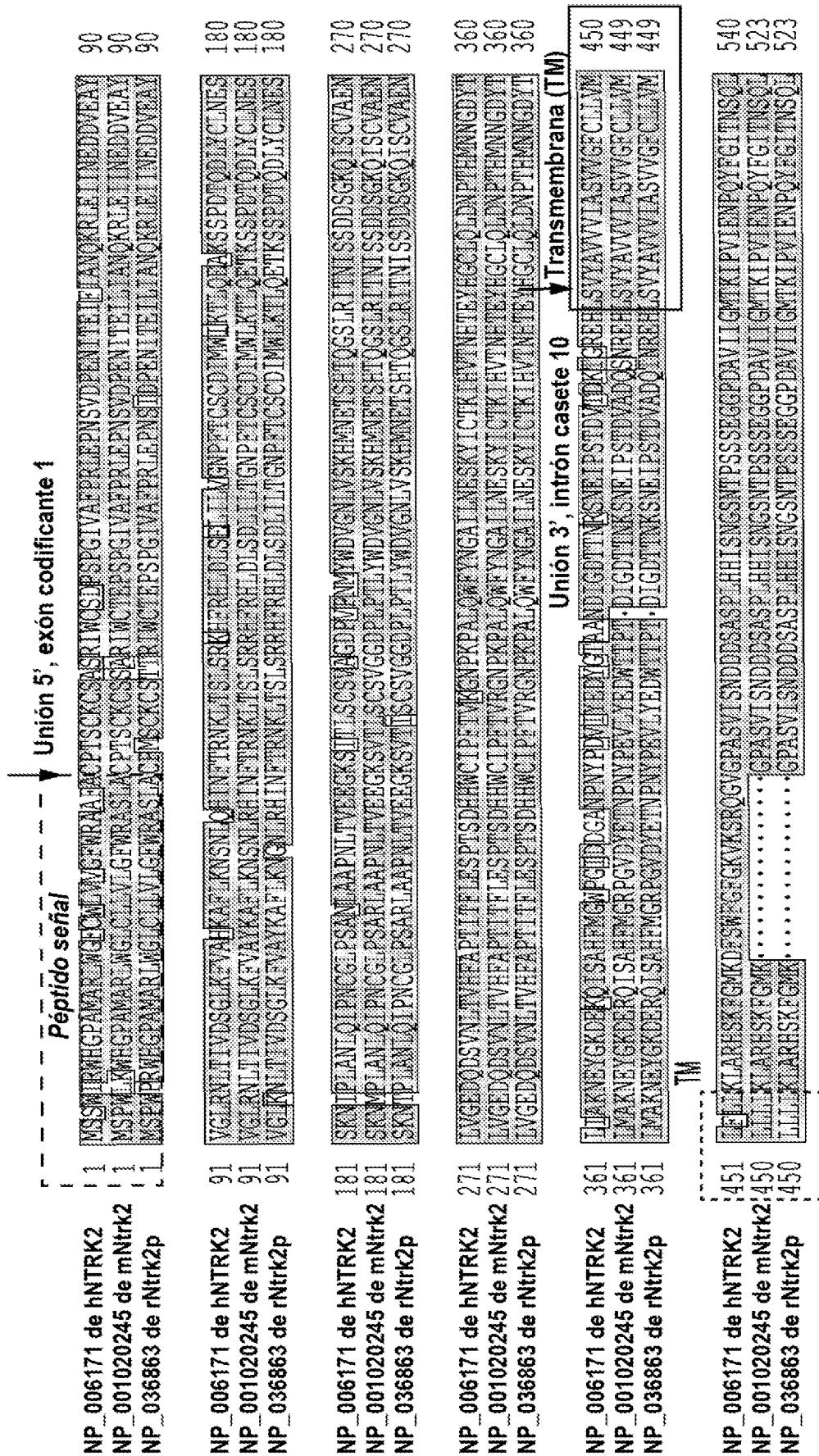


FIG. 6

NP_006171 de hNTRK2	541	KPDTFVQHKKRENIVLKRLELCHGAFEGKVFLEFCYNLCPEQDKILVAVKTLKDA	630
NP_001020245 de mNtrk2	524	KPDTFVQHKKRENIVLKRLELCHGAFEGKVFLEFCYNLCPEQDKILVAVKTLKDA	613
NP_036863 de rNtrk2p	524	KPDTFVQHKKRENIVLKRLELCHGAFEGKVFLEFCYNLCPEQDKILVAVKTLKDA	613
NP_006171 de hNTRK2	631	MVFEYNKKGDLNKFRAHGPDVIMAEGNPPTELTQSOMLHIAQQTAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKGDFGMSRDVYST	720
NP_001020245 de mNtrk2	614	MVFEYNKKGDLNKFRAHGPDVIMAEGNPPTELTQSOMLHIAQQTAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKGDFGMSRDVYST	703
NP_036863 de rNtrk2p	614	MVFEYNKKGDLNKFRAHGPDVIMAEGNPPTELTQSOMLHIAQQTAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKGDFGMSRDVYST	703
NP_006171 de hNTRK2	721	DYTRUGGCHTMLPIRNMPPESIMYRKFTTESDVNSLGNLWEIFTYCKQPNVQLSNNEVIECTQGRVLQRPRTCPQEVVELMIGCMQOREP	810
NP_001020245 de mNtrk2	704	DYTRUGGCHTMLPIRNMPPESIMYRKFTTESDVNSLGNLWEIFTYCKQPNVQLSNNEVIECTQGRVLQRPRTCPQEVVELMIGCMQOREP	793
NP_036863 de rNtrk2p	704	DYTRUGGCHTMLPIRNMPPESIMYRKFTTESDVNSLGNLWEIFTYCKQPNVQLSNNEVIECTQGRVLQRPRTCPQEVVELMIGCMQOREP	793
NP_006171 de hNTRK2	811	ETPRKNITGTHLQLQNLAKASPYVIDILG	838 (SEQ ID NO: 3)
NP_001020245 de mNtrk2	794	ETPRKNITGTHLQLQNLAKASPYVIDILG	821 (SEQ ID NO: 1)
NP_036863 de rNtrk2p	794	ETPRKNITGTHLQLQNLAKASPYVIDILG	821 (SEQ ID NO: 2)

FIG. 6 continuación

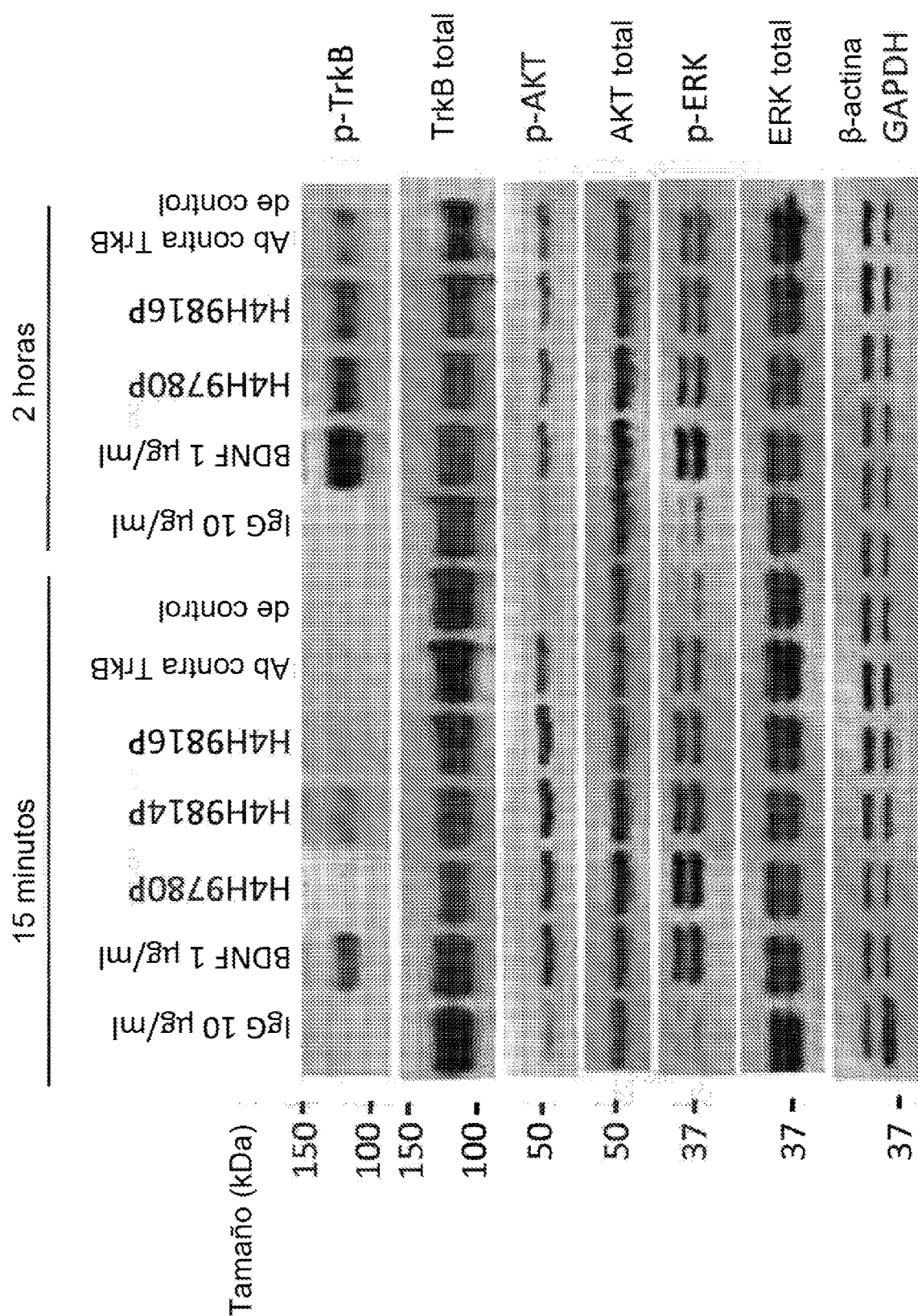


FIG. 7

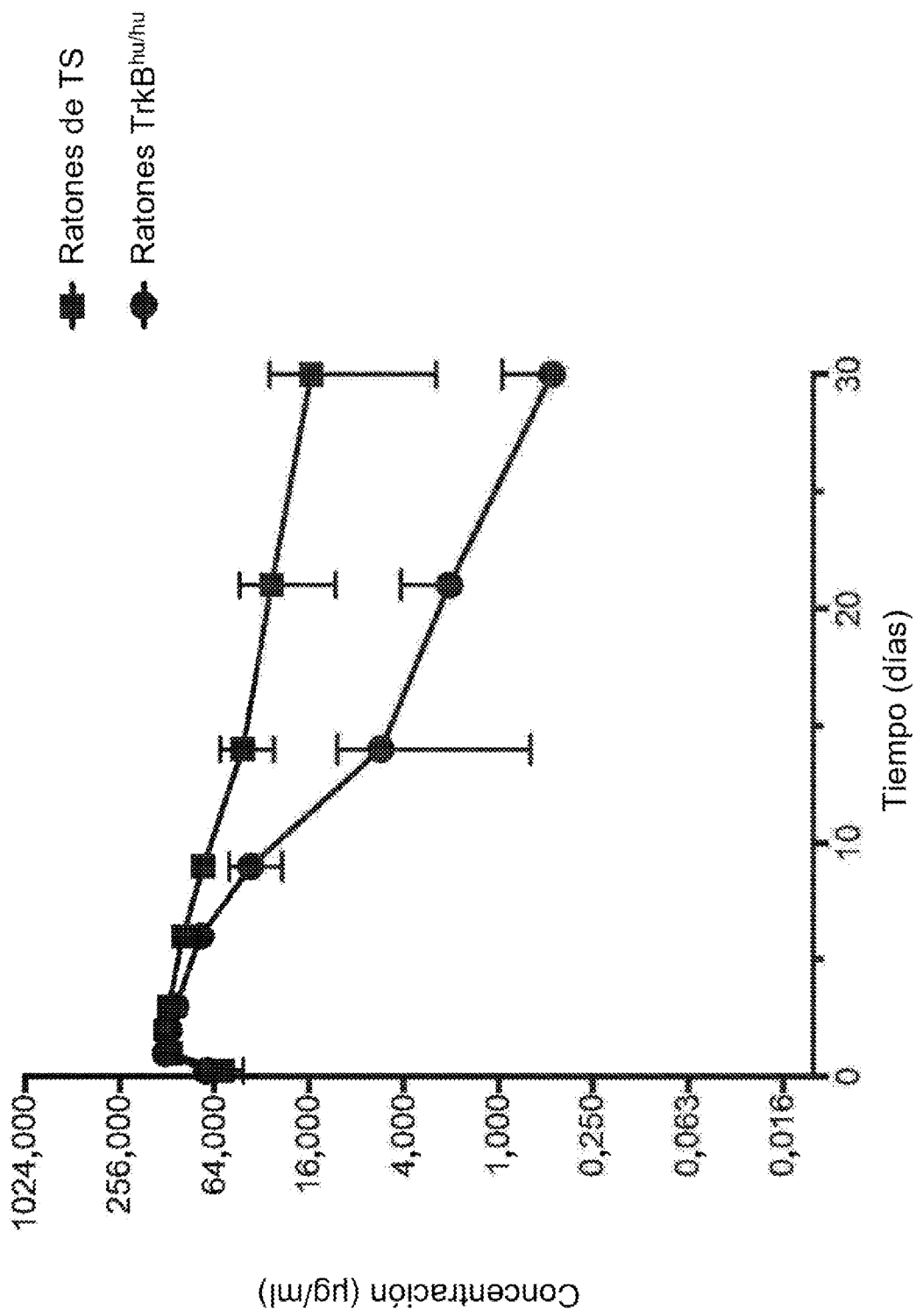


FIG. 8

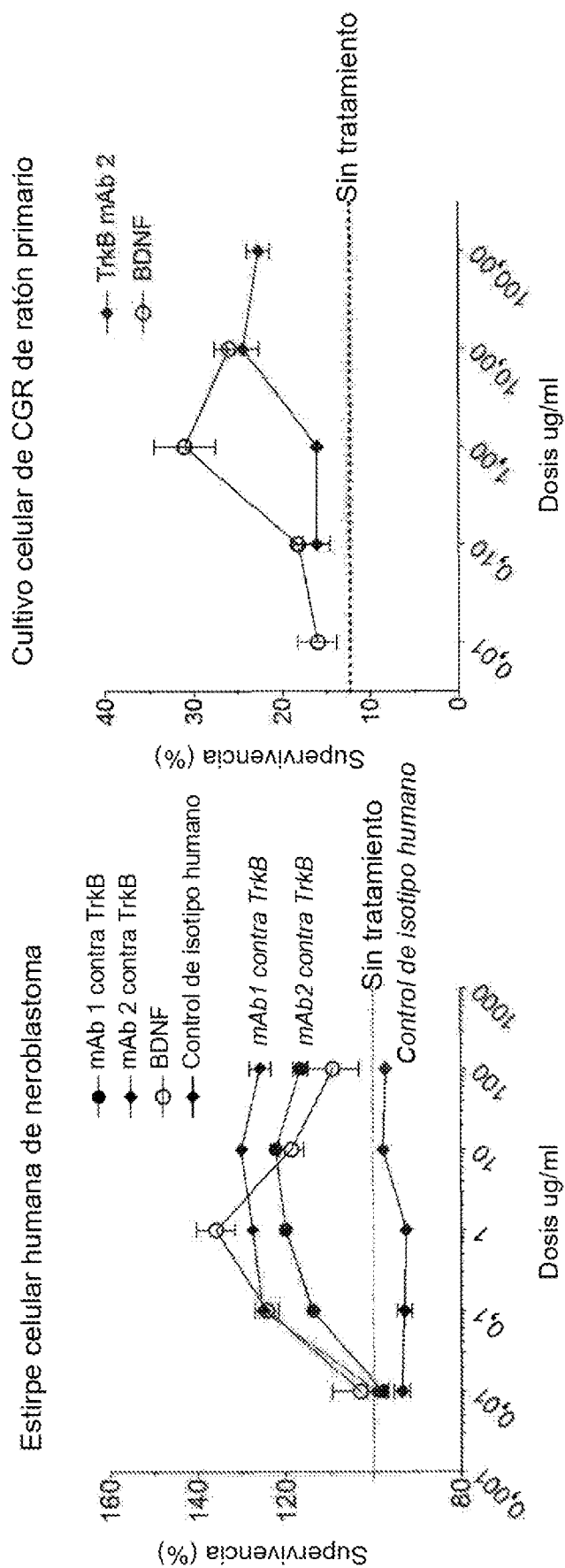
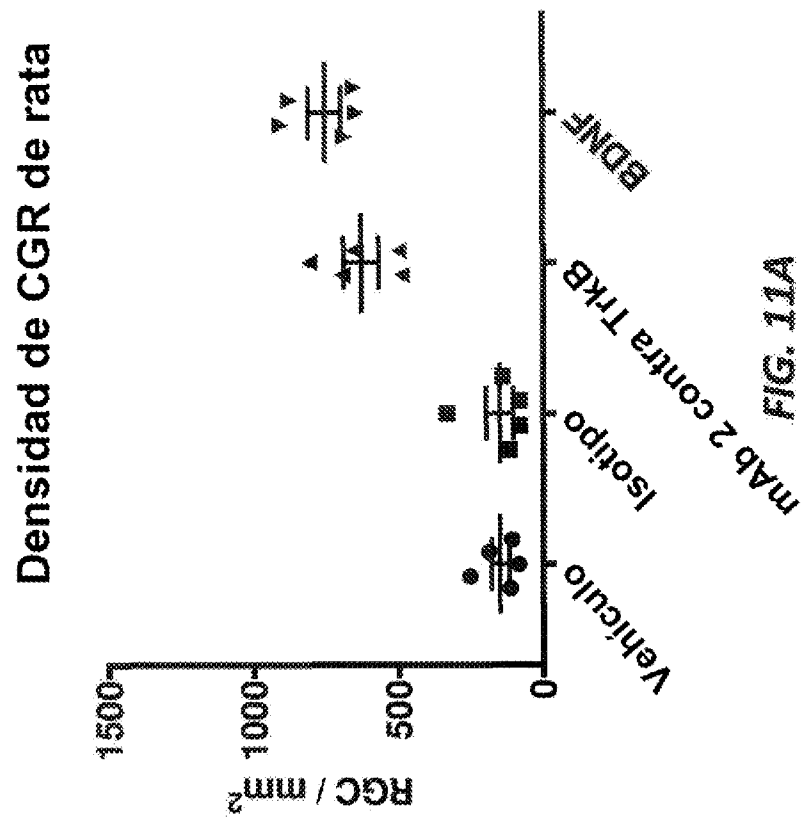
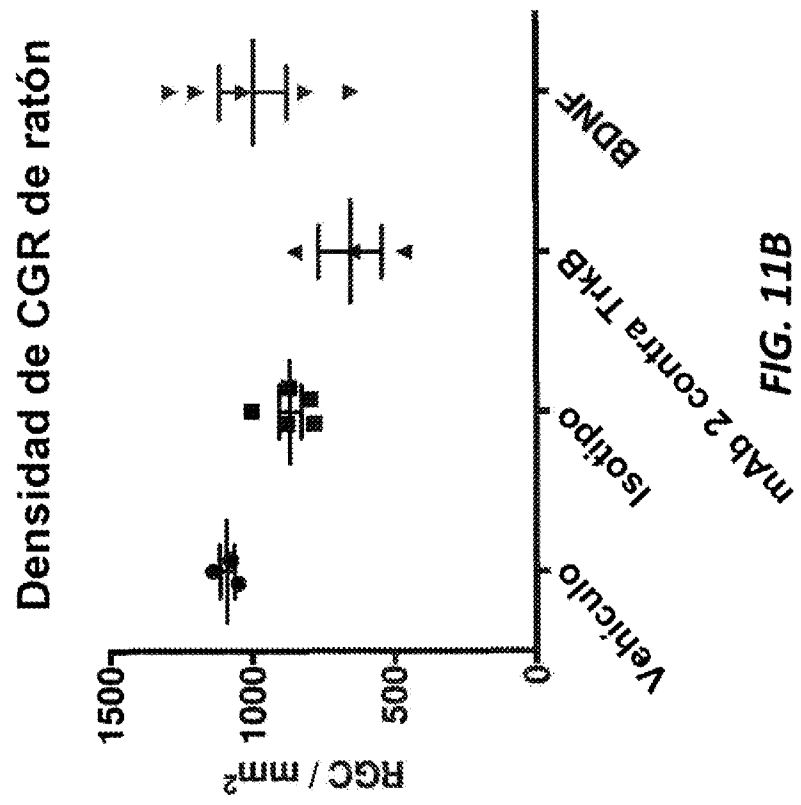


FIG. 9

FIG. 10



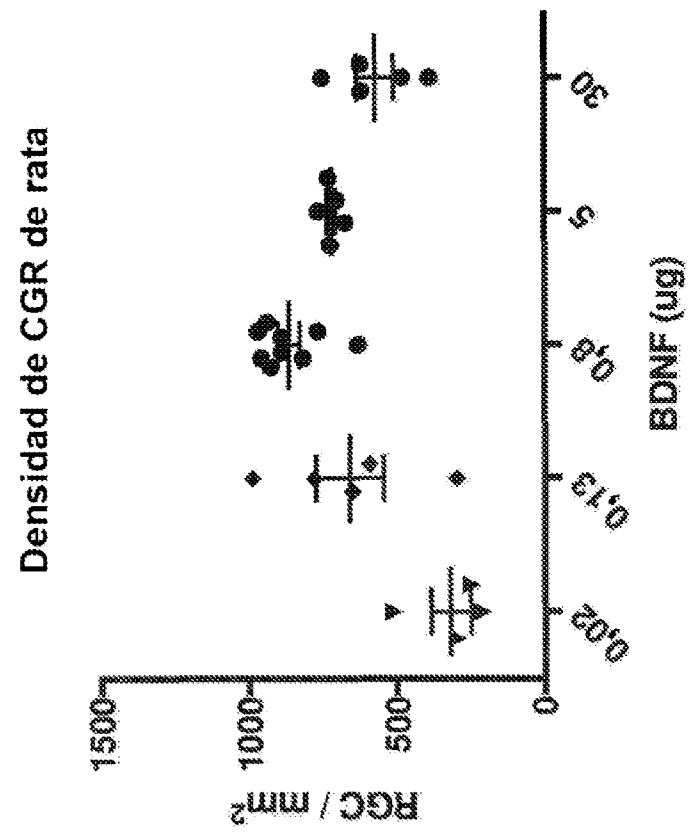


FIG. 12B

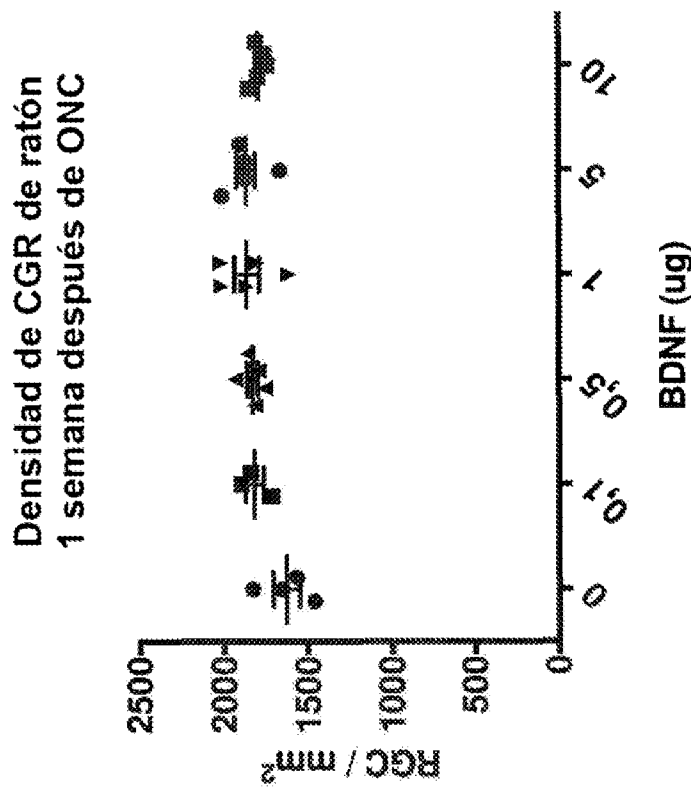


FIG. 12A

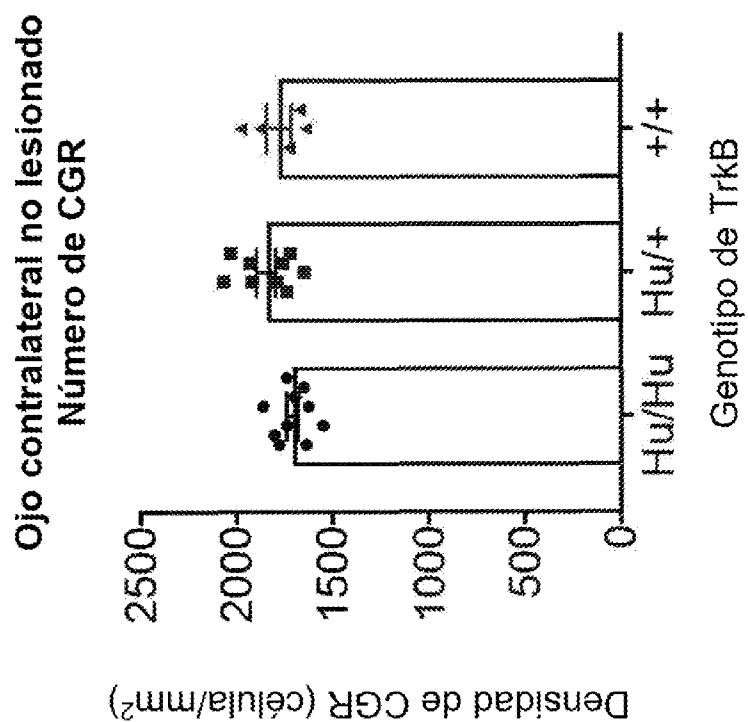


FIG. 13B

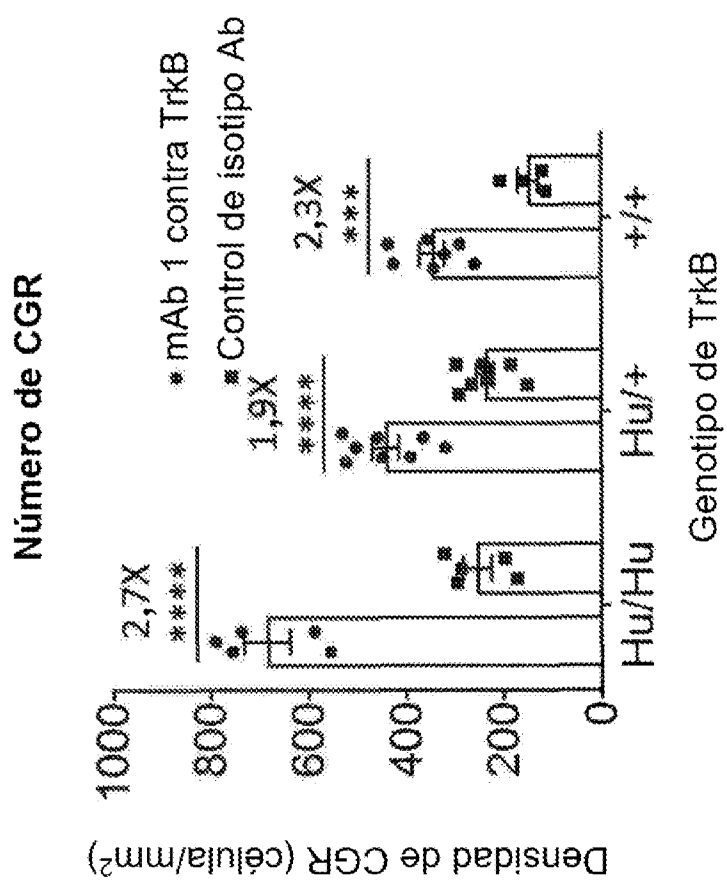
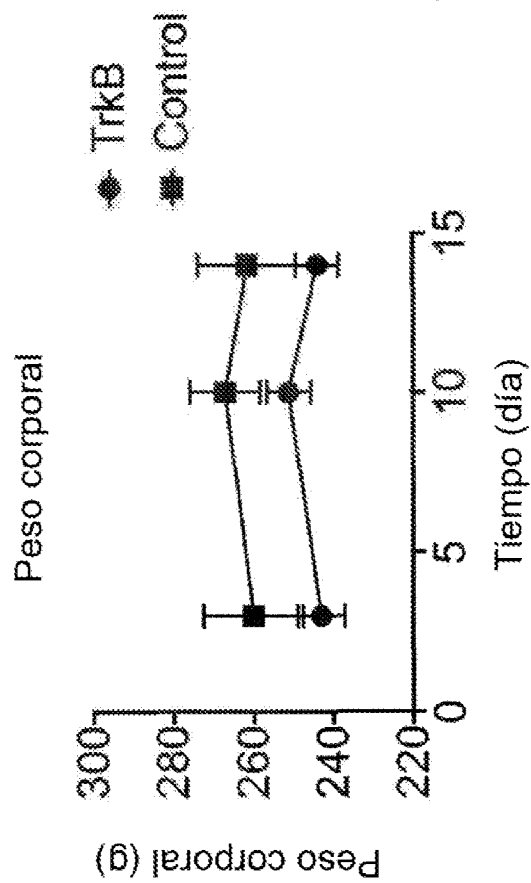
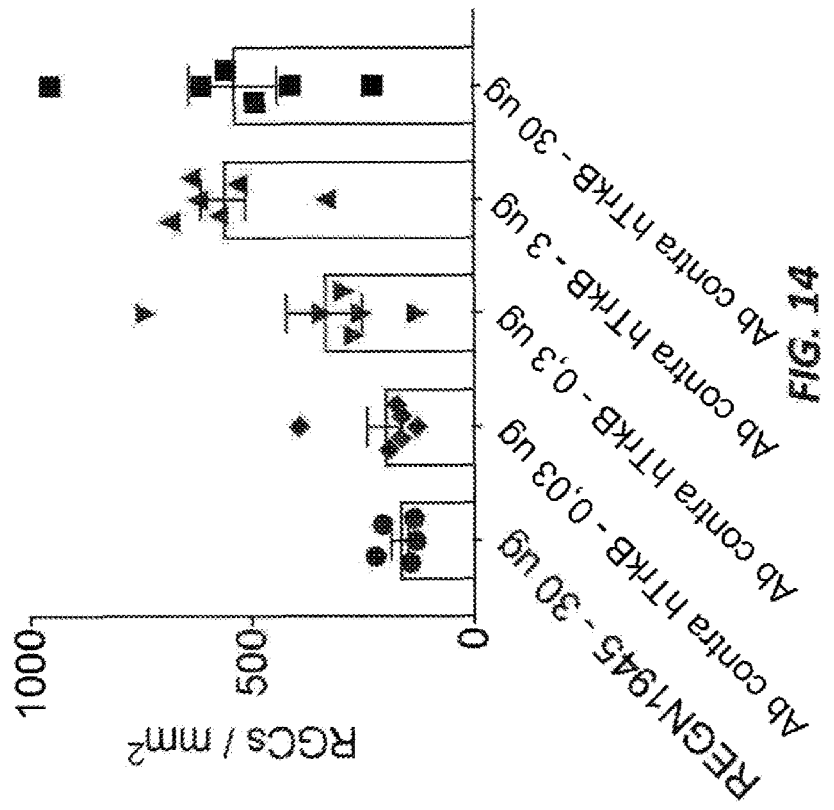
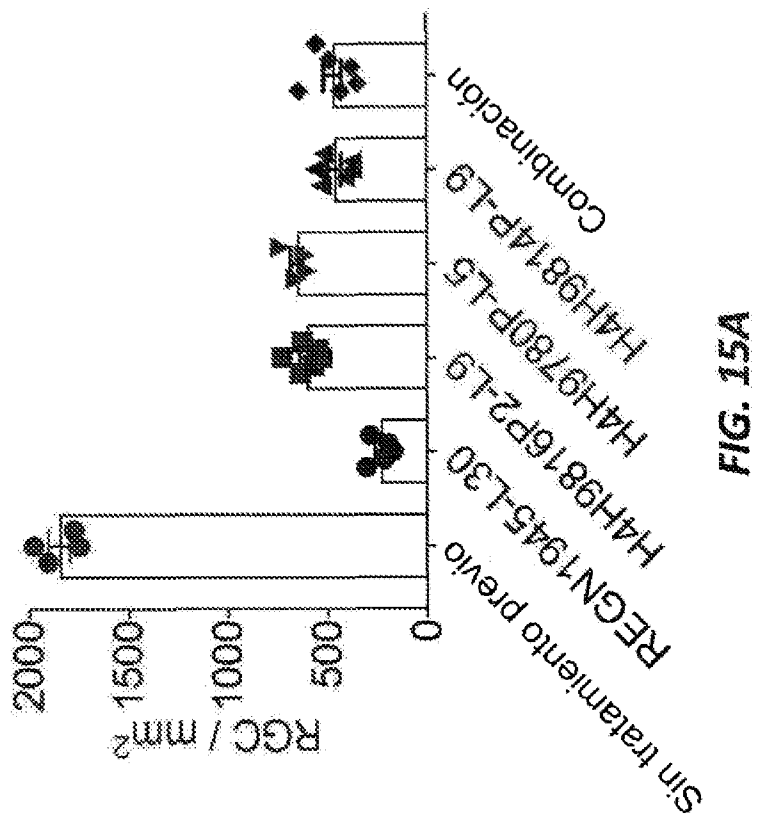
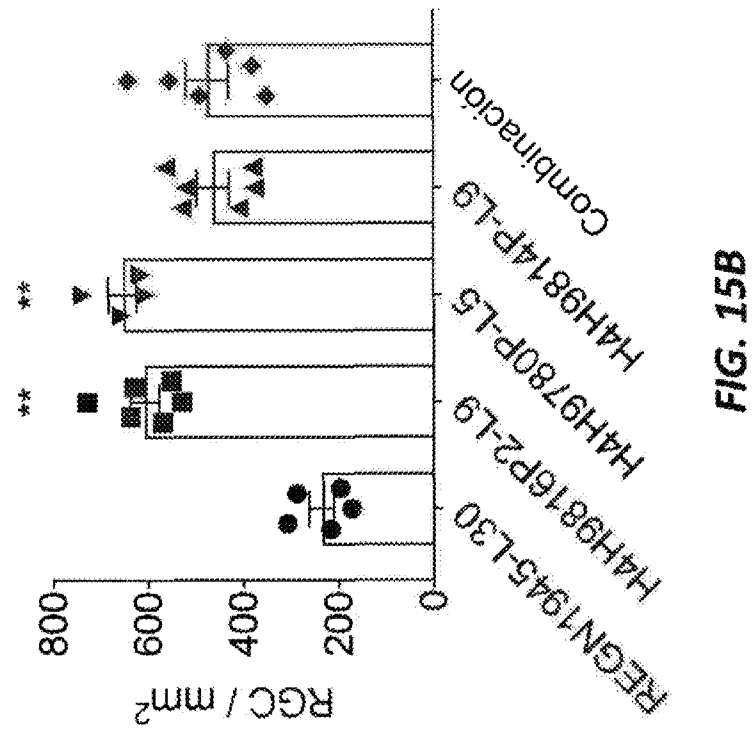


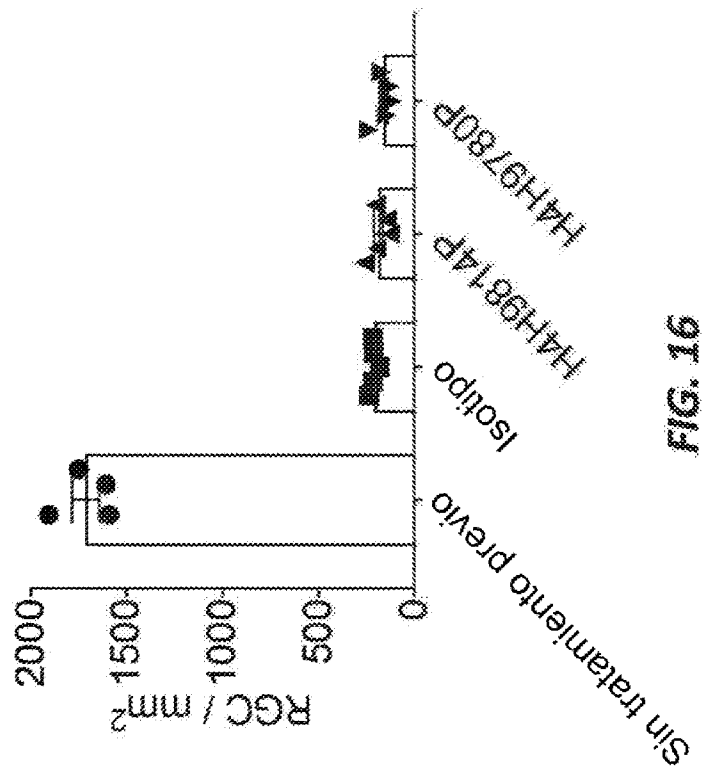
FIG. 13A



Respuesta a la dosis de anticuerpo  
contra hTrkB en ratas hTrkB ONT  
Recuento de Bm3a







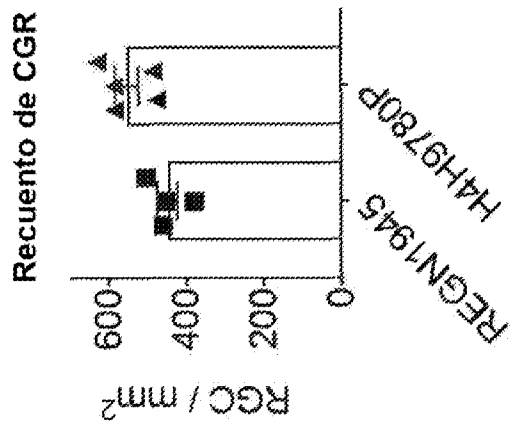


FIG. 17B

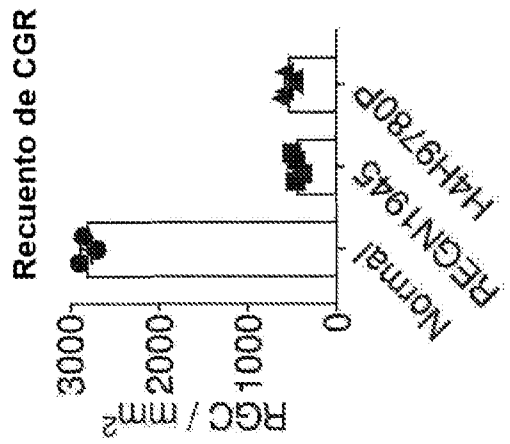


FIG. 17A

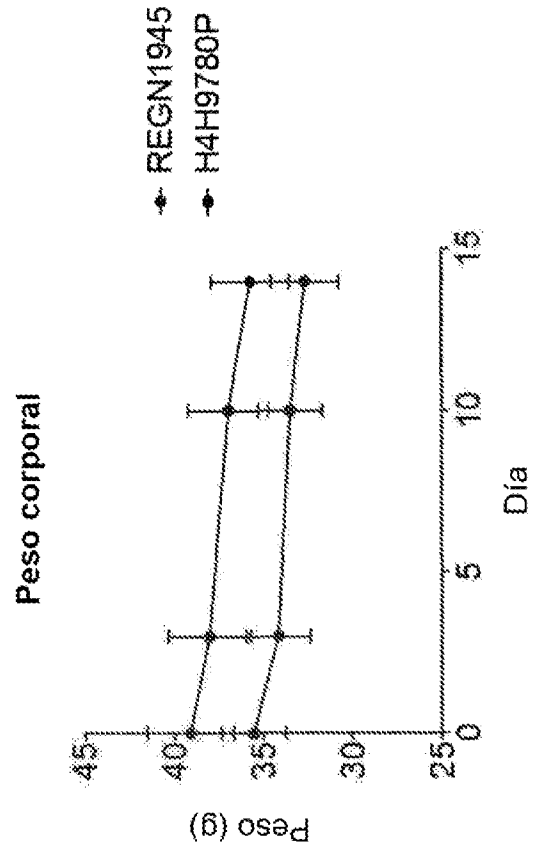


FIG. 17C