INSERCIÓN DE ANTI-TFR:GAA Y ANTI-CD63:GAA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio a la solicitud de EE. UU. núm. 63/306.040, presentada el 2 de febrero de 2022, y la solicitud de EE. UU. núm. 63/369.902, presentada el 29 de julio de 2022, cada uno de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO COMO UN ARCHIVO XML A TRAVÉS DE EFS WEB

El Listado de Secuencias escrito en el archivo 590204SEQLIST.xml tiene 1,16 megabytes, se creó el 26 enero de 2023 y se incorpora en la presente como referencia.

ANTECEDENTES

La terapia génica ha sido reconocida durante mucho tiempo por su enorme potencial en la forma en que se abordan y tratan las enfermedades humanas. En lugar de depender de medicamentos o cirugía, los pacientes con factores genéticos subyacentes se pueden tratar atacando

directamente la causa subyacente. Además, al enfocarse en la causa genética subyacente, la terapia génica puede proporcionar el potencial para curar a los pacientes de manera efectiva. Sin embargo, las aplicaciones clínicas de los enfoques de la terapia génica aún requieren mejoras en varios aspectos. Además, el tratamiento temprano en la vida puede presentar obstáculos adicionales debido al ambiente único en los pacientes neonatales.

La enfermedad de Pompe (PD, por sus siglas en inglés), o enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, es una enfermedad lisosomal monogénica causada por una deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal alfa glucosidasa ácida (GAA, por sus siglas en inglés). La deficiencia de GAA da como resultado una acumulación de su sustrato, el glucógeno, en los lisosomas de las células en los tejidos, incluido el músculo esquelético y cardíaco. Esta acumulación aberrante de glucógeno en las miofibras da como resultado un daño progresivo del tejido muscular, con síntomas que pueden incluir cardiomegalia, debilidad muscular de leve a profunda y, en última instancia, la muerte por insuficiencia cardíaca o respiratoria. La PD de inicio infantil (IOPD, por sus siglas en inglés) se asocia con una actividad de la GAA de <1 % de lo normal. Es grave y afecta órganos viscerales, músculos y el sistema nervioso central (SNC, por sus siglas en inglés). La PD de inicio tardío (LOPD, por sus siglas en inglés) se asocia con una actividad

de la GAA del 2-40 %. Es menos grave, con afectación principalmente respiratoria y del músculo esquelético.

La única terapia aprobada para la PD es la terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés). La GAA humana recombinante (rh) se administra mediante infusión intravenosa a los pacientes cada dos semanas. Si bien la ERT ha tenido mucho éxito en el tratamiento de las manifestaciones cardíacas de la PD, el músculo esquelético y el CNS siguen siendo mínimamente tratados por la ERT. El mecanismo principal por el cual la rhGAA llega a los lisosomas es a través de la captación por el receptor de manosa 6-fosfato (M6P, por sus siglas en inglés) independiente de cationes (CIMPR, por sus siglas en inglés), que se une a la M6P en la rhGAA. Sin embargo, la expresión de CI-MPR en el músculo esquelético es muy baja y la rhGAA está poco fosforilada en manosa 6. Además, la CI-MPR puede desviarse a los autofagosomas de las células afectadas, en lugar de a los lisosomas, mientras que una gran cantidad del fármaco también es absorbida por el hígado, un órgano que no tiene una patología primaria en la PD. La ERT no cruza la barrera hematoencefálica. Además, la PD puede requerir tratamiento temprano en la vida, lo que presenta obstáculos adicionales debido al ambiente único en los pacientes neonatales y juveniles.

SUMARIO

Se proporcionan constructos y composiciones de ácido nucleico que permiten la inserción de una secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana, tal como un locus *ALB* endógeno y/o la expresión de la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA). Los constructos y composiciones de ácido nucleico se pueden usar en métodos para integrar o insertar un ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para expresar un proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células o un sujeto, y métodos para tratar la enfermedad de Pompe o la deficiencia de GAA en un sujeto, y método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto tal como sujetos con actividad o expresión reducida de GAA y en un sujeto diagnosticado con la enfermedad de Pompe, incluidos los sujetos neonatales. En algunas modalidades, la célula, la población de células o el sujeto es una célula neonatal, una población de células neonatales o un sujeto neonatal.

En un aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de entrega fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, y se inserta el constructo de ácido nucleico en el locus genómico diana. En un aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales.

Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, y se inserta el constructo de ácido nucleico en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula neonatal o una población de células neonatales, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

(a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula neonatal o una población de células neonatales. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula neonatal o a la población de células

neonatales: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula hepática o la población de células neonatales es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es un hepatocito o la población de células neonatales es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula humana o la población de células neonatales es una población de células humanas. En algunos de dichos métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12

semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células neonatales es *in vitro* o *ex vivo*. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es *in vivo* en un sujeto neonatal o la población de células neonatales es *in vivo* en un sujeto neonatal.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un

agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, y se inserta el constructo de ácido nucleico en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, y se inserta el constructo de ácido nucleico en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal en una célula neonatal o una población de células

neonatales en un sujeto neonatal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del

locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la proteína

terapéutica multidominio expresada se administra e internaliza en el músculo esquelético y el tejido cardíaco del sujeto. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula hepática o la población de células neonatales es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es un hepatocito o la población de células neonatales es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula humana o la población de células neonatales es una población de células humanas. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto neonatal que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico

se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto neonatal que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un

dominio de suministro fusionado a una alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado a una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la

proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe. En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. Algunos de tales métodos

comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos

de tales métodos, el método da como resultado niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético y/o tejido cardíaco en el sujeto comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos de tales métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesite. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que

comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío. En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína

terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y el tejido cardíaco en el sujeto.

En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio

a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml, o al menos aproximadamente 10 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método logra niveles de actividad de la alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al

menos aproximadamente 70 %, al menos al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio infantil y el método logra niveles de actividad de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 1 % o más que aproximadamente 1 % de lo normal; o. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio tardío y el método logra niveles de actividad de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal o más de aproximadamente 40 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el método aumenta la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal sobre la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal inicial del sujeto en al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 %. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica

multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses después de la administración. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica

multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses después de la administración.

En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto humano.

En algunos de dichos métodos, el método comprende además evaluar la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto neonato antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto. En algunos de dichos métodos, la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8. En algunos de dichos métodos, evaluar la inmunidad preexistente al AAV comprende evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión a CD63 se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión a CD63 está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión a CD63 está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión a CD63 comprende una proteína de unión al antígeno anti-CD63. En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión a CD63 comprende un anticuerpo anti-CD63, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión a CD63 es el fragmento variable monocatenario (scFv). En algunos de dichos métodos, el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En algunos de dichos métodos, el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos

91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186, está

optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186.

En algunos de tales métodos, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %

idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunos de tales métodos, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunos de dichos métodos, la

alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de

ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de

codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de dichos métodos, la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunos de dichos métodos, la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %,

al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, y la proteína terapéutica

multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunos de tales métodos, la

secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la

secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana a través de la unión de extremos no homólogos. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana a través de una reparación dirigida por homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica

multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirija la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o en una nanopartícula lipídica. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico está en el vector de ácido nucleico. En algunos de tales métodos, el vector de ácido nucleico es un vector viral. En algunos de dichos métodos, el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160. En algunos de tales métodos, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV). En

algunos de tales métodos, el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74 o un vector AAVhu.37. En algunos de tales métodos, el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8, por sus siglas en inglés). En algunos de tales métodos, el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente

en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

En algunos de tales métodos, el locus genómico diana es un gen *albúmina*, opcionalmente en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunos de tales métodos, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina. En algunos de tales métodos, el agente de nucleasa comprende: (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés); (b) una nucleasa efectora de tipo activador de transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés); o (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía.

En algunos de tales métodos, el agente de nucleasa comprende: (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia

diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía. En algunos de tales métodos, la secuencia diana del ARN guía está en el intrón 1 de un gen albúmina. En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN es al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntico a la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núm. de

ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el ARN guía comprende de una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN. En algunos de tales métodos, el ARN guía comprende al menos una modificación. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2’-O-metilo. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende un enlace de fosforotioato entre nucleótidos. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros

cinco nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, el ARN guía es un ARN guía único (sgRNA, por sus siglas en inglés). En algunos

de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía.

En algunos de tales métodos, la proteína Cas es una proteína Cas9. En algunos de tales métodos, la proteína Cas9 se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9, una proteína *Staphylococcus aureus* Cas9, una proteína *Campylobacter jejuni* Cas9, una proteína *Streptococcus thermophilus* Cas9 o una proteína *Neisseria meningitidis* Cas9. En algunos de tales métodos, la proteína Cas se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9. En algunos de dichos métodos, la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11. En algunos de tales métodos, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas está optimizado por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas. En algunos

de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina. En algunos de tales métodos, la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunos de tales métodos, la uridina modificada es pseudouridina. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina o N1-metil-

pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una tapa 5’ y comprende una secuencia de poliadenilación.

En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en la forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio

comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, y en donde

el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil -pseudouridina, comprende una tapa 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está

flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, y en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una tapa 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la

proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunos de tales métodos, la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica. En algunos de tales métodos, la nanopartícula lipídica comprende un lípido

catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido estabilizado. En algunos de tales métodos, el lípido catiónico es el lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonilo)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato). En algunos de tales métodos, el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC, por sus siglas en inglés). En algunos de tales métodos, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunos de tales métodos, el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el lípido catiónico es el lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es el colesterol y el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG.

En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, y el ARN guía comprende las sec. con núm. de ident.: 68 o 100, en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas y el ARNm

que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está

flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil- pseudouridina, comprende una tapa 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica

la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una tapa 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A,

DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la

ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En otro aspecto, se proporcionan una célula neonatal o una población de células neonatales elaboradas mediante cualquiera de los métodos anteriores. En otro aspecto, se proporciona una célula o una población de células elaboradas mediante cualquiera de los métodos anteriores. En otro aspecto, se proporciona una célula neonatal o una población de células neonatales que comprenden un constructo de ácido nucleico insertada en un locus genómico diana, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal insertada en un locus genómico diana, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. En otro aspecto, se proporciona una célula neonatal o una población de células neonatales que comprenden un constructo de ácido nucleico insertada en un locus genómico diana, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal insertada en un locus genómico diana. En algunas de tales células neonatales o poblaciones

de células neonatales, la célula neonatal es una célula hepática o la población de células neonatales es una población de células hepáticas. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es un hepatocito o la población de células neonatales es una población de hepatocitos. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es una célula humana o la población de células neonatales es una población de células humanas. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o

poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células neonatales es *in vitro* o *ex vivo*. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es *in vivo* en un sujeto o la población de células neonatales es *in vivo*. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, se expresa la proteína terapéutica multidominio.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión a CD63 se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión a CD63 está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión a CD63 está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión a CD63 comprende una proteína de unión al antígeno anti-CD63. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión a CD63 comprende un anticuerpo anti-CD63, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv).

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión a CD63 es el fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.:

183, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En

algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %,

al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al

menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos

90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones y carece de CpG. En

algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos

96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde la

secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína

terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736,

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión

de la proteína terapéutica multidominio, y en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el locus genómico diana es un gen *albúmina*, opcionalmente en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está carece de CpG en relación con una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal de tipo salvaje, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está carece de CpG en relación con una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal de tipo salvaje. En algunas de tales composiciones, el dominio de

suministro de unión a CD63 se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunas de tales composiciones, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos

97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec.

con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está carece de CpG en relación con una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal de tipo salvaje. En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión a CD63 se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunas de tales composiciones, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa

lisosomal. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa

lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En

algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión a CD63 está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión a CD63 está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión a CD63 comprende una proteína de unión al antígeno anti-CD63. En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión a CD63 comprende un anticuerpo anti-CD63, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión a CD63 es el fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas de dichas composiciones, el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de dichas composiciones, el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %,

al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv

que comprende la sec. con núm. de ident.: 183, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186.

En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de dichas composiciones, la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 193. En algunas de dichas composiciones, la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 193, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %

o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736,

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario. En algunas de tales

composiciones, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirija la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o en una nanopartícula lipídica. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico está en el vector de ácido nucleico. En algunas de tales composiciones, el vector de ácido nucleico es un vector viral. En algunas de dichas composiciones, el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico

está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160. En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV). En algunas de tales composiciones, el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74 o un vector AAVhu.37. En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8). En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en

donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

En algunas de tales composiciones, la composición comprende además un agente de nucleasa que se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana. En algunas de tales composiciones, el locus genómico diana es un gen albúmina, opcionalmente en donde el gen albúmina es un gen albúmina humana. En algunas de tales composiciones, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina. En algunas de tales composiciones, el agente de nucleasa comprende: (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés); (b) una nucleasa efectora de tipo activador de transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés); o (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que

codifica la proteína Cas; y (ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía.

En algunas de tales composiciones, el agente de nucleasa comprende: (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la secuencia diana del ARN guía está en el intrón 1 de un gen albúmina. En algunas de tales composiciones, el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a

la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. En algunas de dichas composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de dichas composiciones, el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN consiste en

la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

En algunas de tales composiciones, el ARN guía está en la forma de ARN. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende al menos una modificación. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende un enlace de fosforotioato entre nucleótidos. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos

una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, el ARN guía es un ARN guía único (sgRNA). En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

En algunas de tales composiciones, la proteína Cas es una proteína Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas9 se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9, una proteína *Staphylococcus aureus* Cas9, una

proteína *Campylobacter jejuni* Cas9, una proteína *Streptococcus thermophilus* Cas9 o una proteína *Neisseria meningitidis* Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11. En algunas de tales composiciones, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas está optimizado por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana. En algunas de tales composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina. En algunas de tales composiciones, la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunas de tales composiciones, la uridina modificada es pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina. En algunas de

tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de dichas composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunas de dichas composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de dichas composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

En algunas de dichas composiciones, el ARN guía está en la forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y en donde la composición

comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y

opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil- pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato

entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión

de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica. En algunas de tales composiciones, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido estabilizado. En algunas de tales composiciones, el lípido catiónico es el lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonilo)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato). En algunas de tales composiciones, el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC). En algunas de tales composiciones, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunas de tales composiciones, el lípido estabilizado es

PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el lípido catiónico es el lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es el colesterol y el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG.

En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica

multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii)

uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas proteína, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en

el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende una

cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de inserción del ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de expresión de la proteína terapéutica multidominio a partir de un locus genómico diana en una célula o una población de células. En algunas

de tales composiciones, la composición es para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de inserción del ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de expresión de la proteína terapéutica multidominio a partir de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células en un sujeto. En algunas de tales composiciones, la célula es una célula neonatal y la población de células es una población de células neonatales. En algunas de tales composiciones, la célula no es una célula neonatal y la población de células no es una población de células neonatales. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de

tratamiento de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita. En algunas de tales composiciones, el sujeto es un sujeto neonato. En algunas de tales composiciones, el sujeto no es un sujeto neonatal.

En otro aspecto, se proporciona una célula que comprende cualquiera de las composiciones anteriores. En algunas de tales células, el constructo de ácido nucleico se integra en un locus genómico diana, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus genómico diana, o en donde el constructo de ácido nucleico se integra en el intrón 1 de un locus de *albúmina* endógena, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus de *albúmina* endógena. En algunas de tales células, la célula es una célula humana. En algunas de tales células, la célula es una célula hepática. En algunas de tales células, la célula hepática es un hepatocito. En algunas de tales células, la célula es una célula neonatal. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de

las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula no es una célula neonatal. En algunas de tales células, la célula es *in vivo*. En algunas de tales células, la célula es *in vitro* o *ex vivo*.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de estos métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una

célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio

de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus

genómico diana en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas. En algunos de tales métodos, la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales. En algunos de dichos métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula

neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales. En algunos de tales métodos, la célula es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células es *in vitro* o *ex vivo*. En algunos de tales métodos, la célula es *in vivo* en un sujeto o la población de células es *in vivo* en un sujeto.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se

inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células en un sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una

proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa

en la célula. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se administra e internaliza en el músculo esquelético y el tejido cardíaco del sujeto. En algunos de tales métodos, la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas. En algunos de tales métodos, la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales. En algunos de dichos

métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el

agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado a la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos

para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido

nucleico y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado a la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe. En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe, opcionalmente en donde el dominio

de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado a la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta

en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío.

En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato. En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, tejido cardíaco o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos,

el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético y/o tejido cardíaco en el sujeto comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos de tales métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la

nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado a la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa

a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío. En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml, o al menos aproximadamente 10 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml

y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método logra niveles de actividad de la alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio infantil, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 1 % o más de aproximadamente el 1 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio tardío, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 40 % de lo normal o más de aproximadamente el 40 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el método aumenta la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal sobre la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal inicial del sujeto en al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al

menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 %. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración.

En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración.

En algunos de tales métodos, el método comprende además la evaluación de la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto. En algunos de dichos métodos, la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8. En algunos de dichos métodos, evaluar la inmunidad preexistente al AAV comprende evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En

algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto humano. En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

Se proporcionan constructos y composiciones de ácido nucleico que permiten la inserción de una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana, tal como un locus *ALB* endógeno y/o la expresión de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA). Los constructos y composiciones de ácido nucleico se pueden

usar en métodos para integrar o insertar un ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para expresar un proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células o un sujeto, y métodos para tratar la enfermedad de Pompe o la deficiencia de GAA en un sujeto, y método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto tal como sujetos con actividad o expresión reducida de GAA y en un sujeto diagnosticado con la enfermedad de Pompe, incluidas las células y sujetos neonatales. En algunas modalidades, la célula, la población de células o el sujeto es una célula neonatal, una población neonatal de células o un sujeto neonatal.

En un aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la

proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, y se inserta el constructo de ácido nucleico en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula neonatal o una población de células neonatales. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico

diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula hepática o la población de células neonatales es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es un hepatocito o la población de células neonatales es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula humana o la población de células neonatales es una población de células humanas. En algunos de dichos métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal

es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células neonatales es *in vitro* o *ex vivo*. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es *in vivo* en un sujeto neonatal o la población de células neonatales es *in vivo* en un sujeto neonatal.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, y se inserta el constructo de ácido nucleico en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal en una célula neonatal o una población de células neonatales

en un sujeto neonatal. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales en un sujeto neonatal. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un gen diana en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se administra e internaliza en el músculo esquelético, el corazón y en el tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos de tales métodos, la célula

neonatal es una célula hepática o la población de células neonatales es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es un hepatocito o la población de células neonatales es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula neonatal es una célula humana o la población de células neonatales es una población de células humanas.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto neonatal que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un

sujeto neonatal que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe. En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en

donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético, corazón y/o tejido del sistema nervioso central en el sujeto comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos de tales métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o evita la

pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesite. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal: (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal; y (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad

de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío. En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como

resultado niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml, o al menos aproximadamente 10 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método logra niveles de

actividad de la alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio infantil, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 1 % o más de aproximadamente el 1 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio tardío, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 40 % de lo normal o más de aproximadamente el 40 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el método aumenta la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal sobre la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal inicial del sujeto en al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %

o al menos aproximadamente 100 %. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína

terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración.

En algunos de dichos métodos, el método comprende además evaluar la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto neonato antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto. En algunos de dichos métodos, la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8. En algunos de dichos métodos, evaluar la inmunidad preexistente al AAV comprende evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión al TfR se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión al TfR está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión al TfR está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión al TfR comprende una proteína de unión al antígeno anti-TfR. En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 o 527 (o una variante de estas); y/o (ii) una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 o 532 (o una variante de estas). En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (1) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (3) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (4) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (5) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (6) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (7) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (8) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (9) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (10) una

HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (11) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (12) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (13) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (14) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (15) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (16) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (17) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (18) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (19) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (20) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (21) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (22) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (23) una

HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (24) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (25) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (26) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (27) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o

una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (28) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (29) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (30) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (31) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); o (32) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (1) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta). En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 218 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 219

(o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 220 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 223 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 224 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 225 (o una variante de esta); (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 228 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 229 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 230 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 233 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 234 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 235 (o una variante de esta); (c) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 238 (o

una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 239 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 240 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 243 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 244 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 245 (o una variante de esta); (d) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 248 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 249 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 250 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 253 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 254 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 255 (o una variante de esta); (e) una HCVR que

comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 258 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 259 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 260 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 263 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 264 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 265 (o una variante de esta); (f) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 268 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 269 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 270 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 273 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 274 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 275 (o una variante de esta); (g) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 278 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 279 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 280 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 283 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 284 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 285 (o una variante de esta); (h) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 288 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 289 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 290 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 293 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 294 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 295 (o una variante de esta); (i) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 298 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 299 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 300 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 303 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 304 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 305 (o una variante de esta); (j) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 308 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 309 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 310 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 313 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 314 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 315 (o una variante de esta); (k) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 318 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 319 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 320 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 323 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 324 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 325 (o una variante de esta); (l) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 328 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 329 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 330 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 333 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 334 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 335 (o una variante de esta); (m) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 338 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 339 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 340 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 343 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 344 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 345 (o una variante de esta); (n) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 348 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 349

(o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 350 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 353 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 354 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 355 (o una variante de esta); (o) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 358 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 359 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 360 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 363 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 364 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 365 (o una variante de esta); (p) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 368 (o

una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 369 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 370 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 373 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 374 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 375 (o una variante de esta); (q) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 378 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 379 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 380 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 383 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 384 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 385 (o una variante de esta); (r) una HCVR que

comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 388 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 389 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 390 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 393 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 394 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 395 (o una variante de esta); (s) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 398 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 399 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 400 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 403 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 404 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 405 (o una variante de esta); (t) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 408 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 409 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 410 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 413 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 414 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 415 (o una variante de esta); (u) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 418 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 419 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 420 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 423 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 424 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 425 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 428 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 429 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 430 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 433 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 434 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 435 (o una variante de esta); (w) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 448 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 449 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 450 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 453 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 454 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 455 (o una variante de esta); (y) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta); (z) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 468 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 469 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 470 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 473 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 474 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 475 (o una variante de esta); (aa) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 478 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 479

(o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 480 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 483 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 484 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 485 (o una variante de esta); (ab) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 488 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 489 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 490 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 493 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 494 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 495 (o una variante de esta); (ac) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 498 (o

una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 499 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 500 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 503 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 504 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 505 (o una variante de esta); (ad) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 508 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 509 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 510 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 513 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 514 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 515 (o una variante de esta); (ae) una HCVR que

comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 518 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 519 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 520 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 523 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 524 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 525 (o una variante de esta); y/o (af) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 528 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 529 (o una variante del mismo), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 530 (o una variante del mismo); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 533 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 534 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 535 (o una variante de esta). En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); o (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante del esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 463

(o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta). En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (iii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (iv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta

en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (vi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (vii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (viii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (ix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (xi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante

de esta); (xii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (xiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (xiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (xv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (xvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (xvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (xviii) una HCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (xix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (xx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (xxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (xxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (xxiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (xxiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (xxv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (xxvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (xxvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (xxviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (xxix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (xxx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante

de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (xxxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); y/o (xxxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). En algunos de tales métodos, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta). En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión al TfR comprende un anticuerpo anti-TfR, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunos de tales métodos, el dominio de suministro de unión al TfR es el fragmento variable monocatenario (scFv), opcionalmente en

donde la proteína terapéutica multidominio comprende dominios dispuestos en la siguiente orientación: N'-región variable de cadena pesada-región variable de cadena liviana-alfa-glucosidasa-C' lisosomal o N'-región variable de cadena liviana-región variable de cadena pesada-alfa-glucosidasa-C' lisosomal, opcionalmente en donde el scFv y la alfa glucosidasa lisosomal se conectan por un conector peptídico, y opcionalmente en donde el conector peptídico que es -$(GGGGS)_m$- (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, opcionalmente en donde las regiones variables de scFv se conectan por un conector peptídico, y opcionalmente en donde el conector peptídico es -$(GGGGS)_m$- (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, En algunos de tales métodos, la proteína terapéutica multidominio comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena liviana (V_L), y una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la V_H, V_L y la alfa glucosidasa lisosomal se organizan de la siguiente manera: (i) V_L-V_H-alfa glucosidasa lisosomal; (ii) V_H-V_L-alfa glucosidasa lisosomal; (iii) V_L-$[(GGGGS)_3]$-V_H-$[(GGGGS)_2]$-alfa glucosidasa lisosomal; o V_H-$[(GGGGS)_3]$-V_L-$[(GGGGS)_2]$-alfa glucosidasa lisosomal. En algunos de tales métodos, el scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554, opcionalmente en donde el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En algunos de

tales métodos, el scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554, opcionalmente en donde el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590. En

algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599 y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o

al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599, está optimizada por codones o carece de CpG, y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las

sec. con núms. de ident.: 590-592, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente la secuencia codificante

de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590.

En algunos de tales métodos, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos

94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %,

al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunos de tales métodos, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de dichos métodos, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones

o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que

comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de

codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones o carece de CpG. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones y carece de CpG. En algunos de tales métodos, la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En algunos de tales métodos, la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a las sec. con núms. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm.

de ident.: 729. En algunos de tales métodos, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idéntica a cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica

a la sec. con núm. de ident.: 733, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %,

al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586 y está optimizada por codones o carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586 se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la

sec. con núm. de ident.: 733, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729, la

secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, En algunos de tales métodos, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm.

de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de

codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana a través de la unión de extremos no homólogos. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana a través de una reparación dirigida por homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales métodos, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o

secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la

sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirija la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5′ a 3′: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirija la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o en una nanopartícula lipídica. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico está en el vector de ácido nucleico. En algunos de tales métodos, el vector de ácido nucleico es un vector viral. En algunos de dichos métodos, el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec.

con núm. de ident. 160. En algunos de tales métodos, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV). En algunos de tales métodos, el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74 o un vector AAVhu.37. En algunos de tales métodos, el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8, por sus siglas en inglés). En algunos de tales métodos, el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica

multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia

de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico

comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

En algunos de tales métodos, el locus genómico diana es un gen *albúmina*, opcionalmente en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunos de tales métodos, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina. En algunos de tales métodos, el agente de nucleasa comprende: (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés); (b) una nucleasa efectora de tipo activador de transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés); o (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía

comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía.

En algunos de tales métodos, el agente de nucleasa comprende: (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía. En algunos de tales métodos, la secuencia diana del ARN guía está en el intrón 1 de un gen albúmina. En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN es al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntico a la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento

dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunos de tales métodos, el ARN guía comprende de una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36. En algunos de dichos métodos, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN. En algunos de tales métodos, el ARN guía comprende al menos una modificación. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2’-O-metilo. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende un enlace de fosforotioato entre nucleótidos. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, la al menos una modificación comprende: (i)

uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunos de tales métodos, el ARN guía es un ARN guía único (sgRNA, por sus siglas en inglés). En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía.

En algunos de tales métodos, la proteína Cas es una proteína Cas9. En algunos de tales métodos, la proteína Cas9 se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9, una proteína *Staphylococcus aureus* Cas9, una proteína *Campylobacter jejuni* Cas9, una proteína *Streptococcus thermophilus* Cas9 o una proteína *Neisseria meningitidis* Cas9. En algunos de tales métodos, la proteína Cas se deriva de

una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9. En algunos de dichos métodos, la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11. En algunos de tales métodos, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas está optimizado por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina. En algunos de tales métodos, la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunos de tales métodos, la uridina modificada es pseudouridina. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'. En algunos de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos

de tales métodos, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una tapa 5’ y comprende una secuencia de poliadenilación.

En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en la forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la

secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176,

opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se

flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, y en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil -pseudouridina, comprende una tapa 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el método comprende administrar el ARN guía en forma de

ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, y en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una tapa 5’ y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176,

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se

flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico

comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunos de tales métodos, la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica. En algunos de tales

métodos, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido estabilizado. En algunos de tales métodos, el lípido catiónico es el lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonilo)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato). En algunos de tales métodos, el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC, por sus siglas en inglés). En algunos de tales métodos, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunos de tales métodos, el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el lípido catiónico es el lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es el colesterol y el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG.

En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, y el ARN guía comprende las sec. con núm. de ident.: 68 o 100, en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico

comprende un ARNm que codifica la proteína Cas y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde

la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico

comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres

nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil- pseudouridina, comprende una tapa 5’ y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el método comprende administrar el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv)

nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde el método comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una tapa 5’ y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176,

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se

flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico

comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En otro aspecto, se proporciona una célula neonatal o una población de células neonatales elaborada mediante cualquiera de los métodos anteriores. En otro aspecto, se proporciona una célula neonatal o una población

de células neonatales que comprende un constructo de ácido nucleico insertada en un locus genómico diana, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal insertada en un locus genómico diana. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es una célula hepática o la población de células neonatales es una población de células hepáticas. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es un hepatocito o la población de células neonatales es una población de hepatocitos. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es una célula humana o la población de células neonatales es una población de células humanas. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la

población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal o la población de células neonatales proceden de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células neonatales es *in vitro* o *ex vivo*. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la célula neonatal es *in vivo* en un sujeto o la población de células neonatales es *in vivo*.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, se expresa la proteína terapéutica multidominio. En algunas de estas células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión al TfR se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión al TfR está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión al TfR está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de

tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión al TfR comprende una proteína de unión al antígeno anti-TfR. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 o 527 (o una variante de estas); y/o (ii) una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 o 532 (o una variante de estas). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (1) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (3) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (4) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (5) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (6) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3

de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (7) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (8) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (9) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (10) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante

de esta); (11) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (12) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (13) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (14) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (15) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (16) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (17) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (18) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (19) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3

de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (20) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (21) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (22) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (23) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante

de esta); (24) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (25) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (26) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (27) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (28) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (29) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (30) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (31) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); o (32) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3

de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (1) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 218 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 219 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 220 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 223 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 224 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 225 (o una variante de esta); (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 228 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 229 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 230 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 233 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 234 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 235 (o una variante de esta); (c) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 238 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 239 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 240 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 243 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 244 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 245 (o una variante de esta); (d) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 248 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 249 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 250 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 253 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 254 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 255 (o una variante de esta); (e) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 258 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 259 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 260 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 263 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 264 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 265 (o una variante de esta); (f) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 268 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 269 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 270 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 273 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 274 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 275 (o una variante de esta); (g) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 278 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 279 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 280 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 283 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 284 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 285 (o una variante de esta); (h) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 288 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 289 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 290 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 293 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 294 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 295 (o una variante de esta); (i) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 298 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 299 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 300 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 303 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 304 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 305 (o una variante de esta); (j) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 308 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 309 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 310 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 313 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 314

(o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 315 (o una variante de esta); (k) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 318 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 319 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 320 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 323 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 324 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 325 (o una variante de esta); (l) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 328 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 329 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 330 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 333 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 334 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 335 (o una variante de esta); (m) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 338 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 339 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 340 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 343 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 344 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 345 (o una variante de esta); (n) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 348 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 349 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 350 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 353 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 354 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 355 (o una variante de esta); (o) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 358 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 359 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 360 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 363 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 364 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 365 (o una variante de esta); (p) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 368 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 369 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 370 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 373 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 374 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 375 (o una variante de esta); (q) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 378 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 379 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 380 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 383 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 384 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 385 (o una variante de esta); (r) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 388 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 389 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 390 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 393 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 394 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 395 (o una variante de esta); (s) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 398 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 399 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 400 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 403 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 404 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 405 (o una variante de esta); (t) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 408 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 409 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 410 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 413 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 414 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 415 (o una variante de esta); (u) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 418 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 419 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 420 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 423 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 424 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 425 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 428 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 429 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 430 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 433 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 434 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 435 (o una variante de esta); (w) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.:

444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 448 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 449 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 450 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 453 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 454 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 455 (o una variante de esta); (y) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 463 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta); (z) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 468 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 469 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 470 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 473 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 474 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 475 (o una variante de esta); (aa) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 478 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 479 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 480 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 483 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 484 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 485 (o una variante de esta); (ab) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 488 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 489 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 490 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 493 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 494 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 495 (o una variante de esta); (ac) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 498 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 499 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 500 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 503 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 504 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 505 (o una variante de esta); (ad) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 508 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 509 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 510 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 513 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 514 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 515 (o una variante de esta); (ae) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 518 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 519 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 520 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 523 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 524 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 525 (o una variante de esta); y/o (af) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 528 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 529 (o una variante del mismo), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 530 (o una variante del mismo); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 533 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 534 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 535 (o una variante de esta). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la

proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); o (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante del esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.:

464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (iii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (iv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (vi) una

HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (vii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (viii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (ix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (xi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (xii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (xiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (xiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (xv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (xvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (xvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (xviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o

una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (xix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (xx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (xxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (xxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (xxiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (xxiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende

la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (xxv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (xxvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (xxvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (xxviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (xxix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (xxx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta

en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (xxxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); y/o (xxxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta). En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión al TfR comprende un anticuerpo anti-TfR, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas de estas células neonatales o poblaciones de células neonatales, el dominio de suministro de unión al

TfR es el fragmento variable monocatenario (scFv), opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende dominios dispuestos en la siguiente orientación: N'-región variable de cadena pesada-región variable de cadena liviana-alfa-glucosidasa-C' lisosomal o N'-región variable de cadena liviana-región variable de cadena pesada-alfa-glucosidasa-C' lisosomal, opcionalmente en donde el scFv y la alfa glucosidasa lisosomal se conectan por un conector peptídico, y opcionalmente en donde el conector peptídico que es $-(GGGGS)_m-$ (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, opcionalmente en donde las regiones variables de scFv se conectan por un conector peptídico, y opcionalmente en donde el conector peptídico es $-(GGGGS)_m-$ (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína terapéutica multidominio comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena liviana (V_L) y una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la V_H, V_L y la alfa glucosidasa lisosomal se organizan de la siguiente manera: (i) V_L-V_H-alfa glucosidasa lisosomal; (ii) V_H-V_L-alfa glucosidasa lisosomal; (iii) V_L-$[(GGGGS)_3]$-V_H-$[(GGGGS)_2]$-alfa glucosidasa lisosomal; o (iv) V_H-$[(GGGGS)_3]$-V_L-$[(GGGGS)_2]$-alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec.

con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554, opcionalmente en donde el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554, opcionalmente en donde el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec.

con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599 y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599, está optimizada por codones o carece de CpG, y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos

99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv

comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal

está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %,

al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.:

176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas células neonatales o poblaciones de células neonatales, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos

93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos

94 %, al menos 95 %, al menos al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la

secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico

comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, y la proteína terapéutica multidominio

comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a

la sec. con núm. de ident.: 729, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586 y está optimizada por codones o carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586 se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, la secuencia codificante

para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, la secuencia codificante para la proteína terapéutica

multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta

en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con

núm. de ident.: 729, En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana. En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en el constructo de ácido nucleico se une

operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado. En algunas de estas células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende de 5′ a 3′: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio

comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana. En algunas de estas células neonatales o poblaciones de células neonatales, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde

la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana.

En algunas de tales células neonatales o poblaciones de células neonatales, el locus genómico diana es un gen *albúmina*, opcionalmente en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunas de tales células

neonatales o poblaciones de células neonatales, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está carece de CpG en relación con una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal de tipo salvaje. En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión al TfR se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunas de tales composiciones, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %,

al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está carece de CpG en relación con una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal de tipo salvaje. En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión al TfR se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un conector peptídico. En algunas de tales composiciones, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en

donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173,

opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión al TfR está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación para el dominio de suministro de unión al TfR está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión al TfR comprende una

proteína de unión al antígeno anti-TfR. En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 o 527 (o una variante de estas); y/o (ii) una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 o 532 (o una variante de estas). En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (1) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (3) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (4) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (5) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (6) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (7) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (8) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (9) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (10) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (11) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR

que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (12) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (13) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (14) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (15) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (16) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (17) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (18) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (19) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (20) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (21) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (22) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (23) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (24) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende

la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (25) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (26) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (27) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (28) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o

una variante de esta); (29) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (30) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (31) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); o (32) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (1) una

HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta). En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 218 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 219 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 220 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 223 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 224 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 225 (o una variante de esta); (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 228 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 229 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 230 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 233 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 234 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 235 (o una variante de esta); (c) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 238 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 239 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 240 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 243 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 244

(o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 245 (o una variante de esta); (d) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 248 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 249 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 250 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 253 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 254 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 255 (o una variante de esta); (e) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 258 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 259 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 260 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 263 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 264 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 265 (o una variante de esta); (f) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 268 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 269 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 270 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 273 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 274 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 275 (o una variante de esta); (g) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 278 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 279 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 280 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 283 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 284 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 285 (o una variante de esta); (h) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 288 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 289 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 290 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 293 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 294 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 295 (o una variante de esta); (i) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 298 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 299 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 300 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 303 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 304 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 305 (o una variante de esta); (j) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 308 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 309 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 310 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 313 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 314 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 315 (o una variante de esta); (k) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 318 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 319 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 320 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 323 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 324 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 325 (o una variante de esta); (l) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 328 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 329 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 330 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 333 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 334 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 335 (o una variante de esta); (m) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 338 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 339 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 340 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 343 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 344 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 345 (o una variante de esta); (n) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 348 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 349 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 350 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 353 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 354 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 355 (o una variante de esta); (o) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 358 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 359 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 360 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 363 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 364 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 365 (o una variante de esta); (p) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 368 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 369 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 370 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 373 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 374

(o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 375 (o una variante de esta); (q) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 378 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 379 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 380 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 383 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 384 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 385 (o una variante de esta); (r) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 388 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 389 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 390 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 393 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 394 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 395 (o una variante de esta); (s) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 398 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 399 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 400 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 403 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 404 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 405 (o una variante de esta); (t) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 408 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 409 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 410 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 413 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 414 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 415 (o una variante de esta); (u) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 418 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 419 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 420 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 423 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 424 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 425 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 428 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 429 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 430 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 433 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 434 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 435 (o una variante de esta); (w) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 448 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 449 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 450 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 453 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 454 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 455 (o una variante de esta); (y) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta); (z) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 468 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 469 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 470 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 473 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 474 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 475 (o una variante de esta); (aa) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 478 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 479 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 480 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 483 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 484 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 485 (o una variante de esta); (ab) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 488 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 489 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 490 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 493 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 494 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 495 (o una variante de esta); (ac) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 498 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 499 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 500 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 503 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 504

(o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 505 (o una variante de esta); (ad) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 508 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 509 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 510 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 513 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 514 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 515 (o una variante de esta); (ae) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 518 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 519 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 520 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 523 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 524 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 525 (o una variante de esta); y/o (af) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 528 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 529 (o una variante del mismo), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 530 (o una variante del mismo); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 533 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 534 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 535 (o una variante de esta). En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); o (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante del esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta). En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (iii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (iv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (vi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (vii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 282 (o una variante de esta); (viii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (ix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (xi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (xii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (xiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (xiv) una

HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (xv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (xvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (xvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (xviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (xix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (xx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (xxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (xxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (xxiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (xxiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (xxv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (xxvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o

una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (xxvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (xxviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (xxix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (xxx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (xxxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); y/o (xxxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende

la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). En algunas de tales composiciones, la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta). En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión al TfR comprende un anticuerpo anti-TfR, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas de tales composiciones, el dominio de suministro de unión al TfR es el fragmento variable monocatenario (scFv), opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende dominios dispuestos en la siguiente orientación: N'-región variable de cadena pesada-región variable de cadena liviana-alfa-glucosidasa-C' lisosomal o N'-región variable de cadena liviana-región variable de cadena pesada-alfa-glucosidasa-C' lisosomal, opcionalmente en donde el scFv y la alfa glucosidasa lisosomal se conectan por un conector peptídico, y opcionalmente en donde el conector peptídico que es $-(GGGGS)_m-$ (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m

es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, opcionalmente en donde las regiones variables de scFv se conectan por un conector peptídico, y opcionalmente en donde el conector peptídico es $-(GGGGS)_m-$ (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, En algunas de tales composiciones, la proteína terapéutica multidominio comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena liviana (V_L), y una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la V_H, V_L y la alfa glucosidasa lisosomal se organizan de la siguiente manera: (i) V_L-V_H-alfa glucosidasa lisosomal; (ii) V_H-V_L-alfa glucosidasa lisosomal; (iii) V_L-$[(GGGGS)_3]$-V_H-$[(GGGGS)_2]$-alfa glucosidasa lisosomal; o (iv) V_H-$[(GGGGS)_3]$-V_L-$[(GGGGS)_2]$-alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de tales composiciones, el scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554, opcionalmente en donde el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En algunas de tales composiciones, el scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554, opcionalmente en donde el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a una cualquiera

de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599 y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, en donde la secuencia codificante de scFv es

al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.:

587-599, está optimizada por codones o carece de CpG, y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590, se optimiza por codones y

carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 551. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 590-592, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590.

En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones o carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En algunas de tales composiciones, la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos

99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:

729. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %,

o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %,

al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586 y está optimizada por codones o carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586 se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %,

al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, En algunas de tales composiciones, la secuencia de

codificación de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, Opcionalmente, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica

multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio. En algunos de tales composiciones, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa

glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el

constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirija la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia

codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirija la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o en una nanopartícula lipídica. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico está en el vector de ácido nucleico. En algunas de tales composiciones, el vector de ácido nucleico es un vector viral. En algunas de dichas composiciones, el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec.

con núm. de ident. 160. En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV). En algunas de tales composiciones, el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74 o un vector AAVhu.37. En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8). En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia

establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en

donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína

terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

En algunas de tales composiciones, la composición comprende además un agente de nucleasa que se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana. En algunas de tales composiciones, el locus genómico diana es un gen albúmina, opcionalmente en donde el gen albúmina es un gen albúmina humana. En algunas de tales composiciones, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina. En algunas de tales composiciones, el agente de nucleasa comprende: (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés); (b) una nucleasa efectora de tipo activador de transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés); o (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía

comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía.

En algunas de tales composiciones, el agente de nucleasa comprende: (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la secuencia diana del ARN guía está en el intrón 1 de un gen albúmina. En algunas de tales composiciones, el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido

al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. En algunas de dichas composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de dichas composiciones, el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales

composiciones, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

En algunas de tales composiciones, el ARN guía está en la forma de ARN. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende al menos una modificación. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende un enlace de fosforotioato entre nucleótidos. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-

O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunas de tales composiciones, el ARN guía es un ARN guía único (sgRNA). En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía.

En algunas de tales composiciones, la proteína Cas es una proteína Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas9 se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9, una proteína *Staphylococcus aureus* Cas9, una proteína *Campylobacter jejuni* Cas9, una proteína

Streptococcus thermophilus Cas9 o una proteína *Neisseria meningitidis* Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11. En algunas de tales composiciones, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas está optimizado por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana. En algunas de tales composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina. En algunas de tales composiciones, la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunas de tales composiciones, la uridina modificada es pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas

comprende una caperuza en 5'. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de dichas composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunas de dichas composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de dichas composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

En algunas de dichas composiciones, el ARN guía está en la forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas,

en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la

proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en

donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el

constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil- pseudouridina, comprende una

caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde

la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el

constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica

multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN

guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica. En algunas de tales composiciones, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido estabilizado. En algunas de tales composiciones, el lípido catiónico es el lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonilo)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato). En algunas de tales composiciones, el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC). En algunas de tales composiciones, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunas de tales composiciones, el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el lípido catiónico es el lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es el colesterol y el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG.

En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el

ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de

las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la

sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la

secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN

guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas proteína, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en

los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa

lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector

rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia

establecida en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 733, u opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la sec. con núm. de ident.: 581, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se flanquea por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de inserción del ácido nucleico

que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de expresión de la proteína terapéutica multidominio a partir de un locus genómico diana en una célula o una población de células. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de inserción del ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de expresión de la proteína terapéutica multidominio a partir de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células en un sujeto. En algunas de tales composiciones, la célula es una célula neonatal y la población de células es una población de células neonatales. En algunas de dichas composiciones, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunas de tales

composiciones, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, la célula no es una célula neonatal y la población de células no es una población de células neonatales. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método de tratamiento de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita. En algunas de tales composiciones, la composición es para usar en un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita. En algunas de tales composiciones, el sujeto es un sujeto neonato. En algunas de tales composiciones, el sujeto neonatal es un sujeto neonatal humano dentro de las

24 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, el sujeto neonatal es un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, el sujeto neonatal es un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, el sujeto neonatal es un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales composiciones, el sujeto no es un sujeto neonatal.

En otro aspecto, se proporciona una célula que comprende cualquiera de las composiciones anteriores. En algunas de tales células, el constructo de ácido nucleico se integra en un locus genómico diana, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus genómico diana, o en donde el constructo de ácido nucleico se integra en el intrón 1 de un locus de *albúmina* endógena, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus de *albúmina* endógena. En algunas de tales células, la célula es una célula humana. En algunas de tales células, la célula es una célula hepática. En algunas de tales células, la célula hepática es un hepatocito. En algunas de tales células, la célula es una célula neonatal. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas

después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula no es una célula neonatal. En algunas de tales células, la célula es *in vivo*. En algunas de tales células, la célula es *in vitro* o *ex vivo*.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante

de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células. Algunos de estos métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas. En algunos de tales métodos, la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales. En algunos de dichos

métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales. En algunos de tales métodos, la célula es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células es *in vitro* o *ex vivo*. En algunos de tales métodos, la célula es *in vivo* en un sujeto o la población de células es *in vivo* en un sujeto.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de

nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales

métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se administra e internaliza en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos de tales métodos, la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas. En algunos de tales métodos, la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales. En algunos de dichos métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera

de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe. En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico

diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío.

En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles reducidos de glucógeno en el músculo

esquelético, corazón y/o tejido del sistema nervioso central en el sujeto comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos de tales métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesite. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto neonatal cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión al TfR fusionado con la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico

diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío. En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central en el sujeto.

En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml, o al menos aproximadamente 10 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml

y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método logra niveles de actividad de la alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio infantil, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 1 % o más de aproximadamente el 1 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio tardío, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 40 % de lo normal o más de aproximadamente el 40 % de lo normal. En algunos de tales métodos, el método aumenta la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal sobre la actividad de la alfa glucosidasa lisosomal inicial del sujeto en al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al

menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 %. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración. En algunos de dichos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración.

En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto seis meses o 24 semanas después de la administración.

En algunos de tales métodos, el método comprende además la evaluación de la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto. En algunos de dichos métodos, la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8. En algunos de dichos métodos, evaluar la inmunidad preexistente al AAV comprende evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En

algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto humano. En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está carece de CpG en relación con una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal de tipo salvaje. En algunas de tales composiciones, la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa

lisosomal. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de dichas composiciones, la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal está optimizada por codones y carece de CpG. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente

en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína alfa glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-

212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En algunas de tales composiciones, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende

brazos de homología. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal. En algunas de tales composiciones, la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario.

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o en una nanopartícula lipídica. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico está

en el vector de ácido nucleico. En algunas de tales composiciones, el vector de ácido nucleico es un vector viral. En algunas de dichas composiciones, el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident. 160. En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV). En algunas de tales composiciones, el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74 o un vector AAVhu.37. En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8). En algunas de tales composiciones, el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario.

En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde el ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico está carece de CpG.

Algunas de tales composiciones comprenden además un agente de nucleasa que se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana. En algunas de tales composiciones, el locus genómico diana es un gen albúmina, opcionalmente en donde el gen albúmina es un gen albúmina humana. En algunas de tales composiciones, el sitio diana de la nucleasa está en el intrón 1 del gen albúmina. En algunas de tales composiciones, el agente de nucleasa comprende: (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés); (b) una nucleasa efectora de tipo activador de

transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés); o (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía.

En algunas de tales composiciones, el agente de nucleasa comprende: (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la secuencia diana del ARN guía está en el intrón 1 de un gen albúmina. En algunas de tales composiciones, el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humana. En algunas de tales composiciones: (I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30,

33, y 41; y/o (II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. En algunas de tales composiciones: (I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36; y/o (II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el segmento

dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

En algunas de tales composiciones, el ARN guía está en la forma de ARN. En algunas de tales composiciones, el ARN guía comprende al menos una modificación. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende un enlace de fosforotioato entre nucleótidos. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende enlaces de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-

metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunas de tales composiciones, la al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía. En algunas de tales composiciones, el ARN guía es un ARN guía único (sgRNA). En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía.

En algunas de tales composiciones, la proteína Cas es una proteína Cas9. En algunas de tales composiciones,

la proteína Cas9 se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9, una proteína *Staphylococcus aureus* Cas9, una proteína *Campylobacter jejuni* Cas9, una proteína *Streptococcus thermophilus* Cas9 o una proteína *Neisseria meningitidis* Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas se deriva de una proteína *Streptococcus pyogenes* Cas9. En algunas de tales composiciones, la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11. En algunas de tales composiciones, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas está optimizado por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana. En algunas de tales composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina. En algunas de tales composiciones, la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina. En algunas de tales composiciones, el

ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'. En algunas de tales composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de dichas composiciones, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12.

En algunas de dichas composiciones, la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas está totalmente sustituido con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de dichas composiciones, el ARN guía está en la forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal

y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde el ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv)

nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil- pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente

en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde el ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica. En algunas de tales composiciones, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido estabilizado. En algunas de tales composiciones, el lípido catiónico es el lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonilo)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato). En algunas de tales composiciones, el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC). En algunas de tales composiciones, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunas de tales composiciones, el lípido estabilizado es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000 (PEG2k-DMG). En algunas de tales composiciones, el lípido catiónico es el lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es el colesterol y el lípido estabilizado es PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes

relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG.

En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la

sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde el ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

En algunas de tales composiciones, el gen albúmina es un gen albúmina humana, en donde el ARN guía en forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100 y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2’-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3’ del ARN guía, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas

proteína, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núm. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye completamente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza en 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende el lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente de 50 % mol de lípido A, aproximadamente de 9 % mol de DSPC, aproximadamente de 38 % mol de colesterol y aproximadamente de 3 % mol de PEG2k-DMG. En algunas de tales composiciones, el constructo de ácido nucleico comprende de 5’ a 3’: un aceptor de empalme, la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la alfa glucosidasa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico está en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el

constructo de ácido nucleico está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente de, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde el ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente de o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

Algunas de tales composiciones son para usar en un método de inserción de la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células. Algunas de tales composiciones son para usar en un método de expresión de la alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células Algunas de tales composiciones son para usar en un método de expresión de la alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células. Algunas de tales composiciones son para usar en un método de inserción de la secuencia de codificación de la alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. Algunas de tales composiciones son para usar en un método de expresión de la alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto. Algunas de tales composiciones son para usar en un método de expresión de la alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células en un sujeto. Algunas de tales

composiciones son para usar en un método de tratamiento de una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita. Algunas de tales composiciones son para usar en un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita. Algunas de tales composiciones son para usar en un método de tratamiento de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita. Algunas de tales composiciones son para usar en un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita.

En otro aspecto, se proporcionan células que comprenden cualquiera de las composiciones anteriores. En algunas de estas células, el constructo de ácido nucleico se integra en un locus genómico diana, y en donde la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana, o en donde el constructo de ácido nucleico se integra en el intrón 1 de un locus de *albúmina* endógena, y en donde la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus de *albúmina* endógena. En algunas de tales células, la célula es una célula hepática. En algunas de tales células, la célula hepática es un hepatocito. En algunas de tales células, la célula es una célula humana. En algunas de tales células, la célula es una célula neonatal. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal

es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula neonatal es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunas de tales células, la célula no es una célula neonatal. En algunas de tales células, la célula es *in vivo*. En algunas de tales células, la célula es *in vitro* o *ex vivo*.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una

alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células. Algunos de tales métodos comprenden administrar a la célula o a la población de células cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas. En algunos de tales métodos, la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos. En algunos de tales métodos, la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas. En algunos de tales métodos, la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales. En algunos de dichos métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales procede de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del

nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales. En algunos de tales métodos, la célula es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células es *in vitro* o *ex vivo*. En algunos de tales métodos, la célula es *in vivo* en un sujeto o la población de células es *in vivo* en un sujeto.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para insertar una secuencia de codificación de alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una alfa glucosidasa lisosomal en una célula en un sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula. En otro aspecto, se proporcionan métodos para expresar una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un

sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En algunos de tales métodos, la célula es una célula hepática. En algunos de tales métodos, la célula es un hepatocito. En algunos de tales métodos, la célula es una célula humana. En algunos de tales métodos, la célula es una célula neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, la célula no es una célula neonatal.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante

alfa glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado. En otro aspecto, se proporcionan métodos para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante alfa glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido. En algunos de tales métodos, el sujeto tiene la enfermedad de Pompe.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. Algunos de estos métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío.

En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto humano. En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales

métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de la alfa glucosidasa lisosomal circulante en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, tejido cardíaco o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético y tejido cardíaco en el sujeto comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos de tales métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que necesite de estos. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto

cualquiera de las composiciones anteriores, en donde la secuencia codificante alfa glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. Algunos de tales métodos comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones anteriores, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la alfa glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio infantil. En algunos de tales métodos, la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de inicio tardío.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado un nivel terapéuticamente efectivo de la alfa glucosidasa lisosomal circulante en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central en el sujeto. En algunos de tales métodos, el método previene o reduce

la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y el tejido cardíaco en el sujeto.

En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto humano. En algunos de tales métodos, el sujeto es un sujeto neonatal. En algunos de dichos métodos, el sujeto neonato es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento. En algunos de tales métodos, el sujeto no es un sujeto neonato.

En algunos de tales métodos, el método da como resultado una mayor expresión de alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la alfa glucosidasa lisosomal a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos aumentados de la alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la alfa glucosidasa lisosomal a un sujeto de control. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la alfa glucosidasa lisosomal en el

sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg /ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml o al menos aproximadamente 10 µg/ ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método da como resultado niveles séricos de la alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunos de tales métodos, el método logra niveles de actividad de la alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal. En algunos de tales métodos: (I) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe

de inicio infantil, y el método logra niveles de actividad o expresión de la alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 1 % o más de aproximadamente el 1 % de lo normal; o (II) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de inicio tardío, y el método logra niveles de actividad o expresión de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente el 40 % de lo normal o más de aproximadamente el 40 % de lo normal. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos el 50 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En

algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 2 años después de la administración. En algunos de tales métodos, la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos el 60 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

En algunos de tales métodos, el método comprende además la evaluación de la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto. En algunos de dichos métodos, la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8. En algunos de dichos métodos, evaluar la inmunidad preexistente al AAV comprende evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico

se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa. En algunos de tales métodos, el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra un esquema que describe diferentes plantillas de inserción de factor IX humano (hFIX, por sus siglas en inglés) probadas en ratones adultos y neonatales.

La **Figura 2A** muestra los niveles plasmáticos del hFIX en ratones neonatales (n = 4-10 por grupo; macho y hembra) y en ratones adultos (n = 5 por grupo; hembra) en diferentes momentos después de la administración del hFIX episomal (episoma), plantilla LNP-g666 + hFIX-HDR-500 (HDR500), plantilla LNP-g666 + hFIX-HDR-800 (HDR800) y plantilla LNP-g666 + hFIX-NHEJ (NHEJ). La administración en ratones neonatales se produjo en P0 o P1. Se usaron ratones inyectados con solución salina como controles negativos. Los datos se muestran en una escala logarítmica. La **Figura 2B** muestra los niveles plasmáticos del hFIX en ratones neonatales (n = 4-10 por grupo; macho y hembra) en diferentes momentos después de la administración del hFIX episomal (episoma), plantilla LNP-g666 + hFIX-HDR-500

(HDR500), plantilla LNP-g666 + hFIX-HDR-800 (HDR800) y plantilla LNP-g666 + hFIX-NHEJ (NHEJ). La administración en ratones neonatales se produjo en P0 o P1. Se usaron ratones inyectados con solución salina como controles negativos. Los datos se muestran en una escala lineal.

La **Figura 3** muestra un esquema de LNP-g9860, que es una nanopartícula lipídica que contiene ARNm Cas9 y ARNsg 9860 dirigida al intrón 1 de la *albúmina* humana (*ALB*) y una cápside de AAV8 recombinante (rAAV8) empaquetada con una plantilla de inserción anti-CD63:GAA.

La **Figura 4** muestra un esquema del direccionamiento de GAA al lisosoma a través de la fusión al scFv anti-CD63.

La **Figura 5** muestra un esquema para la inserción mediada por CRISPR/Cas9 de una plantilla de inserción anti-CD63:GAA en el locus de la *ALB.* Se representa el locus humano de la *ALB*, con el sitio de corte Cas9 indicado con tijeras. Se representa el sitio aceptor de empalme que flanquea el transgén anti-CD63:GAA en la plantilla de inserción. Después de la inserción y la transcripción estimuladas por el promotor de *ALB* endógeno, se produce el empalme entre el exón 1 de la *ALB* y la plantilla de ADN anti-CD63:GAA insertada, diagramada en líneas discontinuas, para producir un ARNm híbrido de *ALB-anti-CD63:GAA*. El péptido señal ALB promueve la secreción de anti-CD63:GAA y se elimina durante la maduración de la proteína para producir anti-CD63:GAA en plasma.

La **Figura 6** muestra los niveles de anti-CD63:GAA en el suero durante un periodo de tiempo de 10 meses después de la administración de LNP-g666 (1 mg/kg) y una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA (1,2e13 vg/kg) ("Inserción") o después de la administración de AAV episomal que codifica anti-CD63:GAA (4e12 vg/kg) ("episomal") a ratones adultos modelo macho y hembra con enfermedad de Pompe (n = 12; GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$).

La **Figura 7** muestra los niveles de glucógeno en el corazón, el cuádriceps, el diafragma y la médula espinal en ratones modelo con enfermedad de Pompe (GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$) a los 10 meses después de la administración de LNP-g666 y una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA o a los 10 meses después de la administración de AAV episomal que codifica anti-CD63:GAA a ratones adultos modelo macho y hembra con enfermedad de Pompe (n = 12; GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$). Los ratones GAA de tipo salvaje (GAA $^{+/+}$; CD63 $^{hu/hu}$; n = 4) y los ratones modelo con enfermedad de Pompe no tratados (n = 4) se usaron como controles. La línea punteada horizontal es el límite inferior de detección del ensayo.

Las **Figuras 8A-8B** muestra los niveles de anti-CD63:GAA en el suero durante un periodo de tiempo de 15 meses después de la administración de LNP-g666 y una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA (n = 10; macho y hembra; "Inserción") o después de la administración de AAV episomal que codifica anti-CD63:GAA

(n = 6; macho y hembra; “episomal”) a ratones neonatales modelo con enfermedad de Pompe (P1) (GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$). La línea punteada horizontal es el límite inferior de detección del ensayo. Las barras de error en la **figura 8A** son ± SD y las barras de error en la **figura 8B** son ± SEM.

La **Figura 9A** muestra los niveles de glucógeno en el corazón, el cuádriceps, el gastrocnemio y el diafragma en ratones modelo con enfermedad de Pompe (GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$) a los 3 meses después de la administración de LNP-g666 y una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA (n = 5; macho y hembra, “I”) o a los 3 meses después de la administración de AAV episomal que codifica anti-CD63:GAA (n = 3; macho y hembra, “E”) a ratones neonatales (P1). Se usaron ratones modelo con enfermedad de Pompe no tratados como controles.

La **Figura 9B** muestra los niveles de glucógeno en el corazón, el cuádriceps, el gastrocnemio, el diafragma, el cerebro y la médula espinal en ratones modelo con enfermedad de Pompe (GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$) a los 15 meses después de la administración de LNP-g666 y una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA (n = 10; macho y hembra, “I”) o a los 15 meses después de la administración de AAV episomal que codifica anti-CD63:GAA (n = 6; macho y hembra, “E”) a ratones neonatales (P1). Se

usaron ratones modelo con enfermedad de Pompe (“U”) y silvestres (“W”) no tratados como controles.

La **Figura 10** la fuerza de agarre de ratones modelo con la enfermedad de Pompe (GAA $^{-/-}$; CD63 $^{hu/hu}$) a los 15 meses después de la administración de LNP-g666 y una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA (n = 10; macho y hembra, “AAV + LNP en P1 por inserción”) o a los 15 meses después de la administración de AAV episomal que codifica anti-CD63:GAA (n = 6; macho y hembra, “AAV episomal en P1”) a ratones neonatales (P1). Los ratones GAA de tipo salvaje (GAA $^{+/+}$; CD63 $^{hu/hu}$; “de tipo salvaje”) y ratones modelo con enfermedad de Pompe no tratados (“KO no tratados”) se usaron como controles.

La **Figura 11** muestra las respuestas de IFNα medidas mediante un IFNα por ELISA en un ensayo primario basado en DC plasmocitoides humanas. Se probaron varias plantillas de rAAV6 carece de CpG anti-CD63:GAA en comparación con la plantilla anti-CD63:GAA (sin carecimiento de CpG) de primera generación. Se usó rAAV6-GFP como un control positivo y se usó plantilla *F9* carece de CpG (CpG 0) como control negativo.

La **Figura 12** muestra la actividad enzimática de GAA en los medios después de la inserción de varias plantillas de inserción anti-CD63:GAA y anti-TfR:GAA en el locus de albúmina de hepatocitos humanos primarios después de la administración por rAAV2.

La **Figura 13** muestra la actividad enzimática de GAA en los medios después de la inserción de varias plantillas de inserción anti-CD63:GAA en el locus de albúmina de hepatocitos humanos primarios después de la administración por rAAV6.

Las **Figuras 14A-14B** muestran la expresión sérica de GAA en ratones GAA $^{-/-}$ ratones después de la administración de LNP-g666 y varias plantillas de inserción de AAV8 recombinante anti-CD63:GAA. Se usaron ratones KO no tratados y WT no tratados como controles.

La **Figura 15** muestra un esquema de LNP-g9860, que es una nanopartícula lipídica que contiene ARNm Cas9 y ARNsg 9860 dirigido al intrón 1 de la *albúmina* humana (*ALB*) y una cápside de AAV8 recombinante (rAAV8) empaquetada con una plantilla de inserción anti-TfR:GAA.

La **Figura 16** muestra un esquema del direccionamiento de GAA a través de múltiples trayectos a través de la fusión con scFv anti-TfR.

La **Figura 17** muestra un esquema para la inserción mediada por CRISPR/Cas9 de una plantilla de inserción anti-TfR:GAA en el locus de la *ALB*. Se representa el locus humano de la *ALB*, con el sitio de corte Cas9 indicado con tijeras. Se representa el sitio aceptor de empalme que flanquea el transgén anti-TfR:GAA en la plantilla de inserción. Después de la inserción y la transcripción estimuladas por el promotor de *ALB* endógeno, se produce el

empalme entre el exón 1 de la *ALB* y la plantilla de ADN anti-TfR:GAA insertada, diagramada en líneas discontinuas, para producir un ARNm híbrido de *ALB-anti-TfR:GAA*. El péptido señal ALB promueve la secreción de anti-TfR:GAA y se elimina durante la maduración de la proteína para producir anti-TfR:GAA en plasma.

Las **Figuras 18A-18C** muestran western blots que muestran que los clones de anticuerpos anti-TfR humanos administran GAA al cerebro de ratones *Tfrc*^{hum}. Cada carril = 1 ratón. Se usó mTfR:GAA anti-ratón en ratones silvestres como un control positivo. Se usó mTfR:GAA anti-ratón en ratones *Tfrc*^{hum} como un control negativo.

La **Figura 19** muestra western blots que muestran que un subconjunto de clones de anticuerpos anti-hTfR administran GAA maduro al parénquima cerebral en formato scfv:GAA (entrega por HDD). Se usó mTfR:GAA anti-ratón en ratones silvestres como un control positivo. Se usó mTfR:GAA anti-ratón en ratones *Tfrc*^{hum} como un control negativo.

La **Figura 20** muestra western blots que muestran que cuatro clones de anticuerpos anti-hTfR seleccionados administran GAA maduro al parénquima cerebral en formato scfv:GAA (terapia génica de depósito hepático episomal AAV8). Se usó mTfR:GAA anti-ratón en ratones silvestres como un control positivo. Se usó mTfR:GAA anti-ratón en ratones *Tfrc*^{hum} como un control negativo.

La **Figura 21** muestra western blots que muestran que tres clones de anticuerpos anti-hTfR de depósito hepático episomal AAV8 seleccionados administran GAA maduro al CNS, el corazón y el músculo en ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum}.

Las **Figuras 22** y **22B** muestran que cuatro clones de anticuerpos anti-hTfR de depósito hepático episomal AAV8 seleccionados rescatan el almacenamiento de glucógeno en el CNS, el corazón y el músculo en ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} Los silvestres no tratados fueron un control positivo y los ratones *Gaa*$^{-/-}$ no tratados fueron un control negativo.

La **Figura 22C** muestra que un clon de anticuerpos anti-hTfR de depósito hepático episomal AAV8 seleccionado rescata el almacenamiento de glucógeno en los ganglios de la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) en ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum}. Los silvestres no tratados fueron un control positivo y los ratones *Gaa*$^{-/-}$ no tratados fueron un control negativo.

Las **Figuras 23A-23D** muestran que tres clones de anticuerpos anti-hTfR de depósito hepático episomal AAV8 seleccionados rescatan el almacenamiento de glucógeno en el tálamo cerebral (**Figura 23A**), corteza cerebral (**Figura 23B**), hipocampo cerebral CA1 (**Figura 23C**) y cuádriceps (**Figura 23D**) en ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum}. Los silvestres no tratados fueron un control positivo y los ratones *Gaa*$^{-/-}$ no tratados fueron un control negativo.

La **Figura 24A** muestra que la inserción scfv:GAA 12847anti-hTfR administra proteína GAA madura al CNS y al músculo de ratones modelo con Pompe. La **Figura 24B** muestra que la inserción scfv:GAA12847 anti-hTfR rescata el almacenamiento de glucógeno en el CNS y el músculo de ratones modelo con Pompe. ANOVA de una vía *p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001; Se usaron ratones modelo con enfermedad de Pompe no tratados y silvestres como controles. Los ratones inyectados con una plantilla episomal de AAV8 recombinante anti-TfR:GAA se usaron como control positivo. Los ratones inyectados con una plantilla de inserción de AAV8 recombinante anti-TfR:GAA sin LNP-g666 se usaron como control negativo.

Las **Figuras 25A** y **25B** muestran la actividad enzimática de GAA en el medio después de la inserción de diversas plantillas de inserción anti-TfR:GAA (agotadas en Cpg y nativas) en el locus de albúmina de hepatocitos humanos primarios después del suministro mediante rAAV2.

La **Figura 26A** muestra transferencias Western que muestran que clones de anticuerpos anti-TfR humano (0 CpG y nativos) administran GAA al cerebro (*cerebrum*) de ratones *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} de 3 meses de edad dosificados por vía intravenosa con LNP-g666 (3 mg/kg) y varias plantillas de inserción de AAV8 recombinantes anti-TfR:GAA o AAV8 recombinantes anti-CD63:GAA. Cada carril = 1 ratón.

La **Figura 26B** muestra que la inserción de albúmina de anti-hTfR:GAA rescata el almacenamiento de glucógeno en el cerebro, el cuádriceps, el diafragma y el corazón en ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} a los que se administró por vía intravenosa LNP-g666 (3 mg/kg) y diversas plantillas de inserción de AAV8 recombinantes anti-TfR:GAA o AAV8 recombinantes anti-CD63:GAA. Los niveles de glucógeno se midieron 3 semanas después de la administración. Los silvestres no tratados fueron un control positivo y los ratones *Gaa*$^{-/-}$ no tratados fueron un control negativo.

La **Figura 27A** muestra la actividad de GAA en suero medida mediante el uso de un ensayo de sustrato fluorométrico en macacos cynomolgus a los que se les administró AAV8 recombinante que contenía una plantilla anti-CD63:GAA agotada en CpG y LNP-g9860. Se utilizaron tres dosis diferentes de AAV8 (0,3e13vg/kg, 1,5e13vg/kg y 5,6e13vg/kg) con una dosis de LNP de 3 mg/kg. N=1 en el grupo de control de vehículo y N=3 en los grupos administrados.

La **Figura 27B** muestra la expresión de GAA madura en lisados de tejidos de macacos cynomolgus a los que se les administró AAV8 recombinante que contenía una plantilla anti-CD63:GAA agotada en CpG y LNP-g9860. Se utilizaron tres dosis diferentes de AAV8 (0,3e13vg/kg, 1,5e13vg/kg y 5,6e13vg/kg) con una dosis de LNP de 3 mg/kg. N=1 en el grupo de control de vehículo y N=3 en los grupos administrados. Los tejidos se recolectaron en el sacrificio (día 89) y se sondearon

mediante inmunoelectrotransferencia para determinar la presencia de una forma lisosomal de 76 kDa de GAA.

Definiciones

Los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido”, usados en la presente descripción de manera intercambiable, incluyen formas poliméricas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidos los aminoácidos codificados y no codificados y aminoácidos modificados o derivatizados química o bioquímicamente. Los términos también incluyen polímeros que han sido modificados, 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 “terminal N” y un “terminal C”. El término “terminal N” se refiere al inicio de una proteína o polipéptido, terminado por un aminoácido con un grupo amino libre (-NH2). El término “terminal C” se refiere al final de una cadena de aminoácidos (proteína o polipéptido), terminado por un grupo carboxilo libre (-COOH).

Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido”, usados en la presente descripción de manera intercambiable, incluyen formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, incluidos ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o análogos o versiones modificadas de estos. Incluyen ADN o

ARN de cadena simple, doble y múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN y polímeros que comprenden bases de purina, bases de pirimidina u otras bases naturales, modificadas químicamente, modificadas bioquímicamente, no naturales o bases de nucleótidos derivatizadas.

Se dice que los ácidos nucleicos tienen “extremos 5′” y “extremos 3′” porque los mononucleótidos reaccionan para formar oligonucleótidos de tal manera que el fosfato 5′ de un anillo de mononucleótido pentosa se une al oxígeno 3′ de su vecino en una dirección a través de un enlace fosfodiéster. Un extremo de un oligonucleótido se denomina “extremo 5′” si su fosfato 5′ no está unido al oxígeno 3′ de un anillo de pentosa mononucleótido. Un extremo de un oligonucleótido se denomina “extremo 3′” si su oxígeno 3′ no está unido a un fosfato 5′ de otro anillo de pentosa mononucleótido. También, puede decirse que una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna a un oligonucleótido más grande, tiene extremos 5′ y 3′. En una molécula de ADN lineal o circular, los elementos discretos se denominan “corriente arriba” o 5′ de los elementos “corriente abajo” o 3′.

El término “genómicamente integrado” se refiere a un ácido nucleico que se ha introducido en una célula de tal manera que la secuencia de nucleótidos se integra en el genoma de la célula. Puede usarse cualquier protocolo

para la incorporación estable de un ácido nucleico en el genoma de una célula.

El término “vector viral” se refiere a un ácido nucleico recombinante que incluye al menos un elemento de origen viral e incluye elementos suficientes o que permiten el empaquetamiento en una partícula de vector viral. El vector y/o la partícula se pueden utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos a las células *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se conocen numerosas formas de vectores virales.

El término “aislado” con respecto a células, tejidos (p. ej., muestras de hígado), proteínas y ácidos nucleicos incluye células, tejidos (p. ej., muestras de hígado), proteínas y ácidos nucleicos que están relativamente purificados con respecto a otros componentes bacterianos, virales, celulares u otros que normalmente pueden estar presentes *in situ*, hasta e incluyendo una preparación sustancialmente pura de células, tejidos (p. ej., muestras de hígado), proteínas y ácidos nucleicos. El término “aislado” también incluye células, tejidos (p. ej., muestras de hígado), proteínas y ácidos nucleicos que no tienen una contrapartida natural, se han sintetizado químicamente y, por lo tanto, no están contaminados sustancialmente por otras células, tejidos (p. ej., muestras de hígado), proteínas y ácidos nucleicos, o han sido separados o purificados de la mayoría de los otros

componentes (p. ej., componentes celulares) con los que están acompañados naturalmente (p. ej., otras proteínas celulares, polinucleótidos o componentes celulares).

El término "tipo salvaje" incluye entidades que tienen una estructura y/o actividad como la que se encuentra en un estado o contexto normal (en contraste con mutante, enfermo, alterado, etc.). Los genes y polipéptidos de tipo salvaje a menudo existen en múltiples formas diferentes (p. ej., alelos).

El término "secuencia endógena" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ocurre naturalmente dentro de una célula o animal. Por ejemplo, una secuencia *ALB* endógeno de un ser humano se refiere a un secuencia *ALB* nativo que ocurre naturalmente en el locus de la *ALB* humana.

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 particular de desarrollo 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 bajo 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 segmentos que no se encuentran naturalmente juntos en la misma molécula. Por ejemplo, el término “heterólogo”, cuando se usa con referencia a segmentos de un ácido nucleico o segmentos de una proteína, indica que el ácido nucleico o la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí (p. ej., unidos) 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 en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de un vector de ácido nucleico podría incluir una secuencia de codificación flanqueada por secuencias que no se encuentran en asociación con la secuencia de codificación en la naturaleza. De la misma manera, una región “heteróloga” de una proteína es un segmento de aminoácidos dentro o unido a otra molécula peptídica que no se encuentra en asociación 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 una proteína pueden

comprender un marcador heterólogo o una secuencia de localización o secreción heteróloga.

La “optimización de codones” (es decir, secuencias “optimizadas por codones”) aprovecha la degeneración de los codones, como lo demuestra 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 la expresión mejorada en células huésped particulares mediante la sustitución 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 huésped mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés se puede modificar para sustituir codones que tienen una mayor frecuencia de uso en una célula procariota o eucariota determinada, incluida 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 huésped, en comparación con la secuencia de ácido nucleico que se produce de manera natural. Las tablas de uso de codones están fácilmente disponibles, por ejemplo, en la “Base de datos de uso de codones”. Estas tablas se pueden adaptar de varias maneras. *Ver* Nakamura et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):292,

incorporado en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. También están disponibles algoritmos informáticos para la optimización de codones de una secuencia particular para la expresión en un huésped particular (*ver, p. ej.*, Gene Forge).

El término "locus" se refiere a una ubicación específica de un gen (o secuencia significativa), secuencia de ADN, secuencia de codificación de polipéptido o posición en un cromosoma del genoma de un organismo. Por ejemplo, un "locus de la *ALB*" puede referirse a la ubicación específica de un gen de la *ALB*, secuencia de ADN de la *ALB*, secuencia de codificación de albúmina o posición de la *ALB* en un cromosoma del genoma de un organismo que se ha identificado en cuanto a dónde reside dicha secuencia. Un "locus *ALB*" puede comprender un elemento regulador de un gen de ALB, 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 secuencias de ADN en un cromosoma que puede contener, si está presente de manera natural, al menos una región codificante y al menos una región no codificante. La secuencia de ADN en un cromosoma que codifica un producto (p. ej., pero sin limitarse a, un producto de ARN y/o un producto de polipéptido) puede incluir la región codificante interrumpida con intrones no codificantes y la secuencia ubicada adyacente a la región codificante en ambos los extremos 5' y 3' de tal manera que

el gen corresponda al ARNm de longitud completa (incluidas las secuencias no traducidas 5’ y 3’). Adicionalmente, otras secuencias no codificantes que incluyen secuencias reguladoras (p. ej., pero sin limitarse a, promotores, potenciadores y sitios de unión de factores de transcripción), señales de poliadenilación, sitios de entrada de ribosomas internos, silenciadores, secuencia aislante y regiones de unión a la matriz pueden estar presentes en un gen. Estas secuencias pueden estar cerca de la región codificante del gen (p. ej., pero sin limitarse a, 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 variedad de formas diferentes, que se ubican 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 generalmente comprende una caja TATA capaz de dirigir a la ARN polimerasa II para iniciar la síntesis de ARN en el sitio de iniciación de la transcripción apropiado para una secuencia de polinucleótidos particular. Un promotor puede

comprender adicionalmente otras regiones que influyen en la tasa de iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras descritas en la presente descripción modulan la transcripción de un polinucleótido unido operativamente. Un promotor puede ser activo en uno o más de los tipos de células descritos en la presente descripción (p. ej., una célula de ratón, una célula de rata, una célula pluripotente, un embrión en etapa unicelular, una célula diferenciada o una combinación de estas). Un promotor puede ser, por ejemplo, un promotor constitutivamente activo, un promotor condicional, un promotor inducible, un promotor temporalmente restringido (p. ej., un promotor regulado por el desarrollo) o espacialmente restringido (p. ej., un promotor específico de células o de tejidos). Se pueden encontrar ejemplos de promotores, por ejemplo, en WO 2013/176772, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los fines.

El "enlace operable" o estar "vinculado operablemente" incluye la yuxtaposición de dos o más componentes (p. ej., un promotor y otro elemento de la secuencia) de tal manera que ambos componentes funcionen normalmente y permitan la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar en una función que es ejercida sobre al menos uno de los otros componentes. Por ejemplo, un promotor se puede unir operativamente a una secuencia de codificación si el promotor controla el nivel

de transcripción de la secuencia de codificación en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. El enlace operable puede incluir tales secuencias que son contiguas entre sí o que actúan en trans (p. ej., una secuencia reguladora puede actuar a distancia para controlar la transcripción de la secuencia de codificación).

Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción emplean una variedad de diferentes componentes. Algunos componentes a lo largo de la descripción pueden tener variantes y fragmentos activos. El término "funcional" se refiere a la capacidad innata de una proteína o ácido nucleico (o un fragmento o variante de este) para exhibir una actividad o función biológica. Las funciones biológicas de los fragmentos o variantes funcionales pueden ser las mismas o, de hecho, pueden cambiar (p. ej., con respecto a su especificidad, selectividad o eficacia) en comparación con la molécula original, pero conservando la función biológica básica de la molécula.

El término "variante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia más prevalente en una población (p. ej., en un nucleótido) o una secuencia de proteína diferente de la secuencia más prevalente en una población (p. ej., 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, cuando se refiere a un fragmento de proteína, 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 (es decir, la eliminación de una porción de cada uno de los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína). Un fragmento puede ser, por ejemplo, cuando se refiere a un fragmento de ácido nucleico, un fragmento 5’ (es decir, eliminación de una porción del extremo 3’ del ácido nucleico), un fragmento 3’ (es decir, eliminación de una porción del extremo 5’ del ácido nucleico), o un fragmento interno (es decir, eliminación de una porción de cada uno de los extremos 5’ y 3’ del ácido nucleico).

“Identidad de secuencia” o “identidad” en el contexto de dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia en una ventana de comparación específica. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a las proteínas, las posiciones de los residuos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones conservativas

de aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos se sustituyen por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren por tales sustituciones conservadoras tienen “similitud de secuencia” o “similitud”. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos. Por lo general, esto implica calificar una sustitución conservadora como un desajuste parcial en lugar de total, aumentando de esta manera el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando un aminoácido idéntico recibe una puntuación de 1 y una sustitución no conservativa recibe una puntuación de cero, una sustitución conservativa recibe una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, p. ej., como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

El “porcentaje de identidad de secuencia” incluye el valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima (el mayor número de residuos perfectamente coincidentes) en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de

polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, vacíos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. A menos que se especifique de cualquier otra manera (p. ej., 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 de cualquier otra manera, los valores de identidad/similitud de secuencia incluyen el valor obtenido usando GAP Versión 10 usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando un peso de GAP de 50 y un peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos usando un peso de GAP de 8 y un peso de longitud de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente de estos. El “programa equivalente” incluye cualquier programa de comparación de secuencias que, para

dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera una alineación que tiene coincidencias idénticas de residuos de nucleótidos o aminoácidos y un porcentaje idéntico de identidad de secuencia en comparación con la alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.

El término “sustitución conservativa de aminoácidos” se refiere a la sustitución de un aminoácido que normalmente está presente en la secuencia con un aminoácido diferente de tamaño, carga o polaridad similar. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrofóbico) tal como isoleucina, valina o leucina por otro residuo no polar. De la misma manera, los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo polar (hidrofílico) por otro, como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, o entre glicina y serina. Adicionalmente, la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un residuo ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro residuo ácido son ejemplos adicionales de sustituciones conservadoras. Los ejemplos de sustituciones no conservativas incluyen la sustitución de un residuo de aminoácido no polar (hidrofóbico) tal como isoleucina, valina, leucina, alanina o metionina por un residuo polar (hidrofílico) tal como cisteína, glutamina, ácido glutámico o lisina y/o un residuo

polar para un residuo no polar. Las categorizaciones típicas de aminoácidos se sintetizan a continuación.

Tabla 1. Categorizaciones de aminoácidos.

Alanina	Ala	A	No polar	Neutral	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	Polar	Neutral	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	No polar	Neutral	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutral	-3,5
Glicina	Gly	G	No polar	Neutral	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutral	4,5
Leucina	Leu	L	No polar	Neutral	3,8
Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
Metionina	Met	M	No polar	Neutral	1,9
Fenilalanina	Fe	F	No polar	Neutral	2,8
Prolina	Pro	P	No polar	Neutral	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutral	-0,8
Treonina	Thr	T	Polar	Neutral	-0,7
Triptófano	Trp	W	No polar	Neutral	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutral	-1,3
Valina	Val	V	No polar	Neutral	4,2

Una secuencia “homóloga” (p. ej., secuencia de ácido nucleico) incluye una secuencia que es idéntica o sustancialmente similar a una secuencia de referencia conocida, por ejemplo, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a

la secuencia de referencia conocida. Las secuencias homólogas pueden incluir, por ejemplo, secuencias ortólogas y secuencias parálogas. Los genes homólogos, por ejemplo, generalmente 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 en diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por 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.

El término "*in vitro*" incluye ambientes artificiales y procesos o reacciones que ocurren dentro de un ambiente artificial (p. ej., un tubo de ensayo o una célula o línea celular aislada). El término "*in vivo*" incluye ambientes naturales (p. ej., una célula, un organismo o un cuerpo) y procesos o reacciones que ocurren dentro de un ambiente natural. El término "*ex vivo*" incluye células que han sido extraídas del cuerpo de un individuo y procesos o reacciones que ocurren dentro de tales células.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas

(H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana comprende una región variable de cadena liviana (abreviada en la presente descripción como LCVR o VL) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; Las CDR de cadena liviana pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El término anticuerpo de “alta afinidad” se refiere a aquellos anticuerpos que tienen una afinidad de unión a su sitio diana de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M; al menos 10^{-11} M; o al menos 10^{-12} M, medida por resonancia de plasmón superficial, p. ej., BIACORE™ o ELISA de afinidad en solución. El término “anticuerpo” puede abarcar cualquier tipo de anticuerpo, tal como p. ej. monoclonal o policlonal.

Además, el anticuerpo puede ser de cualquier origen, tal como p. ej. mamíferos o no mamíferos. En una modalidad, el anticuerpo puede ser de mamífero o aviar. En una modalidad adicional, el anticuerpo puede ser de origen humano y además puede ser un anticuerpo monoclonal humano.

La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes, y cada cadena pesada se une específicamente a un epítopo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (p. ej., antígenos) o en la misma molécula (p. ej., en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítopo y un segundo epítopo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítopo será generalmente al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítopo, y viceversa. Los epítopos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diferente (p. ej., en la misma proteína o en una diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden elaborarse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconozcan diferentes epítopos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno

pueden fusionarse con secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes regiones constantes de cadena pesada, y tales secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena liviana de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una de las cuales tiene tres CDR de cadena pesada, seguidas de (N-terminal a C-terminal) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena liviana de inmunoglobulina que no confieren especificidad de unión al antígeno pero que pueden asociarse con cada cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y que pueden unirse a uno o más de los epítopos unidos por las regiones de unión al antígeno de cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítopos.

La frase “cadena pesada” o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique de cualquier otra manera, incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de estos. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (de N-terminal a C-terminal), un dominio CH1, una bisagra,

un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (p. ej., reconocer el antígeno con un KD en el rango micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de expresarse y secretarse de una célula, y que comprende al menos una CDR.

La frase “cadena liviana” incluye una secuencia de región constante de cadena liviana de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique de cualquier otra manera, incluye cadenas livianas kappa y lambda humanas. Los dominios variables de cadena liviana (VL) normalmente incluyen tres CDR de cadena liviana y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique de cualquier otra manera. Generalmente, una cadena liviana de longitud completa incluye, desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y un dominio constante de cadena liviana. Las cadenas livianas que se pueden usar con esta invención incluyen, por ejemplo, aquellas que no se unen selectivamente ni al primer ni al segundo antígeno unidos selectivamente por la proteína de unión al antígeno. Las cadenas livianas adecuadas incluyen aquellas que se pueden identificar mediante la detección de las cadenas livianas más comúnmente empleadas en las bibliotecas de anticuerpos existentes (bibliotecas húmedas o *in silico*), donde las cadenas livianas no interfieren sustancialmente con la

afinidad y/o selectividad de los dominios de unión al antígeno de las proteínas de unión al antígeno. Las cadenas livianas adecuadas incluyen aquellas que pueden unirse a uno o ambos epítopos que están unidos por las regiones de unión al antígeno de la proteína de unión al antígeno.

La frase “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena liviana o pesada de inmunoglobulina (modificada según se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia de N-terminal a C-terminal (a menos que se indique de cualquier otra manera): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tiene una estructura de lámina beta dual en donde las láminas beta se conectan por un enlace disulfuro entre un residuo de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

La frase “región determinante de la complementariedad” o el término “CDR” incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo salvaje) aparece entre dos regiones marco en una variable región de una cadena liviana o pesada de una molécula de inmunoglobulina (p. ej., un anticuerpo o un receptor de células T). Una CDR puede estar codificada, por ejemplo, por una secuencia de línea germinal o una secuencia

reordenada o no reordenada y, por ejemplo, por una célula B o una célula T vírgenes o maduras. En algunas circunstancias (p. ej., para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (p. ej., secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (p. ej., en una secuencia de ácido nucleico no reorganizada) pero que son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de células B, por ejemplo, como resultado de empalmar o conectar las secuencias (p. ej., recombinación V-D-J para formar una cadena pesada CDR3).

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos en el término “fragmento de anticuerpo” incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al*. (1989) Nature 241:544-546), que consiste en un dominio VH, (vi) una CDR aislada y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un conector sintético para formar una sola cadena de proteína en la

que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tal como los diacuerpos, también se incluyen bajo el término "anticuerpo" (*ver p. ej.*, Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

La frase "proteína que contiene Fc" incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una "porción funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor Fc (p. ej., un FcyR; o un FcRn, *es decir*, un receptor Fc neonatal), y/o que pueden participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene deleciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que la hacen incapaz de unirse a cualquier receptor Fc y también incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, incluso cuando las modificaciones afectan una o más funciones efectoras de la proteína de unión (p. ej., modificaciones que afectan la unión de FcyR, la unión de FcRn y, por lo tanto, la vida media y/o la actividad de CDC). Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones y combinaciones de estas, con

referencia a la numeración de la UE de una región constante de inmunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 y 439.

Por ejemplo, y no como limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y muestra una vida media sérica mejorada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin la(s) modificación(es) mencionada(s)) y tiene una modificación en la posición 250 (p. ej., E o Q); 250 y 428 (p. ej., L o F); 252 (p. ej., L/Y/F/W o T), 254 (p. ej., S o T) y 256 (p. ej., S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (p. ej., L/R/SI/P/Q o K) y/o 434 (p. ej., H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (p. ej., 308F, V308F) y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación 428L (p. ej., M428L) y 434S (p. ej., N434S); una modificación 428L, 2591 (p. ej., V259I) y 308F (p. ej., V308F); una modificación 433K (p. ej., H433K) y 434 (p. ej., 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (p. ej., 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (p. ej., T250Q y M428L); una modificación 307 y/o 308 (p. ej., 308F o 308P).

El término “proteína de unión al antígeno”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un polipéptido o proteína (uno o más polipéptidos complejados en una unidad funcional) que reconoce específicamente un epítopo en un antígeno, tal como un antígeno específico de una célula y/o un antígeno diana de la presente invención. Una proteína de unión al antígeno puede ser multiespecífica. El término “multiespecífico” con referencia a una proteína de unión al antígeno significa que la proteína reconoce diferentes epítopos, ya sea en el mismo antígeno o en diferentes antígenos. Una proteína de unión al antígeno multiespecífica de la presente invención puede ser un único polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que están asociados entre sí de manera covalente o no covalente. El término “proteína de unión al antígeno” incluye anticuerpos o fragmentos de estos de la presente invención que pueden unirse o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este se puede vincular funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más entidades moleculares, tal como una proteína o fragmento de esta para producir una molécula de unión al antígeno multiespecífica o biespecífica con una segunda especificidad de unión.

Como se usa en la presente invención, el término "epítopo" se refiere a la porción del antígeno que es reconocida por el polipéptido de unión al antígeno multiespecífico. Un solo antígeno (tal como un polipéptido antigénico) puede tener más de un epítopo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítopos estructurales y se definen como aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción entre el polipéptido de unión al antígeno y el antígeno. Los epítopos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas modalidades, los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se retienen con la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden con el tratamiento con disolventes desnaturalizantes.

El término "dominio" se refiere a cualquier parte de una proteína o polipéptido que tiene una función o estructura particular. Preferentemente, los dominios de la

presente invención se unen a antígenos diana o específicos de células. Los dominios de unión al antígeno específico de célula o antígeno diana, y lo similar, tal como se usan en la presente descripción, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno.

El término "medio cuerpo" o "medio anticuerpo", que se usan indistintamente, se refiere a la mitad de un anticuerpo, que contiene esencialmente una cadena pesada y una cadena liviana. Las cadenas pesadas de anticuerpos pueden formar dímeros, por lo tanto la cadena pesada de un medio cuerpo puede asociarse con una cadena pesada asociada con una molécula diferente (p. ej., otro medio cuerpo) u otro polipéptido que contiene Fc. Dos dominios Fc ligeramente diferentes pueden "heterodimerizarse" como en la formación de anticuerpos biespecíficos u otros heterodímeros, trímeros, tetrámeros y lo similar. *Ver* Vincent and Murini (2012) *Biotechnol. J.* 7(12):1444-1450; y Shimamoto et al. (2012) *MAbs* 4(5):586-91. En una modalidad, el dominio variable de medio cuerpo reconoce específicamente el efector de internalización y el dominio Fc de medio cuerpo se dimeriza con una proteína de fusión Fc que comprende una enzima de reemplazo (p. ej., un pepticuerpo).

El término "fragmento variable monocatenario" o "scFv" incluye un polipéptido de fusión monocatenario que

contiene una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y una región variable de cadena liviana (VL) de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la VH y la VL están conectadas por una secuencia conectora de 10 a 25 aminoácidos. Los polipéptidos ScFv también pueden incluir otras secuencias de aminoácidos, tal como las regiones CL o CH1. Las moléculas de ScFv se pueden fabricar mediante la presentación en fagos o mediante la subclonación directa de las cadenas pesada y ligera de un hibridoma o una célula B. *Ver* Ahmad et al. (2012) *Clin. Dev. Immunol.* 2012:980250, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Como se usa en la presente descripción, el término "neonatal" en el contexto de los seres humanos abarca sujetos humanos de hasta 1 año (52 semanas) de edad o menos, preferentemente hasta las 24 semanas de edad o menos, con mayor preferencia hasta la edad de 12 semanas o menos, con mayor preferencia hasta la edad de 8 semanas o menos e incluso con mayor preferencia hasta la edad de 4 semanas o menos. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 4 semanas de edad. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 8 semanas de edad. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 3 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 2 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está

dentro de 1 semana después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 7 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 6 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 5 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 4 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 3 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 2 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 día después del nacimiento. Las ventanas de tiempo descritas anteriormente son para sujetos humanos y también pretenden cubrir las ventanas de tiempo de desarrollo correspondientes para otros animales. Como se usa en la presente descripción, una “célula neonatal” es una célula de un sujeto neonatal, y una población de células neonatales es una población de células de un sujeto neonatal.

Como se usa en la presente descripción, un “control” como en una muestra de control o un sujeto de control es un comparador para una medición, p. ej., una medición de diagnóstico de un signo o síntoma de una enfermedad. En ciertas modalidades, un control puede ser una muestra del mismo sujeto en un momento anterior, p. ej., antes de una intervención de tratamiento. En ciertas

modalidades, un control puede ser una medida de un sujeto normal, es decir, un sujeto que no tiene la enfermedad del sujeto tratado, para proporcionar un control normal, p. ej., una concentración o actividad enzimática en una muestra del sujeto. En ciertas modalidades, un control normal puede ser un control de población, es decir, el promedio de sujetos en la población general. En ciertas modalidades, un control puede ser un sujeto no tratado con la misma enfermedad. En ciertas modalidades, un control puede ser un sujeto tratado con una terapia diferente, p. ej., el tratamiento estándar. En ciertas modalidades, un control puede ser un sujeto o una población de sujetos de un estudio de historia natural de sujetos con la enfermedad del sujeto que se compara. En ciertas modalidades, el control se empareja para ciertos factores con el sujeto que se está probando, p. ej., edad, sexo. En ciertas modalidades, un control puede ser un nivel de control para un laboratorio particular, p. ej., un laboratorio clínico. La selección de un control apropiado está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Las composiciones o métodos que “comprenden” o “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 frase de transición “que consiste esencialmente en” significa que el alcance de una

reivindicación debe interpretarse para comprender los elementos especificados enumerados en la reivindicación y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Por lo tanto, el término “que consiste esencialmente en” cuando se usa en una reivindicación de esta invención no pretende ser interpretado como equivalente a “comprende”.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no y que la descripción incluye instancias en las que ocurre el evento o circunstancia e instancias en las que no ocurre.

La designación de un rango de valores incluye todos los enteros dentro o que definen el rango, y todos los subrangos definidos por enteros dentro del rango. Por ejemplo, 5-10 nucleótidos se entiende como 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, mientras que 5-10 % se entiende que contiene el 5 % y todos los valores posibles hasta el 10 %.

Se entiende que al menos 17 nucleótidos de una secuencia de 20 nucleótidos incluyen 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la secuencia proporcionada, proporcionando de esta manera un límite superior incluso si no se proporciona uno específicamente como se entendería claramente. De manera similar, se entendería que hasta 3 nucleótidos abarcan 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, proporcionando un límite inferior incluso si no se proporciona uno específicamente. Cuando “al menos”,

“hasta”, u otras palabras similares modifican un número, se puede entender que modifica cada número de la serie.

Como se usa en la presente descripción, “no más de” o “menos de” se entiende como el valor adyacente a la frase y valores lógicos inferiores o números enteros, como lógica del contexto, a cero. Por ejemplo, una región dúplex de “no más de 2 pares de bases de nucleótidos” tiene 2, 1 o 0 pares de bases de nucleótidos. Cuando ante una serie de números o un rango está presente “no más que” o “menos que”, se entiende que se modifica cada uno de los números de la serie o rango.

Como se usa en la presente descripción, “detectar un analito” y lo similar se entiende como realizar un ensayo en donde el analito puede detectarse, si está presente, en donde el analito está presente en una cantidad superior al nivel de detección del ensayo.

Como se usa en la presente descripción, la “pérdida de función” se entiende como una actividad que no está presente, p. ej., una actividad enzimática que no está presente, por cualquier motivo. En ciertas modalidades, la ausencia de actividad puede deberse a la ausencia de una proteína que tenga una función, p. ej., la proteína no se transcribe ni se traduce, la proteína se traduce pero no es estable o no se transporta adecuadamente, ya sea intracelular o sistémicamente. En ciertas modalidades, la ausencia de actividad puede deberse a la presencia de una mutación, p.

ej., mutación puntual, truncamiento, empalme anormal, de tal manera que una proteína está presente pero no es funcional. Una pérdida de función puede ser una pérdida de función parcial o completa. En ciertas modalidades, se pueden conocer diversos grados de pérdida de función que dan como resultado diversas afecciones, gravedad de la enfermedad o edad de inicio. Como se usa en la presente descripción, una pérdida de función preferentemente no es una pérdida transitoria de función, p. ej., debido a una respuesta de estrés u otra respuesta que da como resultado una pérdida temporal de una proteína funcional. Las intervenciones terapéuticas para corregir la pérdida de función de una proteína pueden incluir la compensación de la pérdida de función con la proteína que es deficiente, o con proteínas que compensan la pérdida de función, pero que tienen una secuencia o estructura diferente a la proteína para la que se pierde la función. Se entiende que la pérdida de función de una proteína puede compensarse proporcionando o alterando la actividad de otra proteína en la misma ruta biológica. En ciertas modalidades, la proteína para compensar la pérdida de función incluye uno o más de un truncamiento, mutación o secuencia no nativa para dirigir el tráfico de la proteína, intracelular o sistémicamente, para superar la pérdida de función de la proteína. La intervención terapéutica puede o no corregir la pérdida de función de la proteína en todos los tipos de células o tejidos. La intervención terapéutica puede incluir la expresión de la

proteína para compensar una pérdida de función en un sitio alejado de donde se expresa típicamente la proteína que carece de función, p. ej., donde la deficiencia da como resultado la disfunción de una célula u órgano. La intervención terapéutica puede incluir la expresión de la proteína en el hígado para compensar una pérdida de función en un sitio alejado del hígado. Varias mutaciones genéticas se han relacionado con mutaciones específicas de pérdida de función, tanto en humanos como en otras especies.

Como se usa en la presente descripción, la "deficiencia enzimática" se entiende como un nivel insuficiente de actividad enzimática debido a una pérdida de función de la proteína. Una deficiencia enzimática puede ser parcial o total y puede dar como resultado diferencias en el tiempo de aparición o la gravedad de los signos o síntomas de la deficiencia enzimática según el nivel y el sitio de la pérdida de la función. Como se usa en la presente descripción, la deficiencia enzimática preferentemente no es una deficiencia transitoria enzimática debida a estrés u otros factores. Varias mutaciones genéticas se han relacionado con deficiencias enzimáticas, tanto en humanos como en otras especies. En ciertas modalidades, las deficiencias enzimáticas dan como resultado errores congénitos del metabolismo. En ciertas modalidades, las deficiencias enzimáticas dan como resultado enfermedades de almacenamiento lisosomal. En ciertas modalidades, las

deficiencias enzimáticas dan como resultado galactosemia. En ciertas modalidades, las deficiencias enzimáticas dan como resultado trastornos hemorrágicos.

Como se usa en la presente descripción, se entiende que cuando la cantidad máxima de un valor se representa por 100 % (p. ej., 100 % de inhibición o 100 % de encapsulación), el valor se limita por el método de detección. Por ejemplo, se entiende por 100 % de inhibición a la inhibición a un nivel por debajo del nivel de detección del ensayo, y por 100 % de encapsulación se entiende que no se puede detectar ningún material destinado a la encapsulación fuera de las vesículas.

A menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera, el término “aproximadamente” comprende valores de ± 5 % de un valor establecido. En ciertas modalidades, se entiende que el término “aproximadamente” comprende la variación o el error tolerados dentro de la técnica, p. ej., 2 desviaciones estándar de la media, o la sensibilidad del método usado para tomar una medición, o un porcentaje de un valor tolerado en la técnica, p. ej., con la edad. Cuando “aproximadamente” está presente antes del primer valor de una serie, se puede entender que modifica cada valor de la serie.

El término “y/o” se refiere y comprende todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

El término “o” se refiere a cualquier miembro de una lista en particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

Las formas singulares de los artículos “uno”, “un/una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, el término “una proteína” o “al menos una proteína” puede incluir una pluralidad de proteínas, incluidas las mezclas de estas.

Estadísticamente significativa significa $p \leq 0,05$.

En caso de conflicto entre una secuencia en la solicitud y un número de acceso indicado o posición en un número de acceso, predomina la secuencia en la solicitud.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Síntesis

Se proporcionan composiciones y métodos para insertar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés en un locus genómico diana en una célula neonatal, una población de células neonatales o un sujeto neonatal o para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés en una célula neonatal, una población de células neonatales o un sujeto neonatal. También, se proporcionan métodos para tratar una deficiencia enzimática, métodos para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosomal y métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de una deficiencia enzimática o una enfermedad de almacenamiento lisosomal en un sujeto. También, se proporcionan células neonatales o poblaciones de células neonatales que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para un polipéptido de interés insertado en un locus genómico diana.

En un ejemplo específico, se proporcionan composiciones y métodos para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana en una célula neonatal, una población de células neonatales o un sujeto neonatal o para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio (p. ej.,

proteína de fusión GAA) de un locus genómico diana en una célula neonatal, una población de células neonatales o un sujeto neonatal. Se proporcionan composiciones y métodos para tratar la deficiencia de GAA, reducir la acumulación de glucógeno en un tejido, tratar la enfermedad de Pompe o prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal. También se proporcionan células neonatales o poblaciones de células neonatales que comprenden un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) insertada en un locus genómico diana.

La plataforma de inserción de genes neonatales descrita en la presente descripción tiene ventajas en términos de niveles de expresión, durabilidad de la expresión y nivel de rescate funcional de las deficiencias enzimáticas sobre las plataformas episomales existentes en los recién nacidos.

En la presente descripción, también se proporcionan constructos y composiciones de ácidos nucleicos (p. ej., vectores de expresión episomales) para la expresión de una proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA). En la presente descripción, también se proporcionan constructos y composiciones de ácido nucleico que permiten la inserción de una secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión

GAA) en un locus genómico diana, tal como un locus *ALB* endógeno y/o la expresión de la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA). Los constructos y composiciones de ácido nucleico se pueden usar en métodos para integrar o insertar un ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para expresar un proteína terapéutica (p. ej., proteína de fusión GAA) en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para tratar la enfermedad de Pompe o la deficiencia de GAA en un sujeto, y método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto, incluyendo células y sujetos neonatales.

Más específicamente, se describe en la presente descripción en algunas modalidades un producto terapéutico basado en la tecnología de edición de genes CRISPR/Cas9 y opcionalmente contenido en un sistema de administración de nanopartículas lipídicas (LNP), asociado con una plantilla de inserción de genes de ADN de proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) contenida opcionalmente en un virus adenoasociado recombinante serotipo 8 (rAAV8). El componente CRISPR/Cas9 ha sido diseñado para apuntar y cortar el ADN bicatenario en un

locus de gen diana (p. ej., un locus de puerto seguro, tal como un locus del gen de la *ALB* en hepatocitos), lo que permite que la plantilla de ADN de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., la proteína de fusión GAA) se inserte en el genoma en el locus genómico diana. La inserción del transgén proporciona un gen de proteína terapéutica multidominio funcional (p. ej., proteína de fusión GAA), que codifica la *GAA* genómica faltante o defectuosa en pacientes con la enfermedad de Pompe.

Algunas de las secuencias de codificación de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., la proteína de fusión GAA) en los constructos descritos en la presente descripción están optimizadas para la expresión en comparación con la secuencia de codificación de la GAA nativa. Por ejemplo, las secuencias de codificación en los constructos descritos en la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones, tal como la optimización de codones (p. ej., codones humanos), falta de dinucleótidos CpG, mutación de sitios de empalme crípticos o cualquier combinación de estos. Otras secuencias de codificación de proteínas terapéuticas multidominio en los constructos descritos en la presente descripción comprenden secuencias de codificación de GAA nativas.

II. Composiciones para insertar constructos de ácido nucleico que codifican y expresan polipéptidos de interés en células o células neonatales

En la presente descripción se proporcionan composiciones y constructos de ácido nucleico que permiten la inserción de una secuencia de codificación para un polipéptido de interés en un locus genómico diana, tal como un locus de *albúmina (ALB)* endógeno y/o la expresión de la secuencia de codificación del polipéptido de interés. En la presente descripción, también se proporcionan constructos y composiciones de ácidos nucleicos (p. ej., vectores de expresión episomales) para la expresión de una secuencia codificante de un polipéptido de interés. Los constructos y composiciones de ácidos nucleicos se pueden usar en métodos para la integración en un locus genómico diana y/o expresión en una célula o un sujeto. También, se proporcionan agentes de nucleasa (p. ej., dirigidos a un locus *ALB* endógeno) o ácidos nucleicos que codifican agentes de nucleasas para facilitar la integración de los constructos de ácidos nucleicos en un locus genómico diana, tal como un locus *ALB* endógeno.

También, se proporcionan en la presente descripción constructos y composiciones de ácido nucleico que permiten la inserción de una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA) en un locus genómico diana, tal como un

locus de *albúmina (ALB)* endógeno y/o expresión de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA). En la presente descripción, también se proporcionan constructos y composiciones de ácidos nucleicos (p. ej., vectores de expresión episomales) para la expresión de una proteína terapéutica multidominio (p. ej., proteína de fusión GAA). Los constructos y composiciones de ácido nucleico se pueden usar en métodos para introducir un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para insertar o integrar un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana, métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto, métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células o un tejido en un sujeto, y métodos para tratar la enfermedad de Pompe o la deficiencia de GAA en un sujeto. También, se proporcionan agentes de nucleasa (p. ej., dirigidos a un locus *ALB* endógeno) o ácidos nucleicos que codifican agentes de nucleasas para facilitar la integración de los constructos de ácidos nucleicos en un locus genómico diana, tal como un locus *ALB* endógeno.

A. Constructos de ácido nucleico que codifican un polipéptido de interés

Las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen el uso de un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para un polipéptido de interés (p. ej., una secuencia de codificación de un polipéptido exógeno). Las composiciones y métodos descritos en la presente descripción también pueden incluir el uso de un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación del polipéptido de interés o un complemento inverso de la secuencia de codificación del polipéptido de interés (p. ej., una secuencia de codificación del polipéptido exógeno o un complemento inverso de la secuencia de codificación del polipéptido exógeno). Tales constructos de ácido nucleico pueden ser para la expresión del polipéptido de interés en una célula. Tales constructos de ácido nucleico pueden ser para la inserción en un locus genómico diana o en un sitio de escisión creado por un agente de nucleasa o un sistema CRISPR/Cas como se describe en otra parte de la presente descripción. El término sitio de escisión incluye una secuencia de ADN en la que un agente de nucleasa (p. ej., una proteína Cas9 acomplejada con un ARN guía) crea una muesca o una rotura bicatenaria. En algunas modalidades, una rotura bicatenaria se crea por una proteína Cas9 acomplejada con un ARN guía, p. ej., una

proteína Spy Cas9 acomplejada con un ARN guía Spy Cas9. En algunos casos, el polipéptido de interés es un polipéptido exógeno como se define en la presente descripción.

En un ejemplo específico, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen el uso de un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio (un ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio). Tales constructos de ácido nucleico pueden ser para la expresión de la proteína terapéutica multidominio en una célula. Tales constructos de ácido nucleico pueden ser para la inserción en un locus genómico diana después de la escisión en un sitio de escisión por un agente de nucleasa o un sistema CRISPR/Cas como se describe en otra parte de la presente descripción o pueden ser para la expresión de la proteína terapéutica multidominio sin inserción en un locus genómico diana o un sitio de escisión (p. ej., en un episoma). El término sitio de escisión incluye una secuencia de ADN en la que un agente de nucleasa (p. ej., una proteína Cas9 acomplejada con un ARN guía) crea una muesca o una rotura bicatenaria. En ciertas modalidades, el sitio de escisión incluye una secuencia de ADN en la que se crea una rotura bicatenaria mediante una proteína Cas9 acomplejada con un ARN guía, p. ej., una proteína Spy Cas9 acomplejada con un ARN guía Spy Cas9.

La longitud de los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción puede variar. El constructo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 5 kb, tal como de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 4,5 kb o de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 4 kb. Un constructo de ácido nucleico ilustrativa tiene una longitud de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 5 kb o de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 4 kb. Alternativamente, un constructo de ácido nucleico puede tener entre aproximadamente 1 kb y aproximadamente 1,5 kb, aproximadamente 1,5 kb y aproximadamente 2 kb, aproximadamente 2 kb y aproximadamente 2,5 kb, aproximadamente 2,5 kb y aproximadamente 3 kb, aproximadamente 3 kb y aproximadamente 3,5 kb, aproximadamente 3,5 kb a aproximadamente 4 kb, aproximadamente 4 kb a aproximadamente 4,5 kb o aproximadamente 4,5 kb a aproximadamente 5 kb de longitud. Alternativamente, un constructo de ácido nucleico puede tener, por ejemplo, no más de 5 kb, no más de 4,5 kb, no más de 4 kb, no más de 3,5 kb, no más de 3 kb o no más de 2,5 kb de longitud.

Los constructos pueden comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), pueden ser monocatenarios, bicatenarios o parcialmente monocatenarios y parcialmente bicatenarios, y pueden introducirse en una célula huésped de forma lineal o

circular (p. ej., minicírculo). Ver, *p. ej.*, US 2010/0047805, US 2011/0281361 y US 2011/0207221, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. Si se introduce en forma lineal, los extremos del constructo se pueden proteger (p. ej., de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden agregar uno o más residuos didesoxinucleótidos al extremo 3′ de una molécula lineal y/o se pueden ligar oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos extremos. *Ver, p. ej.*, Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 y Nehls et al. (1996) *Science* 272:886-889, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. Los métodos adicionales para proteger los polinucleótidos exógenos de la degradación incluyen, pero no se limitan a, la adición de grupo(s) amino terminal(es) y el uso de enlaces internucleotídicos modificados tal como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metil ribosa o desoxirribosa. Se puede introducir un constructo en una célula como parte de una molécula de vector que tiene secuencias adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican la resistencia a antibióticos. Un constructo puede omitir elementos virales. Además, los constructos se pueden introducir como un ácido nucleico desnudo, se pueden introducir como un

ácido nucleico acomplejado con un agente tal como un liposoma o un poloxámero, o se pueden administrar mediante virus (p. ej., adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, retrovirus o lentivirus).

Los constructos descritos en la presente descripción se pueden modificar en uno o ambos extremos para incluir una o más características estructurales adecuadas según sea necesario y/o para conferir uno o más beneficios funcionales. Por ejemplo, las modificaciones estructurales pueden variar según los métodos usados para administrar los constructos descritos en la presente descripción a una célula huésped (p. ej., el uso de la administración de vectores virales o el empaquetamiento en nanopartículas lipídicas para la administración). Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, estructuras terminales tales como repeticiones terminales invertidas (ITR), horquillas, bucles y otras estructuras como toroides. Por ejemplo, los constructos descritos en la presente descripción pueden comprender uno, dos o tres ITR o pueden comprender no más de dos ITR. Se conocen varios métodos de modificaciones estructurales.

Algunos constructos pueden insertarse para que su expresión sea estimulada por el promotor endógeno en el sitio de inserción (p. ej., el promotor *ALB* endógeno cuando el constructo se integra en el locus *ALB* de la célula huésped). Tales constructos pueden no comprender un promotor que estimula la expresión del polipéptido de interés (p. ej.,

proteína terapéutica multidominio o proteína de fusión GAA). Por ejemplo, la expresión del polipéptido de interés (por ejemplo, proteína terapéutica multidominio o proteína de fusión GAA) puede ser impulsada por un promotor de la célula hospedera (por ejemplo, el promotor *ALB* endógeno cuando el transgén se integra en el locus *ALB* de una célula hospedera). En tales casos, el constructo puede carecer de elementos de control (p. ej., promotor y/o potenciador) que impulsan su expresión (p. ej., un constructo sin promotor). No obstante, en otros casos, el constructo puede comprender un promotor y/o potenciador, por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor inducible o específico de tejido (p. ej., específico de hígado o plaquetas) que estimula la expresión del polipéptido de interés (p. ej., proteína terapéutica multidominio o proteína de fusión GAA) en un episoma o tras la integración. Por ejemplo, el constructo puede ser un constructo para la expresión (p. ej., un constructo episomal) pero no para inserción. En algunas modalidades, el constructo no es para inserción. Los promotores constitutivos ilustrativos no limitativos incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés), el promotor del virus simio (SV40), el promotor principal tardío (MLP, por sus siglas en inglés) del adenovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés), la fosfoglicerato quinasa

(PGK, por sus siglas en inglés), promotor del factor de elongación alfa (EF1a, por sus siglas en inglés), promotores de ubiquitina, promotores de actina, promotores de tubulina, promotores de inmunoglobulina, un fragmento funcional de estos o una combinación de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor de CMV o un promotor de CMV truncado. En otro ejemplo, el promotor puede ser un promotor del EF1a. Los promotores inducibles ilustrativos no limitantes incluyen aquellos inducibles por choque térmico, luz, productos químicos, péptidos, metales, esteroides, antibióticos o alcohol. El promotor inducible puede ser uno que tenga un nivel de expresión basal bajo (no inducido), tal como el promotor Tet-On® (Clontech). Aunque no se requieren para la expresión, los constructos pueden comprender secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada de ribosomas internos, secuencias adicionales que codifican péptidos y/o señales de poliadenilación. El constructo puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio o una proteína de fusión GAA) corriente abajo y unida operativamente a una secuencia señal que codifica un péptido señal. En algunos ejemplos, el constructo de ácido nucleico funciona en la inserción independiente de la homología de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., proteína

terapéutica multidominio o proteína de fusión GAA). Tales constructos de ácido nucleico pueden funcionar, por ejemplo, en células que no se dividen (p. ej., células en las que la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés), no la recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés), es el mecanismo principal mediante el cual se reparan las roturas de ADN bicatenario) o células en división (p. ej., células en división activa). Tales constructos pueden ser, por ejemplo, constructos donantes independientes de la homología. En modalidades preferidas, los promotores y otras secuencias reguladoras son apropiados para su uso en seres humanos, p. ej., reconocidos por factores reguladores en células humanas, p. ej., en células hepáticas humanas, y aceptables para las autoridades reguladoras para su uso en seres humanos. Los ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen promotores TTR, tales como promotores TTR humanos o de ratón. En un ejemplo, el constructo puede comprender un promotor TTR, tal como un promotor TTR de ratón o un promotor TTR humano (p. ej., la secuencia codificante para el polipéptido de interés o proteína terapéutica multidominio se une operativamente al promotor TTR). En un ejemplo, el constructo puede comprender un potenciador SERPINA1, tal como un potenciador de SERPINA1 de ratón o un potenciador de SERPINA1 humano (p. ej., la secuencia codificante para el polipéptido de interés o proteína terapéutica multidominio se une operativamente al potenciador

de SERPINA1). En un ejemplo, el constructo puede comprender un promotor TTR y un potenciador de SERPINA1, tal como un potenciador de SERPINA1 humano y un promotor TTR de ratón (p. ej., la secuencia codificante para el polipéptido de interés o proteína terapéutica multidominio se une operativamente al potenciador de SERPINA1 y al promotor TTR).

Los constructos descritos en la presente descripción pueden modificarse para incluir o excluir cualquier característica estructural adecuada según sea necesario para cualquier uso particular y/o que confiera una o más funciones deseadas. Por ejemplo, algunos constructos descritos en la presente descripción no comprenden un brazo de homología. Algunas constructos descritos en la presente descripción pueden insertarse en un locus genómico diana o un sitio de corte en una secuencia de ADN diana para un agente de nucleasa (p. ej., pueden insertarse en un gen de puerto seguro, tal como un locus *ALB*) por unión de extremos no homólogos. Por ejemplo, tales constructos se pueden insertar en una rotura bicatenaria de extremo romo después de la escisión con un agente de nucleasa (p. ej., un sistema CRISPR/Cas, p. ej., un sistema SpyCas9 CRISPR/Cas) como se describe en la presente descripción. En un ejemplo específico, el constructo se puede administrar a través de AAV y puede insertarse mediante la unión de extremos no homólogos (p. ej., el constructo no comprende un brazo de homología).

En un ejemplo particular, el constructo se puede insertar mediante integración dirigida independiente de la homología. Por ejemplo, la secuencia de codificación del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA) en el constructo puede estar flanqueada en cada lado por un sitio diana para un agente de nucleasa (p. ej., el mismo sitio diana que en el secuencia de ADN diana para la inserción dirigida (p. ej., en un gen de puerto seguro), y el mismo agente de nucleasa que se usa para escindir la secuencia de ADN diana para la inserción dirigida). Después, el agente de nucleasa puede escindir los sitios diana que flanquean la secuencia de codificación del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA). En un ejemplo específico, el constructo se entrega mediada por AAV, y la escisión de los sitios diana que flanquean el polipéptido de la secuencia de codificación de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA) puede eliminar las repeticiones terminales invertidas (ITR) de la AAV. En algunos casos, la secuencia de ADN diana para la inserción dirigida (p. ej., la secuencia de ADN diana en un locus de puerto seguro, tal como una secuencia diana de ARNg que incluye el motivo adyacente del protoespaciador flanqueante) ya no está

presente si la secuencia codificante del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA) se inserta en el sitio de corte o la secuencia de ADN diana en la orientación correcta, pero se reforma si la secuencia codificante del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA) se inserta en el sitio de corte o en la secuencia de ADN diana en la orientación opuesta. Esto puede ayudar a garantizar que la secuencia de codificación del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA) se inserta en la orientación correcta para la expresión.

Los constructos descritos en la presente descripción pueden comprender una secuencia de poliadenilación o una secuencia de cola de poliadenilación (p. ej., corriente abajo o 3’ de una secuencia de codificación de polipéptido de interés). Los métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada son bien conocidos. La secuencia de la cola de poliadenilación se puede codificar, por ejemplo, como un tramo “poli-A” corriente abajo de la secuencia de codificación del polipéptido de interés. Una cola poli-A puede comprender, por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas y, opcionalmente, hasta 300 adeninas. En un ejemplo específico,

la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. Los métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada y/o una secuencia señal de poliadenilación son bien conocidos. Por ejemplo, la secuencia señal de poliadenilación AAUAAA se usa comúnmente en sistemas de mamíferos, aunque se han identificado variantes como UAUAAA o AU/GUAAA. *Ver, p. ej.*, Proudfoot (2011) *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. El término secuencia señal de poliadenilación se refiere a cualquier secuencia que dirija la terminación de la transcripción y la adición de una cola poli-A al transcrito de ARNm. En eucariotas, los terminadores de la transcripción son reconocidos por factores proteicos, y la terminación va seguida de poliadenilación, un proceso de adición de una cola de poli(A) a los transcritos de ARNm en presencia de la polimerasa de poli(A). La señal de poli(A) de los mamíferos consiste típicamente en una secuencia central, de aproximadamente 45 nucleótidos de largo, que puede flanquearse por diversas secuencias auxiliares que sirven para mejorar la eficiencia de la escisión y la poliadenilación. La secuencia central consiste en un elemento corriente arriba altamente conservado (AATAAA o AAUAAA) en el ARNm, denominado motivo de reconocimiento de poli A o secuencia de reconocimiento de poli A), reconocido por factor de especificidad de escisión y poliadenilación (CPSF, por

sus siglas en inglés) y un región corriente abajo (rica en Us o Gs y Us), unida por el factor de estimulación de escisión (CstF, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de terminadores de la transcripción que pueden usarse incluyen, por ejemplo, la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (HGH, por sus siglas en inglés), la señal de poliadenilación tardía del virus de simio 40 (SV40), la señal de poliadenilación de la beta-globina de conejo, la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH, por sus siglas en inglés), la señal de poliadenilación de fosfoglicerato quinasa (PGK), una secuencia de terminación de la transcripción AOX1, una secuencia de terminación de la transcripción CYC1 o cualquier secuencia de terminación de la transcripción que se sepa que es adecuada para regular la expresión génica en células eucariotas. En un ejemplo, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación tardía del virus de simio 40 (SV40). Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 712, 169 o 161. Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 169 o 161. Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 169. Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm.

de ident.: 712. En otro ejemplo, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) o una señal de poliadenilación de BGH carece de CpG. Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 162.

Los constructos descritos en la presente descripción también pueden comprender sitios aceptores de empalme (p. ej., unidos operativamente a la secuencia de codificación del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA), tal como corriente arriba o 5' de la secuencia de codificación del polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio o la secuencia de codificación de la proteína de fusión GAA)). El sitio aceptor de empalme puede, por ejemplo, comprender NAG o consistir en NAG. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme *ALB* (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *ALB* (es decir, aceptor de empalme del exón 2 de la *ALB*)). Por ejemplo, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *ALB* humana. En otro ejemplo, el aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *Alb* de ratón (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *Alb* de ratón (es decir, aceptor de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón)). En

otro ejemplo, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme de un gen que codifica el polipéptido de interés (p. ej., un aceptor de empalme GAA). Por ejemplo, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *GAA* humana. Alternativamente, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *GAA* de ratón. Los sitios aceptores de empalme adecuados adicionales útiles en eucariotas, incluidos los aceptores de empalme artificiales, son bien conocidos. *Ver*, *p. ej.*, Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res*. 15:7155-7174 y Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res*. 29:255-259, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón. En un ejemplo específico, el aceptor de corte y empalme puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 163.

En algunos ejemplos, los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden ser constructos bidireccionales, que se describen con más detalle a continuación. En algunos ejemplos, los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden ser constructos unidireccionales, que se describen con más detalle a continuación. De la misma manera, en algunos ejemplos, los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden estar

en un vector (p. ej., un vector viral, tal como AAV o rAAV8) y/o una nanopartícula lipídica como se describe con más detalle en otro lugar de la presente descripción.

(1) Polipéptidos de interés y proteínas terapéuticas multidominio

Cualquier polipéptido de interés puede codificarse por los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción. En un ejemplo, el polipéptido de interés es un polipéptido terapéutico (p. ej., un polipéptido que falta o es deficiente en un sujeto neonatal). En un ejemplo, el polipéptido de interés es una enzima.

El polipéptido de interés puede ser un polipéptido secretado (p. ej., una proteína que es secretada por la célula y/o es funcionalmente activa como una proteína extracelular soluble). Alternativamente, el polipéptido de interés puede ser un polipéptido intracelular (p. ej., una proteína que no es secretada por la célula y es funcionalmente activa dentro de la célula, incluidos los polipéptidos citosólicos solubles).

El polipéptido de interés puede ser un polipéptido silvestre. Alternativamente, el polipéptido de interés puede ser un polipéptido variante o mutante.

En un ejemplo, el polipéptido de interés es una proteína hepática (p. ej., una proteína que se produce endógenamente en el hígado y/o es funcionalmente activa en

el hígado). En otro ejemplo, el polipéptido de interés puede ser una proteína circulante producida por el hígado. En otro ejemplo, el polipéptido de interés puede ser una proteína no hepática.

El polipéptido de interés puede ser un polipéptido exógeno. Una secuencia de codificación de polipéptido "exógena" puede referirse a una secuencia de codificación que se ha introducido desde una fuente exógena a un sitio dentro del genoma de una célula huésped (p. ej., en un locus genómico tal como un locus de puerto seguro, que incluye el intrón 1 de la *ALB*). Es decir, la secuencia de codificación del polipéptido exógeno es exógena con respecto a su sitio de inserción, y el polipéptido de interés expresado a partir de tal secuencia de codificación exógena se denomina polipéptido exógeno. La secuencia de codificación exógena puede ser de origen natural o modificada, y puede ser de tipo salvaje o una variante. La secuencia de codificación exógena puede incluir secuencias de nucleótidos distintas de la secuencia que codifica el polipéptido exógeno (p. ej., un sitio de entrada ribosómico interno). La secuencia de codificación exógena puede ser una secuencia de codificación que se produce naturalmente en el genoma del huésped, como un tipo salvaje o una variante (p. ej., mutante). Por ejemplo, aunque la célula huésped contiene la secuencia codificante de interés (como un tipo salvaje o como una variante), la misma secuencia codificante o variante de esta

se puede introducir como una fuente exógena (p. ej., para la expresión en un locus que se expresa altamente). La secuencia de codificación exógena también puede ser una secuencia de codificación que no se produce de manera natural en el genoma del huésped, o que expresa un polipéptido exógeno que no se produce de manera natural en el genoma del huésped. Una secuencia de codificación exógena puede incluir una secuencia de ácido nucleico exógena (p. ej., una secuencia de ácido nucleico no es endógena a la célula receptora) o puede ser exógena con respecto a su sitio de inserción y/o con respecto a su célula receptora.

En un ejemplo, el polipéptido de interés es un polipéptido asociado con una deficiencia enzimática genética. En ciertas modalidades, la deficiencia enzimática genética da como resultado la aparición infantil de la enfermedad. En ciertas modalidades, la deficiencia enzimática genética puede ser, o rutinariamente es, diagnosticada con la evaluación del recién nacido. En ciertas modalidades, la deficiencia enzimática puede manifestarse en diversas severidades de la enfermedad, de tal manera que la edad de inicio puede incluir una forma de inicio infantil de la enfermedad y una forma de inicio posterior de la enfermedad (p. ej., forma de inicio en la niñez, la adolescencia o la edad adulta).

En un ejemplo, el polipéptido de interés es un polipéptido de alfa glucosidasa lisosomal (GAA).

En otro ejemplo, el polipéptido de interés es una proteína terapéutica multidominio. Una proteína terapéutica multidominio como se describe en la presente descripción incluye una alfa glucosidasa lisosomal (GAA; p. ej., para proporcionar actividad de reemplazo de la enzima GAA) unida o fusionada con un dominio de suministro que se une a un efector de internalización (una proteína que es capaz de internalizarse en una célula o que de cualquier otra manera participa o contribuye al tráfico de membrana retrógrada). Se pueden encontrar ejemplos de proteínas terapéuticas multidominio en WO 2013/138400, WO 2017/007796, WO 2017/190079, WO 2017/100467, WO 2018/226861, WO 2019/157224 y WO 2019/222663, cada uno de los cuales está incorporado en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción pueden comprender un dominio de suministro de unión a CD63 unido o fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal (GAA). Los dominios de unión al CD63 y a la GAA se describen con más detalle a continuación. El dominio de unión al CD63 proporciona unión al factor de internalización del CD63. La proteína terapéutica multidominio se dirige al músculo al dirigirse al CD63, que es una proteína de rápida internalización altamente expresada en el músculo. En algunas proteínas terapéuticas multidominio, el dominio de suministro de unión al CD63

está unido covalentemente a la GAA. El enlace covalente puede ser cualquier tipo de enlace covalente (es decir, cualquier enlace que implique compartir electrones). En algunos casos, el enlace covalente es un enlace peptídico entre dos aminoácidos, de tal manera que la GAA y el dominio de suministro de unión al CD63 forman total o parcialmente una cadena polipeptídica continua, como en una proteína de fusión. En algunos casos, la porción de la GAA y la porción del dominio de suministro de unión al CD63 están directamente vinculadas. En otros casos, se usa un conector, tal como un conector peptídico, para unir las dos porciones. Puede usarse cualquier conector adecuado. Ver Chen *et al.*, "Fusion protein linkers: property, design and functionality," 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013). En algunos casos, se usa un conector escindible. Por ejemplo, se puede insertar un conector escindible de catepsina entre el dominio de suministro de unión al CD63 y la GAA para facilitar la eliminación del dominio de suministro de unión al CD63 en el lisosoma. En otro ejemplo, el enlazador puede comprender una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 repeticiones de Gly_4Ser (SEC ID NO: 600). En un ejemplo, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en tres repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 713). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede

comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 715-719. En otro ejemplo, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en dos repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 714). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 720-726. En otro ejemplo, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una repetición de este tipo (sec. con núm. de ident.: 600). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 727.

En una proteína terapéutica multidominio particular, la GAA se une covalentemente al C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD63 o al C-terminal de la cadena liviana. En otra proteína terapéutica multidominio particular, la GAA está unida covalentemente al N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD63 o al N-terminal de la cadena liviana. En otra modalidad particular, la GAA se une al C-terminal de un dominio scFv anti-CD63.

Como otro ejemplo, las proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción pueden comprender un dominio de suministro de unión al TfR unido o fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal (GAA). Los dominios de unión al TfR y a la GAA se describen con más

detalle a continuación. El dominio de unión al TfR proporciona unión al factor de internalización del TfR. La proteína terapéutica multidominio producida por el hígado se dirige al músculo y al CNS al dirigirse al TfR, que se expresa en el músculo y en las células endoteliales del cerebro. La transcitosis de TfR en estas células permite el cruce de la barrera hematoencefálica. En algunas proteínas terapéuticas multidominio, el dominio de suministro de unión al TfR está unido covalentemente a la GAA. El enlace covalente puede ser cualquier tipo de enlace covalente (es decir, cualquier enlace que implique compartir electrones). En algunos casos, el enlace covalente es un enlace peptídico entre dos aminoácidos, de tal manera que la GAA y el dominio de suministro de unión al TfR forman total o parcialmente una cadena polipeptídica continua, como en una proteína de fusión. En algunos casos, la porción de la GAA y la porción del dominio de suministro de unión al TfR están directamente vinculadas. En otros casos, se usa un conector, tal como un conector peptídico, para unir las dos porciones. Puede usarse cualquier conector adecuado. Ver Chen *et al*., "Fusion protein linkers: property, design and functionality," 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013). En algunos casos, se usa un conector escindible. Por ejemplo, se puede insertar un conector escindible de catepsina entre el dominio de suministro de unión al TfR y la GAA para facilitar la eliminación del dominio de suministro de unión al TfR en el

lisosoma. En otro ejemplo, el enlazador puede comprender una secuencia de aminoácidos, p. ej., aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 repeticiones de Gly_4Ser (sec. con núm. de ident.: 600). En un ejemplo, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en tres repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 713). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 715-719. En otro ejemplo, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en dos repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 714). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 720-726. En otro ejemplo, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una repetición de este tipo (sec. con núm. de ident.: 600). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 727.

En una proteína terapéutica multidominio particular, la GAA se une covalentemente al C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TfR o al C-terminal de la cadena liviana. En otra proteína terapéutica multidominio particular, la GAA está unida covalentemente al N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TfR o al N-terminal

de la cadena liviana. En otra modalidad particular, la GAA se une al C-terminal de un dominio scFv anti-TfR.

(a) Alfa glucosidasa lisosomal (GAA)

La alfa glucosidasa lisosomal (GAA; también conocida como alfa glucosidasa ácida, preproproteína alfa glucosidasa ácida, maltasa ácida, aglucosidasa alfa, alfa-1,4-glucosidasa, amiloglucosidasa, glucoamilasa, LYAG) se codifica por la *GAA*. Esta enzima es activa en los lisosomas, donde descompone el glucógeno en glucosa.

El gen de la *GAA* humana (NCBI GeneID 2548) codifica una proteína de aminoácidos 952. En el lisosoma, la GAA humana se procesa secuencialmente por proteasas a polipéptidos de 76-, 19,4- y 3,9-kDa que permanecen asociados. La escisión adicional entre R(200) y A(204) convierte de manera ineficiente el polipéptido de 76-kDa en la forma madura de 70-kDa con un polipéptido adicional de 10,4-kDa. La maduración de la GAA aumenta su afinidad por el glucógeno entre 7-10 veces. Un péptido señal se codifica por los aminoácidos 1-27, un propéptido codificado por los aminoácidos 28-69, alfa glucosidasa lisosomal después de la eliminación del péptido señal y el propéptido se codifica por los aminoácidos 70-952, la alfa glucosidasa lisosomal de 76 kDa se codifica por los aminoácidos 123-952, y la alfa glucosidasa lisosomal de 70 kDa se codifica por los aminoácidos 204-952.

El GAA expresado a partir de las composiciones y métodos descritos en la presente descripción puede ser cualquier GAA silvestre o variante. En un ejemplo, la GAA es una proteína GAA humana. A la GAA humana se le asigna el número de referencia P10253 de UniProt. A una secuencia de aminoácidos ilustrativa para GAA humana se le asigna el número de acceso NCBI NP_000143.2 y se establece en la sec. con núm. de ident.: 170. A una secuencia de ARNm (ADNc) de *GAA* humana ilustrativa se le asigna el número de acceso NCBI NM_000152.5 y se establece en la sec. con núm. de ident.: 171. A una secuencia codificante de *GAA* humana ilustrativa se le asigna CCDS ID CCDS32760.1 y se establece en la sec. con núm. de ident.: 172. Una secuencia de aminoácidos de GAA humana madura ilustrativa (es decir, la secuencia de GAA humana después de eliminar el péptido señal y el propéptido) que comienza en el aminoácido 70 (es decir, GAA 70-952) se establece en la sec. con núm. de ident.: 173. Una secuencia codificante ilustrativa para GAA 70-952 se establece en la sec. con núm. de ident.: 174.

En algunos ejemplos, el GAA (p. ej., GAA humano) es una secuencia o un fragmento de GAA silvestre (p. ej., GAA humano silvestre) de este. Por ejemplo, la GAA puede ser un fragmento que comprenda la secuencia de aminoácidos de la GAA madura (es decir, la secuencia de la GAA después de eliminar el péptido señal y el propéptido), un fragmento que comprenda la forma de 77 kDa de la GAA, o un fragmento

que comprenda la forma de 70 kDa de la GAA. En un ejemplo específico, el GAA puede comprender la sec. con núm. de ident.: 173 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo específico, la GAA puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo específico, la GAA puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 173.

Las secuencias codificantes del GAA en los constructos descritos en la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones, tal como la optimización de codones (p. ej., codones humanos), carencia de dinucleótidos CpG, mutación de sitios de empalme crípticos, adición de uno o más sitios de glicosilación o cualquier combinación de estos. Los dinucleótidos CpG en un constructo pueden limitar la utilidad terapéutica del constructo. En primer lugar, los dinucleótidos CpG no metilados pueden interactuar con el receptor 9 tipo toll del huésped (TLR-9) para estimular respuestas inmunitarias proinflamatorias innatas. En segundo lugar, una vez que los dinucleótidos CpG se metilan, pueden provocar la supresión de la expresión transgénica coordinada por proteínas de unión a metil-CpG. Los sitios de empalme crípticos son secuencias en un ARN premensajero que normalmente no se

usan como sitios de empalme, pero que pueden activarse, por ejemplo, mediante mutaciones que inactivan los sitios de empalme canónicos o crean sitios de empalme donde antes no existían. La selección precisa del sitio de empalme es fundamental para una expresión génica exitosa, y la eliminación de los sitios de empalme crípticos puede favorecer el uso del sitio de empalme normal o previsto.

En un ejemplo, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG). En otro ejemplo, una secuencia codificante de GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece completamente de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la presente descripción está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En un ejemplo específico, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la

presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados y tiene uno o más o todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia codificante del GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., optimizada por codones para la expresión en un ser humano o un mamífero). En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de la GAA en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece completamente de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero).

Se proporcionan varias secuencias de codificación de la GAA. En un ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212. En otro

ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182 y 205-212. Se proporcionan varias secuencias de codificación de la GAA. En un ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una

secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174-182. En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %,

o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de

GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

Se proporcionan varias secuencias codificantes de GAA optimizadas por codones. La secuencia de codificación de la GAA puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 175-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.:

175-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 175-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 175-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 175-182. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 175-182. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA

(o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro

ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o

comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:

173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:

174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una

secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por

ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente,

la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm.

de ident.: 181. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 181 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA

comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 181. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 181. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 181. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec.

con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al

menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180 y codifica

una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 180 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 180. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 180. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 180. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una

proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica

a la sec. con núm. de ident.: 178 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 178 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 178. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 178. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 178. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada

por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores

codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

Se proporcionan varias otras secuencias codificantes de GAA. En un ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 174 y 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con

núm. de ident.: 174 y 205-212. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una

proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

Se proporcionan varias otras secuencias codificantes de GAA optimizadas por codones. La secuencia de codificación de la GAA puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de

la GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 205-212. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la GAA consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 205-212. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia

codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia

codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec.

con núm. de ident.: 176 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia

codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %,

o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174.

En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al

menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al

menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro

ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 205 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 205. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 205. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 205. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece

completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos

99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 206 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.:

173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 206. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 206. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 206. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia)

al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una

secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o

100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 207 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 207. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 207. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 207. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo).

Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o

comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 208. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 208. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 208. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de

CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores

codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209. En otro ejemplo, la secuencia codificante de

GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.:

209. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 209. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 209. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la

actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al

menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una

secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 210. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 210. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 210. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia)

al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al

menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211 y codifica una proteína de

GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 211. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 211. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 211. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA

codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

En un ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos

99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212 y codifica una proteína de GAA (o una proteína de GAA que comprende una secuencia) en al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212 y codifica una proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 212. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 212. En otro ejemplo, la secuencia codificante de GAA consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 212. La secuencia codificante del GAA puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/o estar optimizada por codones. Por ejemplo, la secuencia codificante de GAA puede carecer de CpG (p. ej., carecer completamente de CpG) y estar optimizada por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína del GAA (o una proteína del GAA que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, p. ej., que conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína GAA (o una proteína GAA que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una

proteína de GAA que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173. Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína de GAA que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o *GAA* específicas, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si una *GAA* o el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los elementos del constructo se describen en la presente descripción en un orden específico de 5' a 3', también pretenden comprender el complemento inverso del orden de esos elementos. Una razón de esto es que, en muchas modalidades descritas en la presente descripción, la *GAA* o los constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena

positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

(b) Dominio de entrega de unión a CD63

Las proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción pueden comprender un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una GAA. El dominio de unión a CD63 proporciona unión al factor de internalización CD63 (UniProt Ref. P08962-1). El CD63 (también conocido como antígeno CD63, granulofisina, proteína 3 de membrana asociada a lisosomas, LAMP-3, proteína 1 de membrana integral de lisosomas, Limp1, antígeno ME491 asociado a melanoma, OMA81H, antígeno asociado a melanoma ocular, tetraspanina-30 o Tspan-30) es un miembro de la superfamilia tetraspanina de proteínas de la superficie celular que atraviesan la membrana celular cuatro veces. Está codificado por el gen *CD63* (también conocido como *MLA1* o *TSPAN30*). El CD63 se expresa en prácticamente todos los tejidos y se cree que participa en la formación y estabilización de complejos de

señalización. El CD63 se localiza en la membrana celular, la membrana lisosomal y la membrana endosomal tardía. Se sabe que el CD63 se asocia con integrinas y puede involucrarse en la transición epitelial-mesenquimatosa.

En algunas proteínas terapéuticas multidominio, el dominio de suministro de unión a CD63 es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo u otra proteína de unión al antígeno. En algunas proteínas terapéuticas multidominio, el dominio de suministro de unión a CD63 es una proteína de unión al antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno incluyen, por ejemplo, una molécula de fusión de receptor, una molécula captadora, una molécula de fusión de receptor-Fc, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula Fv monocatenario (scFv), un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo con dominio eliminado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP, por sus siglas en inglés), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada VHH) y un dominio IgNAR variable de tiburón. Se pueden encontrar ejemplos de dominios de suministro de unión a CD63

en WO 2013/138400, WO 2017/007796, WO 2017/190079, WO 2017/100467, WO 2018/226861, WO 2019/157224 y WO 2019/222663, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines.

En una proteína terapéutica multidominio particular, el dominio de suministro de unión a CD63 es un scFv anti-CD63. En un ejemplo específico, el scFv anti-CD63 puede comprender la sec. con núm. de ident.: 183 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo específico, el scFv anti-CD63 puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo específico, el scFv anti-CD63 puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 183.

Las secuencias de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en los constructos descritos en la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones tales como optimización de codones (p. ej., codones humanos), eliminación de dinucleótidos CpG, mutación de sitios de empalme crípticos, adición de uno o más sitios de glicosilación o cualquier combinación de estos. Los dinucleótidos CpG en un constructo pueden limitar la utilidad terapéutica del constructo. En primer lugar, los dinucleótidos CpG no metilados pueden interactuar con el receptor 9 tipo toll del huésped (TLR-9) para estimular

respuestas inmunitarias proinflamatorias innatas. En segundo lugar, una vez que los dinucleótidos CpG se metilan, pueden provocar la supresión de la expresión transgénica coordinada por proteínas de unión a metil-CpG. Los sitios de empalme crípticos son secuencias en un ARN premensajero que normalmente no se usan como sitios de empalme, pero que pueden activarse, por ejemplo, mediante mutaciones que inactivan los sitios de empalme canónicos o crean sitios de empalme donde antes no existían. La selección precisa del sitio de empalme es fundamental para una expresión génica exitosa, y la eliminación de los sitios de empalme crípticos puede favorecer el uso del sitio de empalme normal o previsto.

En un ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene

todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece completamente de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción está optimizado por codones (por ejemplo, codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En un ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados y tiene uno o más o todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados

(es decir, carece completamente de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero).

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-CD63. En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 consiste en la secuencia

expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 184-192. En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o

100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-CD63 optimizadas por codones. La

secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 185-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 185-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 185-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 185-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 185-192. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-

CD63 consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 185-192. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos

anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la

secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o

100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 186 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencias expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 186. La secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia

codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al

menos 99 % al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63

que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína anti-CD63 scFv que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 184. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 184. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 184. La secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con

núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro

ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 %

idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 191 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína anti-CD63 scFv que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 191 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencias expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 191. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 191. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 191. La secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv

anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores

codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %,

o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 190 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 190 y codifica

una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencias expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 190. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 190. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-CD63 consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 190. La secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica

a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 188. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el

92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 %

idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 188 y codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 188 y codifica una proteína scFv anti-CD63 que la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 188. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 188.

En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 188. La secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-CD63 puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 (o una proteína scFv anti-CD63 que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de

ident.: 183 (y, por ejemplo, que conserva la actividad de unión de CD63). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-CD63 en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-CD63 que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o scFv anti-CD63 específico, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o un scFv anti-CD63 descritos en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los elementos del constructo se describen en la presente descripción en un orden específico de 5' a 3', también pretenden comprender el complemento inverso del orden de esos elementos. Una razón para esto es que, en muchas modalidades descritas en la

presente descripción, los constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o el scFv anti-CD63 son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y – se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

(c) Dominio de entrega de unión al TfR

Las proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción pueden comprender un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una GAA. El dominio de unión al TfR proporciona la unión a la proteína 1 del receptor de transferrina del factor de internalización (TfR; UniProt Ref. P02786). El TfR (también conocido como TR, TfR1 y Trfr) se codifica por el gen de *TFRC*. El TfR se expresa en el músculo y en las células endoteliales del cerebro. La transcitosis de TfR en estas células permite el cruce de la barrera hematoencefálica. En algunas modalidades, las proteínas terapéuticas multidominio que comprenden un dominio de suministro de unión a TfR (por

ejemplo, scFv) fusionado con un GAA no alteran la captación de transferrina. En algunas modalidades, las proteínas terapéuticas multidominio que comprenden un dominio de suministro de unión a TfR (por ejemplo, scFv) fusionado con un GAA no alteran la homeostasis del hierro. En algunas modalidades, las proteínas terapéuticas multidominio que comprenden un dominio de suministro de unión a TfR (por ejemplo, scFv) fusionado con un GAA no alteran la captación de transferrina ni la homeostasis del hierro.

El receptor 1 de transferrina (TfR, por sus siglas en inglés) es un receptor de membrana implicado en el control del suministro de hierro a la célula a través de la unión de la transferrina, la principal proteína transportadora de hierro. El receptor de transferrina 1 se expresa a partir del gen *TFRC*. El receptor 1 de transferrina puede denominarse, en la presente descripción, TFRC. Este receptor juega un papel clave en el control de la proliferación celular porque el hierro es esencial para mantener la actividad de la ribonucleótido reductasa y es la única enzima que cataliza la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos. Preferentemente, el TfR es TfR humano (hTfR). Ver *p. ej.*, números de acceso NP_001121620.1; BAD92491.1; y NP_001300894.1.; y entrada e!Ensembl: ENSG00000072274. El receptor 1 de la transferrina humana se expresa en varios tejidos, incluidos, pero no se limitan a, la corteza cerebral; cerebelo; hipocampo; caudado; glándula

paratiroidea; glándula suprarrenal; bronquio; pulmón; mucosa oral; esófago; estómago; duodeno; intestino delgado; colon; recto; hígado; vesícula biliar; páncreas; riñón; vejiga urinaria; testículo; epidídimo; próstata; vagina; ovario; trompa de Falopio; endometrio; cuello uterino; placenta; mama; músculo del corazón; músculo liso; tejido blando; piel; apéndice; ganglio linfático; amígdala; y médula ósea. Un receptor de la transferrina relacionado es el receptor 2 de la transferrina (TfR2). El receptor 2 de la transferrina humana tiene aproximadamente un 45 % de identidad de secuencia con el receptor 1 de la transferrina humana. Trinder & Baker, Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Mar;35(3):292-6. A menos que se indique de cualquier otra manera, el receptor de la transferrina como se usa en la presente descripción generalmente se refiere al receptor 1 de la transferrina (*p. ej.*, receptor 1 de la transferrina humana).

La transferrina humana (Tf) es un miembro de cadena monocatenaria de 80 kDa de la superfamilia de proteínas de unión a aniones. La transferrina es un precursor de aminoácidos 698 que se divide en una secuencia señal de 19 aa más un segmento maduro de 679 aa que normalmente contiene enlaces disulfuro intracatenarios 19. Las regiones (o dominios) flanqueantes N-terminales y C-terminales se unen al hierro férrico a través de la interacción de un anión obligado (*p. ej.*, bicarbonato) y cuatro aminoácidos (His,

Asp y dos Tyr). La apotransferrina (o libre de hierro) se unirá inicialmente a un átomo de hierro en el C-terminal, y esto es seguido por la posterior unión de hierro por el N-terminal para formar holotransferrina (Tf diférrica, Holo-Tf). A través de su dominio de unión al hierro C-terminal, la holotransferrina interactuará con el TfR en la superficie de las células donde se internaliza en endosomas acidificados. El hierro se disocia de la molécula Tf dentro de estos endosomas y se transporta al citosol como hierro ferroso. Además del TfR, se informa que la transferrina se une a cubulina, IGFBP3, proteínas microbianas de unión al hierro y TfR2 específico del hígado.

La barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) se encuentra dentro de la microvasculatura del cerebro y regula el paso de moléculas de la sangre al cerebro. Burkhart et al., Accessing targeted nanoparticles to the brain: the vascular route. Curr Med Chem. 2014;21(36):4092-9. El paso transcelular a través de las células endoteliales de los capilares cerebrales puede tener lugar a través de 1) la entrada celular de los leucocitos; 2) afluencia mediada por portadores de *p. ej.*, glucosa por transportador de glucosa 1 (GLUT-1), aminoácidos por *p. ej.*, el transportador 1 de aminoácidos de tipo L (LAT-1) y péptidos pequeños *p. ej.*, péptido B transportador de aniones orgánicos (OATP-B); 3) paso paracelular de pequeñas moléculas hidrofóbicas; 4)

transcitosis mediada por adsorción de *p. ej.*, albúmina y moléculas cationizadas; 5) difusión pasiva de solutos no polares solubles en lípidos, incluido el CO_2 y O_2; y 5) transcitosis mediada por receptor de, p. ej., insulina por el receptor de insulina y Tf por el TfR. Johnsen et al., Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery, Prog Neurobiol. 2019 Oct;181:101665.

Por ejemplo, se proporcionan proteínas de fusión anti-TfR:GAA que exhiben alta afinidad al receptor de transferrina y un cruce superior de la barrera hematoencefálica. Sorprendentemente, las fusiones que exhiben alta afinidad de unión al TfR cruzaron la barrera hematoencefálica de manera más eficiente que las de los aglutinantes de baja afinidad. Las fusiones de la presente invención tienen la capacidad de suministrar GAA de manera eficiente al cerebro y, por tanto, son un tratamiento efectivo para las enfermedades por almacenamiento de glucógeno, tales como la enfermedad de Pompe.

En la presente descripción se proporcionan proteínas de unión al antígeno, tales como anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de estos, tales como Fabs y scFvs, que se unen específicamente al receptor de la transferrina, preferentemente el receptor 1 de la transferrina humana (anti-hTfR). Por ejemplo, en una modalidad, el anti-hTfR está en forma de proteína de fusión. La proteína de fusión incluye la proteína de unión

al antígeno anti-hTfR fusionada con GAA. Los anti-hTfR cruzan eficientemente la barrera hematoencefálica (BBB) y pueden, por lo tanto, entregar la GAA fusionada al cerebro.

Una proteína de unión al antígeno que se une específicamente al receptor de la transferrina y las fusiones de este, por ejemplo, una etiqueta como His_6 y/o myc (p. ej., receptor de la transferrina humana (p. ej., REGN2431) o receptor de la transferrina de mono (p. ej., REGN2054)) se une a aproximadamente 25 °C, p. ej., en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, con una K_D de aproximadamente 20 nM o una afinidad mayor. Dicha proteína de unión al antígeno puede denominarse “anti-TfR”.

En una modalidad, una proteína de fusión scFv:GAA anti-hTfR incluye un scFv que comprende la disposición de regiones variables como sigue LCVR-HCVR o HCVR-LCVR, en donde el HCVR y el LCVR se conectan opcionalmente mediante un conector y el scFv se conecta opcionalmente por un conector a GAA (p. ej., LCVR-$(Gly_4Ser)_3$-HCVR-$(Gly_4Ser)_2$)-GAA; o LCVR-$(Gly_4Ser)_3$-HCVR-$(Gly_4Ser)_2$)-GAA) (Gly_4Ser = sec. con núm. de ident.: 600)). En un ejemplo, el enlazador entre HCVR y LCVR comprende, consiste esencialmente en, o consiste en tres repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 713). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 715-719. En otro ejemplo, el enlazador entre HCVR y LCVR comprende, consiste

esencialmente en, o consiste en dos repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 714). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 720-726. En otro ejemplo, el enlazador entre HCVR y LCVR comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una repetición de este tipo (sec. con núm. de ident.: 600). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 727. En un ejemplo, el enlazador entre scFv y GAA comprende, consiste esencialmente en, o consiste en tres repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 713). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 715-719. En otro ejemplo, el enlazador entre scFv y GAA comprende, consiste esencialmente en, o consiste en dos repeticiones de este tipo (sec. con núm. de ident.: 714). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 720-726. En otro ejemplo, el enlazador entre scFv y GAA comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una repetición de este tipo (sec. con núm. de ident.: 600). Por ejemplo, la secuencia codificante del enlazador puede

comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 727.

Un anti-hTfR:GAA comprende opcionalmente un péptido señal, conectado a la proteína de unión al antígeno que se une específicamente al receptor de transferrina (TfR), preferentemente, un receptor de la transferrina humana (hTfR) que se fusiona (opcionalmente mediante un conector) con la GAA. En una modalidad, el péptido señal es la secuencia señal mROR (p. ej., secuencia señal mROR-LCVR-$(Gly_4Ser)_3$-HCVR-$(Gly_4Ser)_2$)-GAA; o LCVR-$(Gly_4Ser)_3$-HCVR-$(Gly_4Ser)_2$)-GAA) (Gly_4Ser = sec. con núm. de ident.: 600)). El término "fusionado" o "unido" con respecto a polipéptidos fusionados se refiere a polipéptidos unidos directa o indirectamente (*p. ej.*, a través de un conector u otro polipéptido).

En una modalidad de la invención, la asignación de aminoácidos a cada marco o dominio CDR en una inmunoglobulina está de acuerdo con las definiciones de las Secuencias de proteínas de interés inmunológico, Kabat et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5ta edición; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 o Chothia, *et al.*, (1989) Nature 342: 878-883. Por lo tanto, se incluyen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, incluidas las CDR de un V_H y las CDR de una V_L, cuyas V_H y V_L comprenden secuencias de aminoácidos como

se exponen en la presente descripción (*ver, p. ej.*, secuencias de la Tabla 29, o variantes de estas), en donde las CDR son como se definen según Kabat y/o Chothia.

En algunas proteínas terapéuticas multidominio, el dominio de suministro de unión al TfR es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo u otra proteína de unión al antígeno. En algunas proteínas terapéuticas multidominio, el dominio de suministro de unión al TfR es una proteína de unión al antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno incluyen, por ejemplo, una molécula de fusión de receptor, una molécula captadora, una molécula de fusión de receptor-Fc, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula Fv monocatenario (scFv), un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo con dominio eliminado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP, por sus siglas en inglés), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada VHH) y un dominio IgNAR variable de tiburón.

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente al receptor 1 de

la transferrina humana. El término “anticuerpo”, como se usa en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas livianas (LC), interconectadas por enlaces disulfuro. En una modalidad, cada cadena pesada de anticuerpo (HC) comprende una región variable de cadena pesada (“HCVR” o “V_H”) (p. Ej., comprende las sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 y/o 527 o una variante de estas) y una región constante de cadena pesada (p. ej., IgG humana, IgG1 humana o IgG4 humana); y cada cadena liviana (LC) de anticuerpo comprende una región variable de cadena liviana (“LCVR” o “V_L”) (p. ej., sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 y/o 532 o una variante de estas) y una región constante de cadena liviana (p. ej., kappa humana o lambda humana). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR. Los anticuerpos anti-TfR descritos en la presente descripción también se pueden fusionar con GAA.

Una proteína de unión al antígeno anti-TfR de la presente invención puede ser un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que puede unirse a la GAA. Los términos “porción de unión al antígeno” o “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo, como se usan en la presente descripción, se refieren a una molécula de inmunoglobulina que se une a antígeno pero que no incluye todas las secuencias de un anticuerpo completo (preferentemente, el anticuerpo completo es una IgG). Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv monocatenarias (scFv); y (vi) fragmentos dAb; que consisten en residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (p. ej., una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas, tal como anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, por sus siglas en inglés), también se incluyen dentro de la expresión “fragmento de unión al antígeno”, como se usa en la presente descripción.

Una proteína de unión al antígeno anti-TfR puede ser un scFv que puede unirse a un GAA. Un scFv (variable de

fragmento de cadena monocatenaria) tiene regiones variables de dominio pesado (V_H) y liviano (V_L) (en cualquier orden), que, preferentemente, se unen mediante un conector flexible (p. ej., un conector peptídico). La longitud del conector flexible usado para unir ambas regiones V puede ser importante para producir el plegamiento correcto de la cadena polipeptídica. Previamente, se ha estimado que el conector peptídico debe abarcar 3,5 nm (35Å) entre el extremo carboxi del dominio variable y el extremo amino del otro dominio sin afectar la capacidad de los dominios para plegarse y formar un sitio intacto de unión al antígeno de unión (Huston et al., Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. Methods in Enzymology. 1991;203:46-88). En una modalidad, el conector comprende una secuencia de aminoácidos de tal longitud que separa los dominios variables en aproximadamente 3,5 nm.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá, en una modalidad, al menos un dominio variable. El dominio variable puede tener cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR, que es adyacente o está enmarcada con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse entre sí en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H - V_H, V_H - V_L o V_L - V_L.

Alternativamente, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V_H o V_L.

Las proteínas de unión al antígeno "aisladas" (p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos), polipéptidos, polinucleótidos y vectores, están al menos parcialmente libres de otras moléculas biológicas de las células o del cultivo celular a partir del cual se producen. Tales moléculas biológicas incluyen ácidos nucleicos, proteínas, otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígenos, lípidos, carbohidratos u otros materiales, tales como desechos celulares y medios de cultivo. Una proteína de unión al antígeno aislada puede además estar al menos parcialmente libre de componentes del sistema de expresión, tales como moléculas biológicas de una célula huésped o del medio de cultivo de esta. En general, el término "aislado" no pretende referirse a la ausencia total de tales moléculas biológicas (p. ej., pueden quedar cantidades menores o insignificantes de impurezas) o a la ausencia de agua, reguladores o sales o a los componentes de una formulación farmacéutica que incluye las proteínas de unión al antígeno (p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno).

Una proteína de unión al antígeno anti-TfR de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal que puede unirse a GAA. La presente invención incluye proteínas de unión al antígeno monoclonales anti-TfR, p.

ej., anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos, así como composiciones monoclonales que comprenden una pluralidad de proteínas de unión al antígeno monoclonales aisladas. El término “anticuerpo monoclonal” o “mAb”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un miembro de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpo que componen la población son idénticas en la secuencia de aminoácidos excepto por posibles mutaciones que ocurren de manera natural que pueden ser presentes en cantidades menores. Una “pluralidad” de tales anticuerpos monoclonales y fragmentos en una composición se refiere a una concentración de anticuerpos y fragmentos idénticos (es decir, como se discutió anteriormente, en la secuencia de aminoácidos, excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores), lo que ocurriría normalmente en la naturaleza, p. ej., en la sangre de un organismo huésped, tal como un ratón o un ser humano.

En una modalidad, una proteína de unión al antígeno anti-TfR, p. ej., un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno (que puede unirse a una carga útil) comprende un dominio constante de cadena pesada, p. ej., del tipo IgA (p. ej., IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) o IgM. En una modalidad de la invención, una proteína de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo o

un fragmento de unión al antígeno, comprende un dominio constante de cadena liviana, p. ej., del tipo kappa o lambda.

En la presente descripción se incluyen proteínas de unión al antígeno anti-TfR humano que pueden unirse a la GAA. El término proteína de unión al antígeno "humana", tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, como se usa en la presente descripción, incluye anticuerpos y fragmentos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, ya sea en una célula humana o injertada en una célula no humana, p. ej., una célula de ratón. *Ver, p. ej.*, US8502018, US6596541 o US5789215. Los mAb humanos anti-TfR de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en los CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir mAb en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (p. ej., ratón) se han injertado en secuencias de FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos de manera recombinante en un mamífero no humano o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir anticuerpos naturales aislados directamente de un sujeto humano.

También se incluyen en la presente descripción proteínas de unión al antígeno quiméricas anti-TfR, p. ej., anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos (que pueden unirse a GAA), y métodos de uso de estas. Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que tiene el dominio variable de un primer anticuerpo y el dominio constante de un segundo anticuerpo, donde el primer y el segundo anticuerpos son de diferentes especies. (*Ver, p. ej.*, US4816567; y Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 6851-6855).

El término proteínas de unión al antígeno anti-TfR "recombinantes", tal como anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos (que pueden unirse a la GAA), se refiere a tales moléculas creadas, expresadas, aisladas u obtenidas mediante tecnologías o métodos conocidos en la técnica como tecnología de ADN recombinante que incluye, p. ej., empalme de ADN y expresión transgénica. El término incluye anticuerpos expresados en un mamífero no humano (incluidos mamíferos no humanos transgénicos, p. ej., ratones transgénicos), o una célula (p. ej., células CHO), tal como un sistema de expresión celular o aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes.

Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70-99,9 % (p. ej., 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91,

92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 %) idéntica o similar a una secuencia de aminoácidos referenciada que se expone en la presente descripción (p. ej., cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 217-220; 222-225; 227-230; 232-235; 237-240; 242-245; 247-250; 252-255; 257-260; 262-265; 267-270; 272-275; 277-280; 282-285; 287-290; 292-295; 297-300; 302-305; 307-310; 312-315; 317-320; 322-325; 327-330; 332-335; 337-340; 342-345; 347-350; 352-355; 357-360; 362-365; 367-370; 372-375; 377-380; 382-385; 387-390; 392-395; 397-400; 402-405; 407-410; 412-415; 417-420; 422-425; 427-430; 432-435; 437-440; 442-445; 447-450; 452-455; 457-460; 462-465; 467-470; 472-475; 477-480; 482-485; 487-490; 492-495; 497-500; 502-505; 507-510; 512-515; 517-520; 522-525; 527-530; 532-535; 703 (opcionalmente sin incluir el N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 673)), 704 (opcionalmente sin incluir el N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 673)), 705 (opcionalmente sin incluir el N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 673)), 706 (opcionalmente sin incluir el N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 673)); 538-573, 603-672 o 675-702); cuando la comparación se realiza mediante un algoritmo BLAST en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor coincidencia entre las respectivas secuencias en toda la longitud de las respectivas secuencias de referencia (p. ej., umbral

esperado: 10; longitud de palabra: 3; coincidencias máximas en un rango de consulta: 0; matriz BLOSUM 62; diferencia de costos: existencia 11, extensión 1; ajuste de matriz de puntuación de composición condicional) y/o que comprende la secuencia de aminoácidos pero que tiene una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) mutaciones (p. ej., mutación puntual, inserción, truncamiento y/o eliminación). Preferentemente, ectodominio de la GAA funcional.

Las siguientes referencias se relacionan con los algoritmos BLAST que se usan a menudo para el análisis de secuencias: ALGORITMOS BLAST: Altschul et al. (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S. F., et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., et al., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L., et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F., et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et al., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J. C., et al., (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J. M. et al., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; SISTEMAS DE PUNTUACIÓN DE ALINEACIÓN: Dayhoff, M. O., et al., “A model of evolutionary change in proteins.” in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suplement 3. M. O. Dayhoff (ed.), págs. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Schwartz, R. M., et al., “Matrices for detecting distant relationships.” in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suplemento 3. M. O.

Dayhoff (ed.), págs. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D. J., et al., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:10915-10919; Altschul, S. F., et al., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87:2264-2268; Karlin, S., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:5873-5877; Dembo, A., et al., (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) págs. 1-14, Plenum, N.Y.

En una modalidad de la invención, un anti-hTfR:Payload o anti-hTfR:Payload (p. ej., en formato scFv, Fab, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de estos), p. ej., donde la carga útil es GAA humana, exhibe uno o más de las siguientes características:

- Afinidad (K_D) para unirse al TfR humano a 25 °C en formato de resonancia de plasmones superficiales de aproximadamente 41 nM o una afinidad mayor (*p. ej.*, aproximadamente de 1 o 0,1 nM o aproximadamente de 0,18 a aproximadamente 1,2 nM, o superior);

- Afinidad (K_D) para unirse al TfR de mono a 25 °C en formato de resonancia de plasmones superficiales de aproximadamente 0 nM (unión no detectable) o una afinidad mayor (*p. ej.*, de aproximadamente 20 nM o superior);
- Relación de K_D para unirse al TfR de mono/TfR humano a 25 °C en formato de resonancia de plasmones superficiales de 0 a 278 (*p. ej.*, aproximadamente 17 o 18);
- Bloquea aproximadamente 3, 5, 10 o 13 % del hTfR (*p. ej.*, Hmm-hTFRC tal como REGN2431) que se une a la holo-transferrina humana cuando está en formato Fab (IgG1), *p. ej.*, no más de aproximadamente 45 % de bloqueo;
- Bloquea aproximadamente 6, 8, 10 o 13 % del hTfR (*p. ej.*, Hmm-hTFRC tal como REGN2431) que se une la holo-transferrina humana cuando está en formato scFv (V_k-V_H), *p. ej.*, no más de aproximadamente 45 % de bloqueo;
- Bloquea aproximadamente 11, 17, 23 o 26 % del hTfR (*p. ej.*, Hmm-hTFRC tal como REGN2431) que se une a la holo-transferrina humana cuando está en formato scFv (V_H-V_L), *p. ej.*, no más de aproximadamente 45 % de bloqueo;

- Exhibe una relación de aproximadamente 1 o mayor; 0,67 o mayor; 1,08 o mayor; 0,91 o mayor; 0,65 o mayor; 0,55 o mayor; 0,50 o mayor; 0,27 o mayor; 0,72 o mayor; 1,05 o mayor; 0,49 o mayor; 0,29 o mayor; 1,29 o mayor; 1,72 o mayor; 1,79 o mayor; 3,08 o mayor; 1,24 o mayor; 0,59 o mayor; o 0,47 o mayor (o aproximadamente de 1-2 o mayor) de la proteína hGAA madura en el cerebro (normalizada a la del control positivo scFv 8D3:GAA) en ratones (*p. ej.*, ratones knock-in *Tfrc*$^{hum/hum}$) a los que se administró la molécula a través de HDD, cuando estaba en formato anti-hTfR scFv:hGAA; o suministra proteína GAA humana madura al cerebro de seres humanos a los que se administra dicha molécula scFv:hGAA;
- Muestra una relación de aproximadamente 0,44, 0,05, 1,13 o 0,60 (aproximadamente 0,1-1,2) de proteína hGAA madura en el parénquima cerebral (normalizada a la del control positivo scFv 8D3:GAA) en ratones (*p. ej.*, ratones Tfrc$^{hum/hum}$ sustitutos) a los que se administró la molécula a través de HDD, cuando estaba en formato anti-hTfR scFv:hGAA; o suministra proteína GAA humana madura en el

parénquima cerebral de seres humanos a los que se administra dicha molécula scFv:hGAA;

- Muestra una relación de aproximadamente 0,67, 1,80, 1,78 o 7,74 (aproximadamente 1-2) de proteína hGAA madura en el cuádriceps (normalizada a la del control positivo 8D3:GAA scFv) en ratones (*p. ej.*, ratones $Tfrc^{hum/hum}$ sustitutos) a los que se administró la molécula a través de HDD, cuando estaba en formato anti-hTfR scFv:hGAA; o suministra proteína GAA humana madura al cuádriceps u otro tejido muscular de seres humanos a los que se administra dicha molécula scFv:hGAA;
- Muestra una relación de aproximadamente 0,94, 0,49, 0,61 o 1,90 (aproximadamente 0,1-1,2) de proteína hGAA madura en el parénquima cerebral (normalizada a la del control positivo 8D3:GAA scFv) en ratones (*p. ej.*, ratones $Tfrc^{hum/hum}$ sustitutos) a los que se administró la molécula a través del depósito hepático de AAV8, cuando estaba en formato anti-hTfR scFv:hGAA; o suministra proteína GAA humana madura en el parénquima cerebral de seres humanos a los que se administra dicha molécula scFv:hGAA a través de virus, *p. ej.*, AAV, depósito hepático

o administrado por vía parenteral en formato de fusión de proteína scFv:hGAA;

- Suministra proteína hGAA madura al suero, hígado, cerebro, cerebelo, médula espinal, corazón y/o cuádriceps en ratones (*p. ej.*, ratones $Tfrc^{hum/hum}$ sustitutos) a los que se administró la molécula a través del depósito hepático de AAV8, cuando estaba en formato anti-hTfR scFv:hGAA; o suministra proteína GAA humana madura al suero, hígado, cerebro, cerebelo, médula espinal, corazón y/o cuádriceps de seres humanos a los que se administra dicha molécula scFv:hGAA a través de virus, *p. ej.*, AAV, depósito hepático o administrado por vía parenteral en formato de fusión de proteína scFv:hGAA;
- Reduce el glucógeno almacenado en el cerebro, cerebelo, médula espinal, corazón y/o cuádriceps en ratones (*p. ej.*, ratones $Tfrc^{hum/hum}$ sustitutos) a los que se administró la molécula a través del depósito hepático de AAV8, cuando estaba en formato anti-hTfR scFv:hGAA; *p. ej.*, en al menos 75 % o mayor al 95 % o mayor al 99 %; o reduce el glucógeno almacenado en el cerebro, cerebelo, médula espinal, corazón y/o

cuádriceps de seres humanos a los que se administra dicha molécula scFv:hGAA a través de virus, *p. ej.*, AAV, depósito hepático o administrado por vía parenteral en formato de fusión de proteína scFv:hGAA;

- Reduce los niveles de glucógeno en los tejidos (*p. ej.*, cerebelo) de ratones *Gaa*$^{-/-}$ / *Tfrc*^{hum} tratados con depósito de hígado AAV8 anti-hTFRC scfv:hGAA (*p. ej.*, AAV8 4e11vg/kg) en al menos 90 % (*p. ej.*, aproximadamente 95 % o más) en relación con los ratones *Gaa*$^{-/-}$ / *Tfrc*^{hum} no tratados;
- Reduce los niveles de glucógeno en los tejidos (*p. ej.*, cuádriceps) de ratones *Gaa*$^{-/-}$ / *Tfrc*^{hum} tratados con depósito de hígado de AAV8 anti-hTFRC scfv:hGAA (*p. ej.*, AAV8 4e11vg/kg) en al menos 89 % (*p. ej.*, aproximadamente 90 % o 91 % o más) en relación con los ratones *Gaa*$^{-/-}$ / *Tfrc*^{hum} no tratados; o de seres humanos tratados con la fusión, *p. ej.*, por administración parenteral de la proteína de fusión;
- No causa homeostasis anormal del hierro cuando se administra (*p. ej.*, por depósito hepático episomal HDD o AAV8) a ratones *Tfrc*^{hum}; *p. ej.*, en donde los ratones

mantienen niveles normales de hierro en suero, corazón, hígado y/o bazo, capacidad total de fijación de hierro (TIBC, por sus siglas en inglés) normal y/o niveles normales de hepcidina); o cuando se administra a seres humanos, *p. ej.*, por administración parenteral de la proteína de fusión;

- Cuando se inserta cromosómicamente (*p. ej.*, en el locus del gen de la albúmina) o se administra episomalmente a un sujeto (*p. ej.*, a un ser humano o ratón *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*$^{hum/hum}$), por ejemplo, en un vector AAV8, el ADN que codifica la fusión provoca la expresión de GAA humana madura en suero, hígado, cerebro y/o cuádriceps; y/o
- Cuando se inserta cromosómicamente (*p. ej.*, en el locus del gen de la albúmina) o se administra episomalmente (*p. ej.*, a un humano o ratón *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*$^{hum/hum}$), por ejemplo, en un vector AAV8, el ADN que codifica la fusión reduce los niveles de glucógeno en el cerebro y/o cuádriceps.

* *Tfrc*^{hum} o *Tfrc*$^{hum/hum}$ son ratones knock-in homocigotos.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios en las proteínas de unión al antígeno del receptor de transferrina antihumano de las fusiones descritas en la

presente descripción se sintetizan a continuación en la Tabla 29. Por ejemplo, los anticuerpos antirreceptor 1 de transferrina humana y los fragmentos de unión al antígeno de estos (p. ej., scFvs y Fabs) que comprenden el HCVR y LCVR de las moléculas de la Tabla 29; o que comprenden las CDR de estos, fusionadas con GAA, se describen en la presente descripción.

Como se ha discutido, una proteína de fusión anti-hTfR:GAA scFv (p. ej., 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; o 69263) comprende un péptido señal opcional, conectado a un scFv (p. ej., que incluye una V_L y una V_H conectado opcionalmente por un conector), conectado a un conector opcional, conectado a una GAA. Por ejemplo, el péptido señal opcional puede ser el péptido señal de *Mus musculus* Ror1 (p. ej., que consiste en los aminoácidos MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 673).

En una proteína terapéutica multidominio particular, el dominio de suministro de unión al TfR es un scFv anti-TfR. Por ejemplo, el scFv puede incluir una V_L y una V_H opcionalmente conectado por un conector.

En un ejemplo, el scFv anti-hTfR puede comprender: (i) una región variable de cadena pesada que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende

la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 o 527; y/o (ii) una región variable de cadena liviana que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 o 532.

En otro ejemplo, el scFv anti-TfR puede comprender: (1) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (2) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (3) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante

de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (4) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (5) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (6) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (7) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (8) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (9) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (10) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (11) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (12) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y

HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (13) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (14) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (15) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (16) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante

de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (17) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (18) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (19) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (20) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (21) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta); (22) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (23) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (24) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (25) una HCVR que comprende la

HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (26) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (27) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (28) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (29) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497

(o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (30) una HCVR que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (31) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); o (32) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta). Una variante se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70-99,9 % (p. ej., 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 %) idéntica

o similar a una secuencia de aminoácidos referenciada que se expone en la presente descripción.

En otro ejemplo, el scFv anti-TfR puede comprender: (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 218 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 219 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 220 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 223 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 224 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 225 (o una variante de esta); (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 228 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 229 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 230 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 233 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 234 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 235 (o una variante de esta); (c) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 238 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 239 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 240 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 243 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 244 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 245 (o una variante de esta); (d) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 248 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 249 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 250 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 253 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 254 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 255 (o una variante de esta); (e) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 258 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 259 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 260 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 263 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 264 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 265 (o una variante de esta); (f) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 268 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 269 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 270 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 273 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 274 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 275 (o una variante de esta); (g) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 278 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 279 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 280 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 283 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 284 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 285 (o una variante de esta); (h) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 288 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 289 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 290 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 293 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 294 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 295 (o una variante de esta); (i) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 298 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 299 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 300 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 303 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 304 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 305 (o una variante de esta); (j) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 308 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 309 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 310 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 313 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 314 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 315 (o una variante de esta); (k) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 318 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 319 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 320 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 323 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 324 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 325 (o una variante de esta); (l) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 328 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 329 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 330 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 333 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 334 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 335 (o una variante de esta); (m) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 338 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 339 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 340 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 343 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 344

(o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 345 (o una variante de esta); (n) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 348 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 349 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 350 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 353 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 354 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 355 (o una variante de esta); (o) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 358 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 359 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 360 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 363 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 364 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 365 (o una variante de esta); (p) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 368 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 369 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 370 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 373 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 374 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 375 (o una variante de esta); (q) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 378 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 379 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 380 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 383 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 384 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 385 (o una variante de esta); (r) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 388 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 389 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 390 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 393 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 394 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 395 (o una variante de esta); (s) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 398 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 399 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 400 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 403 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 404 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 405 (o una variante de esta); (t) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 408 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 409 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 410 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 413 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 414 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 415 (o una variante de esta); (u) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 418 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 419 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 420 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 423 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 424 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 425 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 428 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 429 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 430 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 433 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 434 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 435 (o una variante de esta); (w) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 448 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 449 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 450 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 453 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 454 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 455 (o una variante de esta); (y) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta); (z) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 468 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 469 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 470 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 473 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 474

(o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 475 (o una variante de esta); (aa) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 478 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 479 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 480 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 483 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 484 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 485 (o una variante de esta); (ab) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 488 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 489 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 490 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 493 (o

una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 494 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 495 (o una variante de esta); (ac) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 498 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 499 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 500 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 503 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 504 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 505 (o una variante de esta); (ad) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 508 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 509 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 510 (o una variante de esta); y una LCVR que

comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 513 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 514 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 515 (o una variante de esta); (ae) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 518 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 519 (o una variante de esta), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 520 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 523 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 524 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 525 (o una variante de esta); y/o (af) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 528 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 529 (o una variante del mismo), y una HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 530 (o una variante del mismo); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 533 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 534 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 535 (o una variante de esta). Una variante se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70-99,9 % (p. ej., 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 %) idéntica o similar a una secuencia de aminoácidos referenciada que se expone en la presente descripción.

En otro ejemplo, el scFv anti-TfR puede comprender: (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta); (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta); (iii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de

ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta); (iv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta); (v) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta); (vi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta); (vii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta); (viii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta); (ix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR

que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta); (x) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta); (xi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta); (xii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta); (xiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta); (xiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta); (xv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta

en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta); (xvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta); (xvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta); (xviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta); (xix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta); (xx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta); (xxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante

de esta); (xxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta); (xxiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); (xxiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta); (xxv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta); (xxvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta); (xxvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta); (xxviii) una HCVR que comprende

la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta); (xxix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta); (xxx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta); (xxxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); y/o (xxxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta), opcionalmente en donde la HCVR y la LCVR se unen por un conector (p. ej., que comprende una secuencia de aminoácidos, p. ej., aproximadamente 10 aminoácidos ácidos en longitud, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8 o 10 repeticiones de Gly_4Ser (sec. con núm. de ident.: 600). Una variante se

refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70-99,9 % (p. ej., 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 %) idéntica o similar a una secuencia de aminoácidos referenciada que se expone en la presente descripción.

Los ejemplos de polinucleótidos que codifican scFv anti-TfR se proporcionan en la Tabla 29 e incluyen: (1) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 216, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 221; (2) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 231; (3) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 236, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 241; (4) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 246, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 251; (5) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm.

de ident.: 256, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 261; (6) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 266, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 271; (7) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 276, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 281; (8) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 286, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 291; (9) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 296, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 301; (10) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 306, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 311; (11) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 316, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 321;

(12) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 326, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 331; (13) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 336, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 341; (14) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 346, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 351; (15) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 356, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 361; (16) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 366, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 371; (17) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 376, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 381; (18) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm.

de ident.: 386, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 391; (19) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 396, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 401; (20) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 406, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 411; (21) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 416, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 421; (22) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 426, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 431; (23) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 436, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 441; (24) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 446, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 451;

(25) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 456, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 461; (26) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 466, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 471; (27) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 476, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 481; (28) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 486, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 491; (29) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 496, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 501; (30) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 506, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 511; (31) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm.

de ident.: 516, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 521; o (32) un polinucleótido que codifica una HCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 526, y una LCVR que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 531, en donde la HCVR y LCVR están en cualquier orden.

En una modalidad, un scFv anti-hTfR, en formato V_L-$(Gly_4Ser)_3$-V_H (Gly_4Ser = sec. con núm. de ident.: 600), comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569. También se contemplan dichas fusiones que están en el formato V_H-$(Gly_4Ser)_3$-V_L (Gly_4Ser = sec. con núm. de ident.: 600).

En otro ejemplo, el dominio de suministro de unión al TfR puede ser un fragmento Fab (p. ej., que se une específicamente al receptor de la transferrina humana). Los fragmentos Fab normalmente contienen una cadena liviana completa, VL y un dominio liviano constante, p. ej., kappa (p. ej., RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 601)) y la V_H y la porción CH1 IgG1 (p. ej., ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (sec. con núm. de ident.: 602)) o CH1 IgG4 (p. ej.,

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPLLQGSG (sec. con núm. de ident.: 674)) de una cadena pesada. Los anticuerpos del fragmento Fab se pueden generar mediante digestión con papaína de anticuerpos IgG completos para eliminar el fragmento Fc completo, incluida la región bisagra. En un ejemplo, la proteína Fab puede comprender: (1) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (2) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (3) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal

HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (4) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (5) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (6) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272, o la LCDR1, LCDR2 y

LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (7) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (8) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (9) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (10) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307, o una región

variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (11) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (12) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (13) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (14) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (15) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (16) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (17) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (18) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (19) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (20) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de

cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (21) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (22) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (23) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 437, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 442, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (24) una

región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (25) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (26) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (27) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1,

HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (28) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 487, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (29) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (30) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512, o

la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; (31) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL; y/o (32) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527, o una región variable de cadena pesada que incluye HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de tal HCVR, unida al dominio CH1, y una región variable de cadena liviana (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532, o la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de tal LCVR unida al dominio CL. Por ejemplo, el CH1 puede ser sec. con núm. de ident.: 602 o 674.

En un ejemplo, la proteína Fab puede comprender: (1) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 603 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 604 (31874B); (2) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 605 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 606 (31863B); (3) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 607 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 608 (69348); (4) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 609 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 610 (69340); (5) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 611 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 612 (69331); (6) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 613 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 614 (69332); (7) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 615 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 616 (69326); (8) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 617 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 618 (69329); (9) una cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 619 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 620 (69323); (10) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 621 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 622 (69305); (11) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 623 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 624 (69307); (12) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 625 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 626 (12795B); (13) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 627 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 628 o la sec. con núm. de ident.: 667 (12798B); (14) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 629 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 630 o la sec. con núm. de ident.: 668 (12799B); (15) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 631 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 632 (12801B); (16) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 633 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 634 (12802B); (17) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 635 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 636 (12808B); (18) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 637 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 638 (12812B); (19) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 639 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 640 (12816B); (20) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 641 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 642 (12833B); (21) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 643 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 644 (12834B); (22)

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 645 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 646 (12835B); (23) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 647 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 648 o la sec. con núm. de ident.: 669 (12847B); (24) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 649 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 650 (12848B); (25) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 651 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 652 o la sec. con núm. de ident.: 670 (12843B); (26) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 653 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 654 (12844B); (27) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 655 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 656 o la sec. con núm. de ident.: 671 (12845B); (28) una cadena liviana que

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 657 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 658 o la sec. con núm. de ident.: 672 (12839B); (29) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 659 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 660 (12841B); (30) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 661 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 662 (12850B); (31) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 663 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 664 (69261); o (32) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 665 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 666 (69263).

"31874B"; "31863B"; "69348"; "69340"; "69331"; "69332"; "69326"; "69329"; "69323"; "69305"; "69307"; "12795B"; "12798B"; "12799B"; "12801B"; "12802B"; "12808B"; "12812B"; "12816B"; "12833B"; "12834B"; "12835B"; "12847B"; "12848B"; "12843B"; "12844B"; "12845B"; "12839B"; "12841B"; "12850B";

"69261"; y "69263" se refieren a proteínas de fusión anti-TfR:GAA, *p. ej.*, anti-TfR scFv:GAA o anti-TfR Fab:GAA, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 o 532 (o una variante de estas), y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 o 527 (o una variante de estas); que, en el caso de un scFv, se pueden fusionar (en cualquier orden), p. ej., mediante un conector peptídico (*p. ej.*, $(G_4S)_3$) (G_4S = sec. con núm. de ident.: 600), respectivamente; o que comprenden una V_H que comprende las CDR de esta (CDR-H1 (o una variante de esta), CDR-H2 (o una variante de esta) y CDR-H3 (o una variante de esta)) y/o una V_L que comprende las CDR de esta (CDR-L1 (o una variante de esta), CDR-L2 (o una variante de esta) y CDR-L3 (o una variante de esta)), en donde la V_H fusionada a la V_L o la V_L fusionada a la V_H, en el caso de un scFv, se puede fusionar, p. ej., mediante un conector peptídico (*p. ej.*, $(G_4S)_2$) (G_4S = sec. con núm. de ident.: 600), a la GAA.

Las secuencias que codifican el dominio de suministro de unión al TfR en los constructos descritos en

la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones, tales como optimización de codones (p. ej., codones humanos), eliminación de dinucleótidos CpG, mutación de sitios de empalme crípticos, adición de uno o más sitios de glicosilación, o cualquier combinación de estos. Los dinucleótidos CpG en un constructo pueden limitar la utilidad terapéutica del constructo. En primer lugar, los dinucleótidos CpG no metilados pueden interactuar con el receptor 9 tipo toll del huésped (TLR-9) para estimular respuestas inmunitarias proinflamatorias innatas. En segundo lugar, una vez que los dinucleótidos CpG se metilan, pueden provocar la supresión de la expresión transgénica coordinada por proteínas de unión a metil-CpG. Los sitios de empalme crípticos son secuencias en un ARN premensajero que normalmente no se usan como sitios de empalme, pero que pueden activarse, por ejemplo, mediante mutaciones que inactivan los sitios de empalme canónicos o crean sitios de empalme donde antes no existían. La selección precisa del sitio de empalme es fundamental para una expresión génica exitosa, y la eliminación de los sitios de empalme crípticos puede favorecer el uso del sitio de empalme normal o previsto.

En un ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de

unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece completamente de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción está optimizado por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En un ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CDTfR63 en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, sin CpG) y tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados y tiene uno o más o todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de

suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR en un constructo descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece completamente de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero).

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-TfR. En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una

cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 538-569.

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-TfR. En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al

menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-599. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm.

de ident.: 540, 549, 551 y 554 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la

secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551, y 554.

Se proporcionan varias secuencias codificantes de scFv anti-TfR. En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595 y 599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595 y 599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595 y 599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595 y 599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595 y 599. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de

las sec. con núm. de ident.: 593-595 y 599. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en

la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554.

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-TfR con codones optimizados. La secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede ser, por ejemplo, carente de CpG (por ejemplo, completamente carente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de

scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-595. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv

anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551 y 554 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551, y 554. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 540, 549, 551, y 554.

Se proporcionan varias secuencias codificantes de scFv anti-TfR optimizados por codones. La secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede ser, por ejemplo, carente de CpG (por ejemplo, completamente carente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el

94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 593-595. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %,

al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554.

En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti- TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o

comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR scFv que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia

codificante del scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una

proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554.

En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que

comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo,

la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 594. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 594 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 594. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 594. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 594. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR

codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos

anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o

100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 595. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 595 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 595 y codifica una proteína scFv

anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 595. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 595. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 595. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de

unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 554 (y, por ejemplo, conserva la actividad de unión a TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554. Opcionalmente, la secuencia codificante del scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 554.

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-TfR con codones optimizados. La secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede ser, por ejemplo, carente de CpG (por ejemplo, completamente carente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos

el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 590-592. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 590-592. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 590-592. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 590-592. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 590-592. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 590-592. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la

secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con

núm. de ident.: 590. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica una proteína anti-TfR scFv (o una proteína anti-TfR scFv que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o

100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica una proteína anti-TfR scFv que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 590. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 590 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende el conjunto de secuencias adelante en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590. En otro ejemplo, la secuencia

codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 590. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en

los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551.

En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al

menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591 y codifica una proteína anti-TfR scFv que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o

100 % a sec. con núm. de ident.: 591 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 591 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende el conjunto de secuencias adelante en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 591. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 591. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 591. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o

100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551.

En un ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592 y codifica

una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592 y codifica una proteína anti-TfR scFv que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 592. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 592 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende el conjunto de secuencias adelante en la sec. con núm. de ident.: 551. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 592. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR

consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 592. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 592. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551 (y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 551

(y, p. ej., retiene la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551. Opcionalmente, la secuencia codificante de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 551.

Se proporcionan varias secuencias de codificación de scFv anti-TfR con codones optimizados. La secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede ser, por ejemplo, carente de CpG (por ejemplo, completamente carente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %,

al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 587-589. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos 99 %, al menos el 99,5 % o

el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %,

al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al

menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587 y codifica una proteína anti-TfR scFv que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 587. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 587 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 587 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende el conjunto de secuencias adelante en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 587. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 587. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 587. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p.

ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende

la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540.

En un ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al

menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588 y codifica una proteína anti-TfR scFv que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 588. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 588 y codifica una proteína

scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 588 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende el conjunto de secuencias adelante en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 588. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 588. En otro ejemplo, la secuencia codificante de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 588. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la

sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540.

En un ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al

menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-

TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589 y codifica una proteína anti-TfR scFv que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia codificante del scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % a sec. con núm. de ident.: 589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589 y codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 589 y codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta

en la sec. con núm. de ident.: 540. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 589. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 589. La secuencia de codificación anti-TfR puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p.

ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR (o una proteína scFv anti-TfR que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 540 (y, p. ej., conservando la actividad de unión al TfR). Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540. Opcionalmente, la secuencia de codificación de scFv anti-TfR en los ejemplos anteriores codifica una proteína scFv anti-TfR que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 540.

Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o scFv anti-TfR específico, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o un scFv anti-TfR descritos en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-

TCGGTCCAG-3’). De la misma manera, cuando los elementos del constructo se describen en la presente descripción en un orden específico de 5’ a 3’, también pretenden comprender el complemento inverso del orden de esos elementos. Una razón para esto es que, en muchas modalidades descritas en la presente descripción, los constructos de ácido nucleico de proteínas terapéuticas multidominio o el scFv anti-TfR son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

(2) Constructos bidireccionales

Los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden ser constructos bidireccionales. Tales constructos bidireccionales pueden permitir una inserción y expresión mejoradas del polipéptido de interés codificado. Cuando se usa en combinación con un agente de nucleasa (p. ej., sistema CRISPR/Cas, sistema de nucleasa con dedos de zinc (ZFN); sistema de nucleasa

efectora de tipo activador de transcripción (TALEN)) como se describe en la presente descripción, la bidireccionalidad del constructo de ácido nucleico permite que el constructo se inserte en cualquier dirección (es decir, no se limita a la inserción en una dirección) dentro de un locus genómico diana o un sitio de escisión o sitio de inserción diana, lo que permite la expresión del polipéptido de interés cuando se inserta en cualquier orientación, mejorando de esta manera la eficacia de la expresión.

Un constructo bidireccional como se describe en la presente descripción puede comprender al menos dos segmentos de ácido nucleico, en donde un primer segmento comprende una primera secuencia de codificación para el polipéptido de interés, y un segundo segmento comprende el complemento inverso de una segunda secuencia de codificación para el polipéptido de interés, o viceversa. Sin embargo, otros constructos bidireccionales descritas en la presente descripción pueden comprender al menos dos segmentos de ácido nucleico, en donde el primer segmento comprende una secuencia de codificación de un polipéptido de interés y el segundo segmento comprende el complemento inverso de una secuencia de codificación de otra proteína, o viceversa. Un complemento inverso se refiere a una secuencia que es una secuencia complementaria de una secuencia de referencia, en donde la secuencia complementaria se escribe en la orientación inversa. Por ejemplo, para una secuencia hipotética 5’-

CTGGACCGA-3’, la secuencia del complemento perfecto es 3’-GACCTGGCT-5’, y el complemento inverso perfecto se escribe 5’-TCGGTCCAG-3’. Una secuencia complementaria inversa no necesita ser perfecta y aún puede codificar el mismo polipéptido o un polipéptido similar al de la secuencia de referencia. Debido a la redundancia en el uso de codones, un complemento inverso puede separarse de una secuencia de referencia que codifica el mismo polipéptido. Las secuencias de codificación pueden comprender opcionalmente una o más secuencias adicionales, como secuencias que codifican secuencias de aminoácidos amino o carboxiterminales, tal como una secuencia señal, una secuencia de etiqueta (p. ej., HiBit) o una secuencia funcional heteróloga (p. ej., secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) o péptido autoescindible) unido al polipéptido de interés u otra proteína.

Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructo bidireccionales específicas, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si un constructo bidireccional descrita en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5’-CTGGACCGA-3’, también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5’-TCGGTCCAG-3’). De la misma manera, cuando los elementos del constructo bidireccionales se describen en la presente descripción en un orden específico de 5’ a 3’, también

pretenden abarcar el complemento inverso del orden de esos elementos. Por ejemplo, si se describe en la presente descripción un constructo bidireccional que comprende de 5' a 3' un primer aceptor de empalme, una primera secuencia de codificación, un primer terminador, un complemento inverso de un segundo terminador, un complemento inverso de una segunda secuencia de codificación y un complemento inverso de un segundo aceptor de empalme, también pretende abarcar un constructo que comprende de 5' a 3' el segundo aceptor de empalme, la segunda secuencia de codificación, el segundo terminador, un complemento inverso del primer terminador, un complemento inverso de la primera secuencia de codificación y un complemento inverso del primer aceptor de empalme. Una razón para esto es que, en muchas modalidades descritas en la presente descripción, los constructos bidireccionales son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Cuando los al menos dos segmentos codifican ambos un polipéptido de interés, los al menos dos segmentos pueden codificar el mismo polipéptido de interés o diferentes polipéptidos de interés. Los diferentes polipéptidos de interés pueden ser al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 % o al menos aproximadamente el 99,5 % idénticos. Por ejemplo, el primer segmento puede codificar un polipéptido de interés de tipo salvaje o un fragmento de este, y el segundo segmento puede codificar una variante del polipéptido de interés o un fragmento de este, o viceversa. Alternativamente, el primer segmento puede codificar una primera variante del polipéptido de interés, y el segundo segmento puede codificar una segunda variante del polipéptido de interés que es diferente de la primera variante del polipéptido de interés. Preferentemente, los dos segmentos codifican el mismo polipéptido de interés (es decir, 100 % idénticos).

Incluso cuando los dos segmentos codifican el mismo polipéptido de interés, la secuencia de codificación del polipéptido de interés en el primer segmento puede diferir de la secuencia de codificación del polipéptido de interés en el segundo segmento. En algunos constructos bidireccionales, el uso de codones en la primera secuencia codificante es el mismo que el uso de codones en la segunda

secuencia codificante. En otros constructos bidireccionales, la segunda secuencia de codificación adopta un uso de codones diferente del uso de codones de la primera secuencia de codificación para reducir la formación de horquillas. Una o ambas secuencias de codificación pueden optimizarse por codones para la expresión en una célula huésped. En algunos constructos bidireccionales, solo una de las secuencias de codificación está optimizada por codones. En algunos constructos bidireccionales, la primera secuencia de codificación está optimizada por codones. En algunos constructos bidireccionales, la segunda secuencia de codificación está optimizada por codones. En algunos constructos bidireccionales, ambas secuencias de codificación tienen codones optimizados. Por ejemplo, la secuencia de codificación del segundo polipéptido de interés puede tener codones optimizados o puede usar uno o más codones alternativos para uno o más aminoácidos del mismo polipéptido de interés (es decir, la misma secuencia de aminoácidos) codificados por la secuencia de codificación del polipéptido de interés en el primer segmento. Un codón alternativo como se usa en la presente descripción se refiere a variaciones en el uso de codones para un aminoácido dado, y puede o no ser un codón preferido u optimizado (codón optimizado) para un sistema de expresión

dado. Se conocen los usos de codones preferidos, o los codones que se toleran bien en un sistema de expresión dado.

En un ejemplo, el segundo segmento comprende un complemento inverso de una secuencia de codificación del polipéptido de interés que adopta un uso de codones diferente al de la secuencia de codificación del polipéptido de interés en el primer segmento para reducir la formación de horquilla. Tal complemento inverso forma pares de bases con menos de todos los nucleótidos de la secuencia codificante en el primer segmento, aunque opcionalmente codifica el mismo polipéptido. En un ejemplo, la secuencia del complemento inverso en el segundo segmento no es sustancialmente complementaria (p. ej., no más del 70 % complementaria) a la secuencia de codificación en el primer segmento. En otros casos, sin embargo, el segundo segmento comprende una secuencia complementaria inversa que es altamente complementaria (p. ej., al menos 90 % complementaria) a la secuencia de codificación en el primer segmento.

El segundo segmento puede tener cualquier porcentaje de complementariedad con el primer segmento. Por ejemplo, la secuencia del segundo segmento puede tener al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %,

al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % de complementariedad con el primer segmento. Como otro ejemplo, la secuencia del segundo segmento puede tener menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 35 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 45 %, menos de aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente 55 %, menos de aproximadamente 60 % %, menos de aproximadamente 65 %, menos de aproximadamente 70 %, menos de aproximadamente 75 %, menos de aproximadamente 80 %, menos de aproximadamente 85 %, menos de aproximadamente 90 %, menos de aproximadamente 95 %, menos de aproximadamente 97 % o menos de aproximadamente 99 % de complementariedad con el primer segmento. El complemento inverso de la segunda secuencia de codificación puede ser, en algunos constructos de ácido nucleico, no sustancialmente complementario (p. ej., no más del 70 % complementario) a la primera secuencia de codificación, no sustancialmente complementario a un fragmento de la primera secuencia de codificación, altamente complementario (p. ej., al menos 90 % complementario) a la primera secuencia de codificación, altamente complementario a un fragmento de la primera secuencia de codificación, aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % idéntico al complemento inverso

de la primera secuencia de codificación, o aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 % idéntico al complemento inverso de la primera secuencia de codificación.

Los constructos bidireccionales descritos en la presente descripción pueden modificarse para incluir cualquier característica estructural adecuada según sea necesario para cualquier uso particular y/o que confiera una o más funciones deseadas. Por ejemplo, los constructos de ácidos nucleicos bidireccionales descritas en la presente descripción no necesitan comprender un brazo de homología y/o pueden ser, por ejemplo, constructos donantes independientes de la homología. Debido en parte a la función bidireccional de los constructos de ácido nucleico, los constructos bidireccionales se pueden insertar en un locus genómico en cualquier dirección como se describe en la presente descripción para permitir la inserción y/o expresión eficiente del polipéptido de interés.

En algunos casos, el constructo de ácido nucleico bidireccional no comprende un promotor que estimula la expresión del polipéptido de interés. Por ejemplo, la expresión del polipéptido de interés puede ser estimulada por un promotor de la célula huésped (p. ej., el promotor endógeno de la *ALB* cuando el transgén se integra en un locus *ALB* de la célula huésped). En otros casos, el constructo de ácido nucleico bidireccional puede comprender uno o más promotores unidos operativamente a

las secuencias de codificación del polipéptido de interés. Es decir, aunque no se requiere para la expresión, los constructos descritos en la presente descripción también pueden incluir secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada internos al ribosoma, secuencias adicionales que codifican péptidos y/o señales de poliadenilación. Algunos constructos bidireccionales pueden comprender un promotor que dirige la expresión de la secuencia de codificación del primer polipéptido de interés y/o el complemento inverso de un promotor que dirige la expresión del complemento inverso de la secuencia de codificación del segundo polipéptido de interés.

Los constructos bidireccionales descritos en la presente descripción se pueden modificar para incluir o excluir cualquier característica estructural adecuada según sea necesario para cualquier uso particular y/o que confiera una o más funciones deseadas. Por ejemplo, algunos constructos de ácido nucleico bidireccional descritas en la presente descripción no comprenden un brazo de homología. Debido en parte a la función bidireccional del constructo de ácido nucleico, el constructo bidireccional se puede insertar en un locus genómico en cualquier dirección (orientación) como se describe en la presente descripción para permitir la inserción y/o expresión eficiente de un polipéptido de interés.

Los constructos bidireccionales pueden, en algunos casos, comprender una o más (p. ej., dos) secuencias de cola de poliadenilación o secuencias señal de poliadenilación. En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento puede comprender una secuencia señal de poliadenilación. En algunos constructos bidireccionales, el segundo segmento puede comprender una secuencia señal de poliadenilación. En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento puede comprender una primera secuencia señal de poliadenilación y el segundo segmento puede comprender una segunda secuencia señal de poliadenilación (p. ej., un complemento inverso de una secuencia señal de poliadenilación). En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento puede comprender una primera secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3’ de la primera secuencia de codificación. En algunos constructos bidireccionales, el segundo segmento puede comprender un complemento inverso de una segunda secuencia señal de poliadenilación ubicada en 5’ del complemento inverso de la segunda secuencia de codificación. En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento puede comprender una primera secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3’ de la primera secuencia de codificación, y el segundo segmento puede comprender un complemento inverso de una segunda secuencia señal de poliadenilación ubicada en 5’ del complemento inverso de la segunda secuencia de codificación. Las secuencias señal de

poliadenilación primera y segunda pueden ser iguales o diferentes. En un ejemplo, las señales de poliadenilación primera y segunda son diferentes. En un ejemplo específico, la primera señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación tardía del virus del simio 40 (SV40) (o una variante de este), y la segunda señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH) (o una variante de esta), o viceversa. Por ejemplo, una señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40 y la otra señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de BGH. En un ejemplo específico, una señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 161, y la otra señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 162.

En algunos constructos bidireccionales, tanto el primer segmento como el segundo segmento comprenden una secuencia de cola de poliadenilación. Se conocen métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada. Por ejemplo, en algunos constructos bidireccionales, uno o ambos del primer y segundo segmento comprenden una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de poliadenilación corriente abajo de un marco de lectura abierto (es decir, una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de

poliadenilación 3’ de una secuencia de codificación, o un complemento inverso de una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de poliadenilación 5’ de un complemento inverso de una secuencia de codificación). La secuencia de cola de poliadenilación se puede codificar, por ejemplo, como un tramo “poli-A” corriente abajo de la secuencia de codificación del polipéptido de interés (u otra secuencia de codificación de la proteína) en el primer y/o segundo segmento. Una cola poli-A puede comprender, por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas y, opcionalmente, hasta 300 adeninas. En un ejemplo específico, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. Los métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada y/o una secuencia señal de poliadenilación son bien conocidos. Por ejemplo, la secuencia señal de poliadenilación AAUAAA se usa comúnmente en sistemas de mamíferos, aunque se han identificado variantes como UAUAAA o AU/GUAAA. *Ver, p. ej.*, Proudfoot (2011) *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. En algunos constructos bidireccionales, se puede usar un solo terminador bidireccional para terminar la transcripción de la ARN polimerasa en la dirección sentido o antisentido (es decir, para terminar la transcripción de la ARN polimerasa tanto

del primer como del segundo segmento). Los ejemplos de terminadores bidireccionales incluyen los terminadores ARO4, TRP1, TRP4, ADH1, CYC1, GAL1, GAL7 y GAL10.

Los constructos bidireccionales pueden, en algunos casos, comprender uno o más (p. ej., dos) sitios aceptores de empalme. En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento puede comprender un sitio aceptor de empalme. En algunos constructos bidireccionales, el segundo segmento puede comprender un sitio aceptor de empalme. En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento puede comprender un primer sitio aceptor de empalme y el segundo segmento puede comprender un segundo sitio aceptor de empalme (p. ej., un complemento inverso de un sitio aceptor de empalme). En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento comprende un primer sitio aceptor de empalme ubicado en 5′ de la primera secuencia de codificación. En algunos constructos bidireccionales, el segundo segmento comprende un complemento inverso de un segundo sitio aceptor de empalme ubicado en 3′ del complemento inverso de la segunda secuencia de codificación. En algunos constructos bidireccionales, el primer segmento comprende un primer sitio aceptor de empalme ubicado en 5′ de la primera secuencia de codificación, y el segundo segmento comprende un complemento inverso de un segundo sitio aceptor de empalme ubicado en 3′ del complemento inverso de la segunda secuencia de codificación. El primer y segundo sitio aceptor de empalme pueden ser

iguales o diferentes. En un ejemplo específico, ambos aceptadores de empalme son aceptores de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón. En un ejemplo específico, ambos aceptores de corte y empalme pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 163.

Un constructo bidireccional puede comprender una primera secuencia de codificación que codifica una primera secuencia de codificación unida a un aceptor de empalme y un complemento inverso de una segunda secuencia de codificación operativamente unida al complemento inverso de un aceptor de empalme. Los constructos bidireccionales descritos en la presente descripción también pueden comprender un sitio aceptor de empalme en uno o ambos extremos del constructo, o sitios aceptores de empalme tanto en el primer como en el segundo segmento (p. ej., un sitio aceptor de empalme 5' de una secuencia de codificación, o un complemento inverso de un aceptor de empalme 3' de un complemento inverso de una secuencia de codificación). El sitio aceptor de empalme puede, por ejemplo, comprender NAG o consistir en NAG. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme *ALB* (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *ALB* (es decir, aceptor de empalme del exón 2 de la *ALB*)). Por ejemplo, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *ALB* humana. En otro ejemplo, el aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *Alb* de ratón (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en

el empalme de los exones 1 y 2 de la *Alb* de ratón (es decir, aceptor de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón)). En otro ejemplo, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme de un gen que codifica el polipéptido de interés. Se conocen sitios aceptores de empalme adicionales adecuados y útiles en eucariotas, incluidos aceptores de empalme artificiales. *Ver*, *p. ej.*, Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res*. 15:7155-7174 y Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res*. 29:255-259, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Los aceptadores de empalme usados en un constructo bidireccional pueden ser iguales o diferentes. En un ejemplo específico, ambos aceptadores de empalme son aceptores de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón.

Los constructos bidireccionales pueden ser circulares o lineales. Por ejemplo, un constructo bidireccional puede ser lineal. Los segmentos primero y segundo se pueden unir de manera lineal a través de una secuencia conectora. Por ejemplo, el extremo 5’ del segundo segmento que comprende una secuencia de complemento inverso se puede unir al extremo 3’ del primer segmento. Alternativamente, el extremo 5’ del primer segmento se puede unir al extremo 3’ del segundo segmento que comprende una secuencia de complemento inversa. El conector puede tener cualquier longitud adecuada. Por ejemplo, el enlazador puede tener entre aproximadamente 5 y

aproximadamente 2000 nucleótidos de longitud. Como ejemplo, la secuencia conectora puede tener aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000 o más nucleótidos de longitud. Otros elementos estructurales además de, o en lugar de, una secuencia conectora, también se pueden insertar entre el primer y el segundo segmento.

Los constructos bidireccionales descritos en la presente descripción pueden ser ADN o ARN, monocatenario, bicatenario o parcialmente monocatenario y parcialmente bicatenario. Por ejemplo, los constructos pueden ser ADN monocatenario o bicatenario. En algunas modalidades, el ácido nucleico se puede modificar (p. ej., usando análogos

de nucleósidos), como se describe en la presente descripción. En un ejemplo específico, el constructo bidireccional es monocatenaria (p. ej., ADN monocatenario).

Los constructos bidireccionales descritos en la presente descripción se pueden modificar en uno o ambos extremos para incluir una o más características estructurales adecuadas según sea necesario y/o para conferir uno o más beneficios funcionales. Por ejemplo, las modificaciones estructurales pueden variar según los métodos usados para administrar los constructos descritos en la presente descripción a una célula huésped (p. ej., el uso de la administración de vectores virales o el empaquetamiento en nanopartículas lipídicas para la administración). Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, estructuras terminales tales como repeticiones terminales invertidas (ITR), horquillas, bucles y otras estructuras como toroides. Por ejemplo, los constructos descritos en la presente descripción pueden comprender uno, dos o tres ITR o pueden comprender no más de dos ITR. Se conocen varios métodos de modificaciones estructurales.

De manera similar, uno o ambos extremos del constructo se pueden proteger (p. ej., de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden agregar uno o más residuos didesoxinucleótidos al extremo 3′ de una molécula lineal y/o se pueden ligar oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos

extremos. *Ver, p. ej.,* Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 y Nehls et al. (1996) *Ciencia* 272:886-889, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. Los métodos adicionales para proteger los constructos de la degradación incluyen, pero no se limitan a, la adición de grupos amino terminales y el uso de enlaces internucleotídicos modificados, tales como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metil ribosa o desoxirribosa.

Como se describe con más detalle en la presente descripción, los constructos bidireccionales descritos en la presente descripción se pueden introducir en una célula como parte de un vector que tiene secuencias adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a antibióticos. Los constructos se pueden introducir como un ácido nucleico desnudo, se pueden introducir como un ácido nucleico acomplejado con un agente, tal como un liposoma, un polímero o un poloxámero, o se pueden administrar mediante vectores virales (p. ej., adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus).

En un constructo bidireccional ilustrativa, el segundo segmento está ubicado en 3’ del primer segmento, la secuencia de codificación del primer polipéptido de interés y la secuencia de codificación del segundo

polipéptido de interés codifican el mismo polipéptido humano de interés, la secuencia de codificación del segundo polipéptido de interés adopta un uso de codones diferente del uso de codones de la secuencia de codificación del primer polipéptido de interés, el primer segmento comprende una primera secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3′ de la secuencia de codificación del primer polipéptido de interés, el segundo segmento comprende un complemento inverso de una segunda secuencia señal de poliadenilación ubicada en 5′ del complemento inverso de la secuencia de codificación del segundo polipéptido de interés, el primer segmento comprende un primer sitio aceptor de empalme ubicado en 5′ de la secuencia de codificación del primer polipéptido de interés, el segundo segmento comprende un complemento inverso de un segundo aceptor de empalme de sitio ubicado 3′ del complemento inverso del segundo polipéptido de secuencia de codificación de interés, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión del primer polipéptido de interés o el segundo polipéptido de interés y, opcionalmente, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

(3) Constructos unidireccionales

Los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden ser constructos

unidireccionales. Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructo unidireccionales específicas, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si un constructo unidireccional descrita en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los elementos del constructo unidireccionales se describen en la presente descripción en un orden específico de 5' a 3', también pretenden abarcar el complemento inverso del orden de esos elementos. Una razón para esto es que, en muchas modalidades descritas en la presente descripción, los constructos unidireccionales son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

En los constructos unidireccionales, la secuencia codificante del polipéptido de interés se puede optimizar

por codones para la expresión en una célula huésped. Por ejemplo, la secuencia de codificación se puede optimizar por codones o puede usar uno o más codones alternativos para uno o más aminoácidos del polipéptido de interés (es decir, la misma secuencia de aminoácidos). Un codón alternativo como se usa en la presente descripción se refiere a variaciones en el uso de codones para un aminoácido dado, y puede o no ser un codón preferido u optimizado (codón optimizado) para un sistema de expresión dado. Se conocen los usos de codones preferidos, o los codones que se toleran bien en un sistema de expresión dado.

Los constructos unidireccionales descritos en la presente descripción pueden modificarse para incluir cualquier característica estructural adecuada según sea necesario para cualquier uso particular y/o que confiera una o más funciones deseadas. Por ejemplo, los constructos de ácido nucleico unidireccional descritos en la presente descripción no necesitan comprender un brazo de homología y/o pueden ser, por ejemplo, constructos donantes independientes de la homología.

En algunos casos, el constructo de ácido nucleico unidireccional no comprende un promotor que estimula la expresión del polipéptido de interés. Por ejemplo, la expresión del polipéptido de interés puede ser estimulada por un promotor de la célula huésped (p. ej., el promotor endógeno de la *ALB* cuando el transgén se integra en un

locus *ALB* de la célula huésped). En otros casos, el constructo de ácido nucleico unidireccional puede comprender uno o más promotores unidos operativamente a la secuencia de codificación del polipéptido de interés. Es decir, aunque no se requiere para la expresión, los constructos descritos en la presente descripción también pueden incluir secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada internos al ribosoma, secuencias adicionales que codifican péptidos y/o señales de poliadenilación. Algunos constructos unidireccionales pueden comprender un promotor que dirige la expresión de la secuencia de codificación del polipéptido de interés.

Los constructos unidireccionales pueden, en algunos casos, comprender una o más secuencias de cola de poliadenilación o secuencias señal de poliadenilación. Algunos constructos unidireccionales pueden comprender una secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3’ de la secuencia de codificación del polipéptido de interés. En un ejemplo específico, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación tardía del virus de simio 40 (SV40) (o una variante de este). En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) (o una variante de esta). En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de BGH. Por ejemplo, la señal

de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40 o una señal de poliadenilación de BGH. En un ejemplo específico, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 161. En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 162.

Se conocen métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada. Por ejemplo, algunos constructos unidireccionales comprenden una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de poliadenilación corriente abajo de un marco de lectura abierto (es decir, una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de poliadenilación 3′ de una secuencia de codificación). La secuencia de cola de poliadenilación se puede codificar, por ejemplo, como un tramo "poli-A" corriente abajo de la secuencia de codificación del polipéptido de interés (u otra secuencia de codificación de la proteína) en el primer y/o segundo segmento. Una cola poli-A puede comprender, por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas y, opcionalmente, hasta 300 adeninas. En un ejemplo específico, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. Los métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada y/o una secuencia señal de poliadenilación son bien conocidos. Por

ejemplo, la secuencia señal de poliadenilación AAUAAA se usa comúnmente en sistemas de mamíferos, aunque se han identificado variantes como UAUAAA o AU/GUAAA. *Ver, p. ej.*, Proudfoot (2011) *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Los constructos unidireccionales pueden, en algunos casos, comprender uno o más sitios aceptores de empalme. Algunos constructos unidireccionales comprenden un sitio aceptor de empalme ubicado en 5’ de la secuencia de codificación del polipéptido de interés. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón. En un ejemplo específico, el aceptor de corte y empalme puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 163.

El sitio aceptor de empalme puede, por ejemplo, comprender NAG o consistir en NAG. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme *ALB* (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *ALB* (es decir, aceptor de empalme del exón 2 de la *ALB*)). Por ejemplo, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *ALB* humana. En otro ejemplo, el aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *Alb* de ratón (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *Alb* de ratón (es decir, aceptor de empalme del

exón 2 de la *Alb* de ratón)). En otro ejemplo, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme del gen que codifica el polipéptido de interés. Se conocen sitios aceptores de empalme adicionales adecuados y útiles en eucariotas, incluidos aceptores de empalme artificiales. *Ver, p. ej.*, Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res*. 15:7155-7174 y Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res*. 29:255-259, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Los constructos unidireccionales pueden ser circulares o lineales. Por ejemplo, un constructo unidireccional puede ser lineal.

Los constructos unidireccionales descritos en la presente descripción pueden ser ADN o ARN, monocatenario, bicatenario o parcialmente monocatenario y parcialmente bicatenario. Por ejemplo, los constructos pueden ser ADN monocatenario o bicatenario. En algunas modalidades, el ácido nucleico se puede modificar (p. ej., usando análogos de nucleósidos), como se describe en la presente descripción. En un ejemplo específico, el constructo unidireccional es monocatenaria (p. ej., ADN monocatenario).

Los constructos unidireccionales descritos en la presente descripción se pueden modificar en uno o ambos extremos para incluir una o más características estructurales adecuadas según sea necesario y/o para conferir uno o más beneficios funcionales. Por ejemplo,

las modificaciones estructurales pueden variar según los métodos usados para administrar los constructos descritos en la presente descripción a una célula huésped (p. ej., el uso de la administración de vectores virales o el empaquetamiento en nanopartículas lipídicas para la administración). Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, estructuras terminales tales como repeticiones terminales invertidas (ITR), horquillas, bucles y otras estructuras como toroides. Por ejemplo, los constructos descritos en la presente descripción pueden comprender uno, dos o tres ITR o pueden comprender no más de dos ITR. Se conocen varios métodos de modificaciones estructurales.

De manera similar, uno o ambos extremos del constructo se pueden proteger (p. ej., de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden agregar uno o más residuos didesoxinucleótidos al extremo 3' de una molécula lineal y/o se pueden ligar oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos extremos. *Ver, p. ej.,* Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 y Nehls et al. (1996) *Ciencia* 272:886-889, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. Los métodos adicionales para proteger los constructos de la degradación incluyen, pero no se limitan a, la adición de grupos amino terminales y el uso de enlaces internucleotídicos modificados, tales como, por

ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metil ribosa o desoxirribosa.

Como se describe con más detalle en la presente descripción, los constructos unidireccionales descritos en la presente descripción se pueden introducir en una célula como parte de un vector que tiene secuencias adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a antibióticos. Los constructos se pueden introducir como un ácido nucleico desnudo, se pueden introducir como un ácido nucleico acomplejado con un agente, tal como un liposoma, un polímero o un poloxámero, o se pueden administrar mediante vectores virales (p. ej., adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus).

En un ejemplo de constructo unidireccional, el constructo comprende una secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3’ de la secuencia de codificación del polipéptido de interés, el constructo comprende un sitio aceptor de empalme ubicado en 5’ de la secuencia de codificación del polipéptido de interés, y el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión del polipéptido de interés y, opcionalmente, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

(4) Constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio

Los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritos en la presente descripción pueden ser constructos unidireccionales o constructos bidireccionales. Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructo específicas, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si un constructo descrito en el presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los elementos del constructo se describen en la presente descripción en un orden específico de 5' a 3', también pretenden comprender el complemento inverso del orden de esos elementos. Una razón para esto es que, en muchas modalidades descritas en la presente descripción, los constructos son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno

de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

En los constructos de ácido nucleico, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, la secuencia codificante del dominio de suministro de unión a CD63 y/o la secuencia codificante de la GAA se pueden optimizar por codones para la expresión en una célula huésped. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, la secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 y/o la secuencia de codificación de la GAA se pueden optimizar por codones o pueden usar uno o más codones alternativos para uno o más aminoácidos de la proteína (es decir, misma secuencia de aminoácidos). Un codón alternativo como se usa en la presente descripción se refiere a variaciones en el uso de codones para un aminoácido dado, y puede o no ser un codón preferido u optimizado (codón optimizado) para un sistema de expresión dado. Se conocen los usos de codones preferidos, o los codones que se toleran bien en un sistema de expresión dado.

En los constructos de ácido nucleico, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, la secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR y/o la secuencia de codificación de la GAA se pueden optimizar por codones para la expresión en una célula huésped. Por ejemplo, la secuencia de

codificación de la proteína terapéutica multidominio, la secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR y/o la secuencia de codificación de la GAA se pueden optimizar por codones o pueden usar uno o más codones alternativos para uno o más aminoácidos de la proteína (es decir, misma secuencia de aminoácidos). Un codón alternativo como se usa en la presente descripción se refiere a variaciones en el uso de codones para un aminoácido dado, y puede o no ser un codón preferido u optimizado (codón optimizado) para un sistema de expresión dado. Se conocen los usos de codones preferidos, o los codones que se toleran bien en un sistema de expresión dado.

Los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden modificarse para incluir cualquier característica estructural adecuada según sea necesario para cualquier uso particular y/o que confiera una o más funciones deseadas. Por ejemplo, los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción no necesitan comprender un brazo de homología y/o pueden ser, por ejemplo, constructos donantes independientes de la homología.

En algunos casos, el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio. Por ejemplo, la expresión de la proteína terapéutica multidominio puede ser estimulada por un promotor de la célula huésped (p. ej., el promotor

endógeno de la *ALB* cuando el transgén se integra en un locus *ALB* de la célula huésped). En otros casos, el constructo de ácido nucleico puede comprender uno o más promotores unidos operativamente a la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. Es decir, aunque no se requiere para la expresión, los constructos descritos en la presente descripción también pueden incluir secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada internos al ribosoma, secuencias adicionales que codifican péptidos y/o señales de poliadenilación. Algunos constructos de ácido nucleico pueden comprender un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor específico del hígado. Los ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen promotores TTR, tales como promotores TTR humanos o de ratón. En un ejemplo, el constructo puede comprender un promotor TTR, tal como un promotor TTR de ratón o un promotor TTR humano (p. ej., la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente al promotor TTR). En un ejemplo, el constructo puede comprender un potenciador de SERPINA1, tal como un potenciador de SERPINA1 de ratón o un potenciador de SERPINA1 humano (p. ej., la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente al potenciador de SERPINA1). En un ejemplo, el constructo puede

comprender un promotor TTR y un potenciador de SERPINA1, tal como un potenciador de SERPINA1 humano y un promotor TTR de ratón (p. ej., la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente al potenciador de SERPINA1 y al promotor TTR).

Los constructos de ácido nucleico pueden, en algunos casos, comprender una o más secuencias de cola de poliadenilación o secuencias señal de poliadenilación. Algunos constructos de ácido nucleico pueden comprender una secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3' de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo específico, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación tardía del virus de simio 40 (SV40) (o una variante de este). En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) (o una variante de esta). En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de BGH carece de CpG. Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40 o una señal de poliadenilación de BGH carece de CpG. Por ejemplo, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 712, 169 o 161. En un ejemplo específico, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 712. En un

ejemplo específico, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 169. En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 161. En otro ejemplo específico, la señal de poliadenilación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 162.

Se conocen métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada. Por ejemplo, algunos constructos de ácidos nucleicos comprenden una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de poliadenilación corriente abajo de un marco de lectura abierto (es decir, una secuencia de cola de poliadenilación y/o una secuencia señal de poliadenilación 3′ de una secuencia de codificación). La secuencia de cola de poliadenilación se puede codificar, por ejemplo, como un tramo “poli-A” corriente abajo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio (u otra secuencia de codificación de proteína) en el primer y/o segundo segmento. Una cola poli-A puede comprender, por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas y, opcionalmente, hasta 300 adeninas. En un ejemplo específico, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. Los métodos para diseñar una secuencia de cola de poliadenilación adecuada y/o una secuencia señal de

poliadenilación son bien conocidos. Por ejemplo, la secuencia señal de poliadenilación AAUAAA se usa comúnmente en sistemas de mamíferos, aunque se han identificado variantes como UAUAAA o AU/GUAAA. *Ver, p. ej.*, Proudfoot (2011) *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Los constructos de ácido nucleico pueden, en algunos casos, comprender uno o más sitios aceptores de empalme. Algunos constructos de ácido nucleico comprenden un sitio aceptor de empalme ubicado en 5’ de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme del exón 2 de la *Alb* de ratón. En un ejemplo específico, el aceptor de corte y empalme puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 163.

El sitio aceptor de empalme puede, por ejemplo, comprender NAG o consistir en NAG. En un ejemplo específico, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme *ALB* (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *ALB* (es decir, aceptor de empalme del exón 2 de la *ALB*)). Por ejemplo, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *ALB* humana. En otro ejemplo, el aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *Alb* de ratón (p. ej., un aceptor de empalme *ALB* usado en el empalme de los exones 1 y 2 de la *Alb* de ratón (es decir, aceptor de empalme del

exón 2 de la *Alb* de ratón)). En otro ejemplo, el aceptor de empalme es un aceptor de empalme de la *GAA*. Por ejemplo, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *GAA* humana. Alternativamente, tal aceptor de empalme se puede derivar del gen de la *GAA* de ratón. Se conocen sitios aceptores de empalme adicionales adecuados y útiles en eucariotas, incluidos aceptores de empalme artificiales. *Ver, p. ej.*, Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res*. 15:7155-7174 y Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res*. 29:255-259, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Los constructos de ácido nucleico pueden ser circulares o lineales. Por ejemplo, un constructo de ácido nucleico puede ser lineal. Los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden ser ADN o ARN, monocatenario, bicatenario o parcialmente monocatenario y parcialmente bicatenario. Por ejemplo, los constructos pueden ser ADN monocatenario o bicatenario. En algunas modalidades, el ácido nucleico se puede modificar (p. ej., usando análogos de nucleósidos), como se describe en la presente descripción. En un ejemplo específico, el constructo de ácido nucleico es monocatenaria (p. ej., ADN monocatenario).

Los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción se pueden modificar en uno o ambos extremos para incluir una o más características estructurales adecuadas según sea necesario y/o para conferir uno o más

beneficios funcionales. Por ejemplo, las modificaciones estructurales pueden variar según los métodos usados para administrar los constructos descritos en la presente descripción a una célula huésped (p. ej., el uso de la administración de vectores virales o el empaquetamiento en nanopartículas lipídicas para la administración). Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, estructuras terminales tales como repeticiones terminales invertidas (ITR), horquillas, bucles y otras estructuras como toroides. Por ejemplo, los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden comprender uno, dos o tres ITR o pueden comprender no más de dos ITR. Se conocen varios métodos de modificaciones estructurales.

De manera similar, uno o ambos extremos del constructo de ácido nucleico se pueden proteger (p. ej., de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden agregar uno o más residuos didesoxinucleótidos al extremo 3′ de una molécula lineal y/o se pueden ligar oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos extremos. *Ver, p. ej.,* Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 y Nehls et al. (1996) *Ciencia* 272:886-889, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad para todos los fines. Los métodos adicionales para proteger los constructos de la degradación incluyen, pero no se limitan a, la adición de grupos amino terminales y el uso

de enlaces internucleotídicos modificados, tales como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metil ribosa o desoxirribosa.

Como se describe con más detalle en la presente descripción, los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción se pueden introducir en una célula como parte de un vector que tiene secuencias adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a antibióticos. Los constructos de ácido nucleico se pueden introducir como un ácido nucleico desnudo, se pueden introducir como un ácido nucleico acomplejado con un agente, tal como un liposoma, un polímero o un poloxámero, o se pueden administrar mediante vectores virales (p. ej., adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus).

La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, la secuencia de codificación del dominio de suministro de unión a CD63 y/o la secuencia de codificación de la GAA en los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones, tales como optimización de codones (p. ej., a codones humanos), eliminación de dinucleótidos CpG, mutación de sitios de empalme crípticos, adición de uno o más sitios de glicosilación o cualquier combinación de los mismos. Los dinucleótidos CpG en un constructo pueden limitar la utilidad terapéutica del constructo. En primer lugar, los

dinucleótidos CpG no metilados pueden interactuar con el receptor 9 tipo toll del huésped (TLR-9) para estimular respuestas inmunitarias proinflamatorias innatas. En segundo lugar, una vez que los dinucleótidos CpG se metilan, pueden provocar la supresión de la expresión transgénica coordinada por proteínas de unión a metil-CpG. Los sitios de empalme crípticos son secuencias en un ARN premensajero que normalmente no se usan como sitios de empalme, pero que pueden activarse, por ejemplo, mediante mutaciones que inactivan los sitios de empalme canónicos o crean sitios de empalme donde antes no existían. La selección precisa del sitio de empalme es fundamental para una expresión génica exitosa, y la eliminación de los sitios de empalme crípticos puede favorecer el uso del sitio de empalme normal o previsto.

En un ejemplo, una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En

otro ejemplo, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En un ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de

codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados y tiene uno o más o todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión a CD63 y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece completamente de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero).

La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, la secuencia de codificación del dominio de suministro de unión al TfR y/o la secuencia de

codificación de la GAA en los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden incluir una o más modificaciones, tales como optimización de codones (p. ej., a codones humanos), eliminación de dinucleótidos CpG, mutación de sitios de empalme crípticos, adición de uno o más sitios de glicosilación o cualquier combinación de estos. Los dinucleótidos CpG en un constructo pueden limitar la utilidad terapéutica del constructo. En primer lugar, los dinucleótidos CpG no metilados pueden interactuar con el receptor 9 tipo toll del huésped (TLR-9) para estimular respuestas inmunitarias proinflamatorias innatas. En segundo lugar, una vez que los dinucleótidos CpG se metilan, pueden provocar la supresión de la expresión transgénica coordinada por proteínas de unión a metil-CpG. Los sitios de empalme crípticos son secuencias en un ARN premensajero que normalmente no se usan como sitios de empalme, pero que pueden activarse, por ejemplo, mediante mutaciones que inactivan los sitios de empalme canónicos o crean sitios de empalme donde antes no existían. La selección precisa del sitio de empalme es fundamental para una expresión génica exitosa, y la eliminación de los sitios de empalme crípticos puede favorecer el uso del sitio de empalme normal o previsto.

En un ejemplo, una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de

ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG). En otro ejemplo, una secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados. En otro ejemplo, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero).

En un ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y tiene uno o más sitios de empalme crípticos mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados y tiene uno o más o todos los sitios de empalme crípticos identificados mutados o eliminados. En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de codificación de GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene uno o más dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero). En otro ejemplo específico, una secuencia de codificación de proteína terapéutica multidominio, una secuencia de codificación de dominio de suministro de unión al TfR y/o una secuencia de

codificación de la GAA en un constructo de ácido nucleico descrito en la presente descripción tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados (es decir, carece de CpG) y está optimizada por codones (p. ej., codones optimizados para la expresión en un ser humano o un mamífero).

En un ejemplo de constructo de ácido nucleico, el constructo comprende una secuencia señal de poliadenilación ubicada en 3’ de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, el constructo comprende un sitio aceptor de empalme ubicado en 5’ de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la proteína terapéutica multidominio y, opcionalmente, el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender sec. con núm. de ident.: 193 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo específico,

la proteína terapéutica multidominio puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 193.

Se proporcionan diversas secuencias codificantes de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 194-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica

multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202. En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína

terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los

ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

Se proporcionan diversas secuencias que codifican la proteína terapéutica multidominio optimizada por codones. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 195-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 195-202. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al

menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 195-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 195-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 195-202. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 195-202. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA).

Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %,

al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica

a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo,

la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que

conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la

proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, el

constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, el constructo de ácido

nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el

constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %,

al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica

multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 194. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta

en la sec. con núm. de ident.: 194. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 194. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica

multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %,

al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica

a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 201. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 201 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 201 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 201. En otro ejemplo,

la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 201. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 201. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que

conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200. En otro

ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200 y codifica una proteína terapéutica multidominio

(o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 200. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 200 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 200 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de

proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 200. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 200. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 200. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al

menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %,

al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 198. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 198 y codifica una proteína terapéutica multidominio

que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 198. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 198. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 198. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio

(o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 193 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

En algunos casos, las proteínas de fusión anti-hTfR:GAA scFv en el formato V_L-$(Gly_4Ser)_3$- V_H:GAA (Gly_4Ser =

sec. con núm. de ident.: 600). En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 y 675-702 o puede ser al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 y 675-702. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 y 675-702. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 y 675-702.

En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender la sec. con núm. de ident.: 570 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo específico,

la proteína terapéutica multidominio puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 570.

En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender sec. con núm. de ident.: 571 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 571. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 571. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 571.

En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender la sec. con núm. de ident.: 572 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 572.

En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender sec. con núm. de ident.: 573 o puede ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,5 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir en la sec. con núm. de ident.: 573.

En algunos casos, las proteínas de fusión scFv anti-hTfR:GAA en el formato V_H-$(Gly_4Ser)_3$-V_L:GAA (Gly_4Ser = sec. con núm. de ident.: 600). En un ejemplo específico de un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio, la proteína terapéutica multidominio codificada puede comprender una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 703-706 (opcionalmente sin la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA) o puede ser al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5 % idénticas a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 703-706 (opcionalmente sin la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA). En otro ejemplo

específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir esencialmente en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 703-706 (opcionalmente sin la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA). En otro ejemplo específico, la proteína terapéutica multidominio puede consistir en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 703-706 (opcionalmente sin la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA).

Se proporcionan diversas secuencias codificantes de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia

establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586. Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 (y, p. ej., conservando la actividad de la GAA nativa). Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 (y, p. ej., conservando la actividad de la GAA nativa). Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos

anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 (y, p. ej., conservando la actividad de la GAA nativa). Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573.

Se proporcionan diversas secuencias que codifican la proteína terapéutica multidominio optimizada por codones. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia que

codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-586. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 578-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-586. Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que

comprende una secuencia) al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 (y, p. ej., conservando la actividad de la GAA nativa). Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 (y, p. ej., conservando la actividad de la GAA nativa). Opcionalmente, la secuencia de codificación de la GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573 (y, p. ej., conservando la actividad de la GAA nativa). Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los

ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573. Opcionalmente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 570-573.

Se proporcionan diversas secuencias codificantes de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 577 y 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 577 y 584-586. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 577 y 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica

multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 577 y 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 577 y 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 577 y 584-586. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica

una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

Se proporcionan diversas secuencias que codifican la proteína terapéutica multidominio optimizada por codones. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %,

al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una

secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la

sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584 y codifica una proteína terapéutica

multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 584 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 584. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al

menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 584 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 584 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica

una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los

ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al

menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos

99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 733 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína

terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente,

el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 585. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 585 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 585 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia

codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 585. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 585 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 585 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 585. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 585 y codifica una proteína terapéutica multidominio

(o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 585 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 585. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 585. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 585. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al

menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia

expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:

734 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734 y codifica una proteína terapéutica

multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 734 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 734. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al

menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores

codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 586. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 586 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 586 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o

comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 586. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 586 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 586 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 586. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 586 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una

secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 586 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 586. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 586. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 586. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al

menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente,

la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una

proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 735 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 735. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 573 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573.

Se proporcionan diversas secuencias codificantes de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 576 y 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 576 y 581-583. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 576 y 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 576 y 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 576 y 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de

las sec. con núms. de ident.: 576 y 581-583. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec.

con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

Se proporcionan diversas secuencias que codifican la proteína terapéutica multidominio optimizada por codones. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una

cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 581-583. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que

comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 581 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 581. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 581 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec.

con núm. de ident.: 581 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 581. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína

terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos

90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico

comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 729 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 729. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido

nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 582. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 582 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 582 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 582. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 582 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 582 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 582. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 582 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec.

con núm. de ident.: 582 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 582. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 582. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 582. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína

terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos

90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico

comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 730 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 730. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido

nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 583. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 583 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 583 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 583. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 583 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 583 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 583. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 583 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec.

con núm. de ident.: 583 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 583. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 583. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 583. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína

terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

El constructo de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, (1) una ITR 5' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160), (2) un sitio aceptor de corte y empalme (p. ej., un aceptor de corte y empalme del exón 2 de *Alb* de ratón), tal como el que se expone en la sec. con núm. de ident.: 163), (3) la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, (4) una señal de poliadenilación (p. ej., una señal de poliadenilación de SV40, tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 712), y (5) una ITR 3' (p. ej., tal como la expuesta en la sec. con núm. de ident.: 160 o el complemento inverso de esta). En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos

90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico

comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 731 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 731. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido

nucleico codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 572 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572. Opcionalmente, el constructo de ácido nucleico en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 572.

Se proporcionan diversas secuencias codificantes de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %,

al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574 y 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574 y 578-580. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 574 y 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574 y 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574 y 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574 y 578-580. Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica

multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570.

Se proporcionan diversas secuencias que codifican la proteína terapéutica multidominio optimizada por codones. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede ser, por ejemplo, carente de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizada por codones (p. ej., carece de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizada por codones). En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-580. En otro ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína

terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 578-580. Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia que codifica el GAA en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una

proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 578. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 578 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 578 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 578. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 578 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En

otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 578 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 578. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 578 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 578 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 578. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína

terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 578. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 578. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA).

Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570.

En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 579. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la

proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 579 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 579 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 579. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 579 y codifica una proteína terapéutica

multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 579 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 579. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 579 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 579 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia

codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 579. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 579. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 579. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %,

al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570.

En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %,

al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al

menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 580. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 580 y codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con

núm. de ident.: 580 y codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 570. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 580. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 580. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 580. La secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede, por ejemplo, carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y/u optimizar por codones. Por ejemplo, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede carecer de CpG (p. ej., carece completamente de CpG) y optimizar por codones. Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia codificante de la

proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 570 (y, p. ej. retiene la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 570.

Se proporcionan diversas secuencias que codifican la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 575. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 575. En otro ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es (o comprende una secuencia) idéntica al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % a la sec. con núm. de ident.: 575. En otro ejemplo, la secuencia codificante de proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 575. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consta esencialmente de la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 575. En otro ejemplo, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 575. Opcionalmente, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que

comprende una secuencia) al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 571 (y, por ejemplo, que conserva la actividad nativa de GAA). Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 571 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio (o una proteína terapéutica multidominio que comprende una secuencia) al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 571 (y, p. ej., conserva la actividad de GAA nativo). Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 571. Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste esencialmente en la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 571.

Opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína terapéutica multidominio en los ejemplos anteriores codifica una proteína terapéutica multidominio que consiste en la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 571.

Cuando en la presente descripción se describen secuencias de constructos de ácido nucleico de proteína terapéuticas multidominio específicas, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los elementos del constructo se describen en la presente descripción en un orden específico de 5' a 3', también pretenden comprender el complemento inverso del orden de esos elementos. Una razón para esto es que, en muchas modalidades descritas en la presente descripción, los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio son parte de un vector AAV recombinante monocatenario. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet.*

Med. 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

(5) Vectores

Los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción se pueden proporcionar en un vector para la expresión o para la integración a y la expresión a partir de un locus genómico diana. Un vector puede comprender secuencias adicionales como, por ejemplo, los orígenes de replicación, promotores y genes que codifican la resistencia a antibióticos. Un vector también puede comprender componentes de agentes de nucleasa como se describe en otra parte de la presente descripción. Por ejemplo, un vector puede comprender un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., que codifica una proteína terapéutica multidominio), un sistema CRISPR/Cas (ácidos nucleicos que codifican la proteína Cas y gRNA), uno o más componentes de un sistema CRISPR/Cas o una combinación de estos (p. ej., un constructo de ácido nucleico y un ARNg). En algunos casos, un vector que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., que codifica una proteína terapéutica multidominio) no comprende ningún componente de los agentes de nucleasa descritos en esta descripción (p. ej., no comprende un ácido

nucleico que codifica una proteína Cas y no comprende un ácido nucleico que codifica un ARNg). Algunos vectores de este tipo comprenden brazos de homología correspondientes a sitios diana en el locus genómico diana. Otros vectores de este tipo no comprenden ningún brazo de homología.

Algunos vectores pueden ser circulares. Alternativamente, el vector puede ser lineal. El vector puede empaquetarse para suministrarse a través de una nanopartícula lipídica, un liposoma, una nanopartícula no lipídica o una cápside viral. Los vectores ilustrativos no limitantes incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales, minicromosomas, transposones, vectores virales y vectores de expresión.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores virales tales como los vectores de virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés). El AAV puede ser cualquier serotipo adecuado y puede ser un AAV monocatenario (ssAAV) o un AAV autocomplementario (scAAV). Otros virus/vectores virales ilustrativos incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, vaccinia virus, poxvirus y virus del herpes simple. Los virus pueden infectar células en división, células que no se dividen o tanto células en división como células que no se dividen. Los virus pueden integrarse en el genoma del huésped o, alternativamente, no integrarse en el genoma del huésped. Dichos virus también pueden diseñarse para tener una inmunidad reducida. Los virus

pueden ser competentes para la replicación o pueden ser defectuosos en la replicación (p. ej., defectuosos en uno o más genes necesarios para rondas adicionales de replicación y/o empaquetamiento del virión). Los virus pueden causar una expresión transitoria o una expresión más duradera. El vector viral puede modificarse genéticamente a partir de sus contrapartes silvestre. Por ejemplo, el vector viral puede comprender una inserción, deleción o sustitución de uno o más nucleótidos para facilitar la clonación o de tal manera que cambie una o más propiedades del vector. Dichas propiedades pueden incluir la capacidad de empaquetamiento, eficiencia de transducción, inmunogenicidad, integración del genoma, replicación, transcripción y traducción. En algunos ejemplos, se puede delecionar una parte del genoma viral de manera que el virus sea capaz de empaquetar secuencias exógenas que tengan un tamaño mayor. En algunos ejemplos, el vector viral puede tener una mejor eficiencia de transducción. En algunos ejemplos, puede reducirse la respuesta inmunitaria inducida por el virus en un huésped. En algunos ejemplos, los genes virales (como la integrasa) que promueven la integración de la secuencia viral en el genoma del huésped pueden mutar de tal manera que el virus no se integre. En algunos ejemplos, el vector viral puede tener una replicación defectuosa. En algunos ejemplos, el vector viral puede comprender secuencias de control transcripcionales o

traduccionales exógenas para estimular la expresión de secuencias codificantes en el vector. En algunos ejemplos, el virus puede depender del auxiliar. Por ejemplo, el virus puede necesitar uno o más virus auxiliares para suministrar los componentes virales (como las proteínas virales) necesarios para amplificar y empaquetar los vectores en partículas virales. En tal caso, uno o más componentes auxiliares, incluidos uno o más vectores que codifican los componentes virales, pueden introducirse en una célula huésped o población de células huésped junto con el sistema de vectores descrito en la presente descripción. En otros ejemplos, el virus puede no necesitar auxiliares. Por ejemplo, el virus puede ser capaz de amplificar y empaquetar los vectores sin un virus auxiliar. En algunos ejemplos, el sistema de vectores descrito en la presente descripción también puede codificar los componentes virales necesarios para la amplificación y el empaquetamiento del virus.

Los títulos virales ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{16} vg/ml. Otros títulos virales ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{16} vg/kg del peso corporal.

Los virus adenoasociados (AAV) son endémicos en múltiples especies, incluidos los primates humanos y no humanos (NHP, por sus siglas en inglés). Hasta la fecha se han aislado y caracterizado al menos 12 serotipos naturales

y cientos de variantes naturales. *Ver, p. ej.*, Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Las partículas de AAV se componen naturalmente por una cápside de proteína icosaédrica sin envoltura que contiene un genoma de ADN monocatenario (ssDNA). El genoma de ADN se encuentra flanqueado por dos repeticiones terminales inversas (ITR, por sus siglas en inglés) que sirven como los orígenes virales de replicación y señales de empaquetamiento. El gen *rep* codifica cuatro proteínas requeridas para la replicación y el empaquetamiento viral, mientras que el gen *cap* codifica las tres subunidades estructurales de la cápside que dictan el serotipo AAV y la proteína activadora del ensamblaje (AAP, por sus siglas en inglés) que promueve el ensamblaje del virión en algunos serotipos.

El AAV recombinante (rAAV, por sus siglas en inglés) es actualmente uno de los vectores virales más comúnmente usados en la terapia génica para tratar enfermedades humanas mediante la entrega de transgenes terapéuticos dirigidos a las células diana *in vivo*. De hecho, los vectores de rAAV se componen de cápsides icosaédricas similares a los AAV naturales, pero los viriones de rAAV no encapsidan las secuencias de codificación de proteínas AAV o de replicación de AAV. Estos vectores virales no se replican. Las únicas secuencias

virales requeridas en los vectores rAAV son las dos ITR, que son necesarias para guiar la replicación y el empaquetamiento del genoma durante la fabricación del vector rAAV. Los genomas rAAV se encuentran desprovistos de genes *rep* y *cap* de AAV, haciéndolos no replicantes *in vivo*. Los vectores rAAV se producen al expresar los genes *rep* y *cap* junto con las proteínas auxiliares virales adicionales *in trans*, en combinación con el casete transgénico deseado flanqueado por las ITR de AAV.

En los genomas terapéuticos de rAAV, se coloca un casete de expresión génica entre las secuencias de ITR. Generalmente, los casetes del genoma de rAAV constan de un promotor para estimular la expresión de un transgén terapéutico, seguido de una secuencia de poliadenilación. Las ITR que flanquean un casete de expresión de rAAV generalmente se derivan de AAV2, el primer serotipo que se aisló y convirtió en un vector viral recombinante. Desde entonces, la mayoría de los métodos de producción de rAAV dependen de los sistemas de empaque basados en AAV2 *Reps*. *Ver, p. ej.*, Colella et al. (2017) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 8:87-104, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Algunos ejemplos no limitantes de ITR que se pueden usar incluyen ITR que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la sec. con núm. de ident.: 158, sec. con núm. de ident.: 159 o sec. con núm. de ident.: 160. Otros ejemplos

de ITR comprenden una o más mutaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.: 158, sec. con núm. de ident.: 159 o sec. con núm. de ident.: 160 y pueden ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a la sec. con núm. de ident.: 158, sec. con núm. de ident.: 159 o sec. con núm. de ident.: 160. En algunos genomas de rAAV descritos en la presente descripción, el constructo de ácido nucleico está flanqueado en ambos lados por la misma ITR (es decir, la ITR en el extremo 5' y el complemento inverso de la ITR en el extremo 3', tal como la sec. con núm. de ident.: 158 en el extremo 5' y la sec. con núm. de ident.: 168 en el extremo 3', o la sec. con núm. de ident.: 159 en el extremo 5' y la sec. con núm. de ident.: 710 en el extremo 3', o la sec. con núm. de ident.: 160 en el extremo 5' y la sec. con núm. de ident.: 711 en el extremo 3'). En un ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 158 (es decir, la sec. con núm. de ident.: 158 en el extremo 5' y el complemento inverso en el extremo 3'). En otro ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 159 (es decir, la sec. con núm. de ident.: 159 en el extremo 5' y el complemento inverso en el extremo 3'). En un ejemplo, la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.:

160. En un ejemplo, la ITR en el extremo 5' comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en el extremo 3' comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 160 (es decir, la sec. con núm. de ident.: 160 en el extremo 5' y el complemento inverso en el extremo 3'). En otros genomas de rAAV descritos en la presente descripción, el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por diferentes ITR en cada extremo. En un ejemplo, la ITR en un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 158, y la ITR en el otro extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 159. En otro ejemplo, la ITR en un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 158, y la ITR en el otro extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 159, y la ITR en el otro extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

El serotipo específico de un vector de AAV recombinante influye en su tropismo *in vivo* a tejidos específicos. Las proteínas de la cápside de AAV son

responsables de mediar la unión y la entrada en las células diana, seguidas del escape endosomal y el tráfico hacia el núcleo. Por lo tanto, la elección del serotipo al desarrollar un vector rAAV influirá en qué tipos de células y tejidos es más probable que el vector se una y transduzca cuando se inyecta *in vivo*. Varios serotipos de rAAV, incluido el rAAV8, son capaces de transducir el hígado cuando se suministran sistémicamente en ratones, NHP y humanos. *Ver, p. ej.*, Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Una vez en el núcleo, el genoma de ssDNA se libera del virión y se sintetiza una cadena de ADN complementaria para generar una molécula de ADN bicatenario (dsDNA). Los genomas de AAV bicatenarios se circularizan naturalmente a través de sus ITR y se convierten en episomas que persistirán extracromosómicamente en el núcleo. Por lo tanto, para los programas de terapia génica episomal, los episomas de rAAV suministrados por rAAV proporcionan una expresión génica estimulada por promotores a largo plazo en células que no se dividen. Sin embargo, este ADN episomal suministrado por rAAV se diluye a medida que las células se dividen. Por el contrario, la terapia génica descrita en la presente descripción se basa en la inserción de genes para permitir la expresión génica a largo plazo.

Cuando los rAAV específicos que comprenden secuencias específicas (p. ej., secuencias constructivas bidireccionales específicas o secuencias constructivas unidireccionales específicas) se describen en la presente descripción, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si un constructo bidireccional o unidireccional descrita en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los rAAV que comprenden elementos constructivos bidireccionales o unidireccionales en un orden específico de 5' a 3' se describen en la presente descripción, también pretenden abarcar el complemento inverso del orden de esos elementos. Por ejemplo, si se describe en la presente descripción un rAAV que comprende un constructo bidireccional que comprende de 5' a 3' un primer aceptor de empalme, una primera secuencia de codificación, un primer terminador, un complemento inverso de un segundo terminador, un complemento inverso de una segunda secuencia codificante y un complemento inverso de un segundo aceptor de empalme, también pretende abarcar un constructo que comprende de 5' a 3' el segundo aceptor de empalme, la segunda secuencia codificante, el segundo terminador, un complemento inverso del primer terminador, un complemento inverso de la primera secuencia codificante y un complemento inverso del primer aceptor de

empalme. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

El genoma de ssDNA AAV consta de dos marcos de lectura abiertos, Rep y Cap, flanqueados por dos repeticiones terminales inversas que permiten la síntesis de la cadena de ADN complementaria. Al construir un plásmido de transferencia AAV, el transgén se coloca entre los dos ITR y se pueden suministrar Rep y Cap *in 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 se pueden transfectar en células HEK293 que contienen el gen E1+ del adenovirus para producir partículas AAV infecciosas. Alternativamente, el Rep, el Cap y los genes auxiliares adenovirus pueden combinarse en un solo plásmido. Se pueden usar células y métodos de empaquetamiento similares para otros virus, tales como los retrovirus.

Se han identificado múltiples serotipos de AAV. Estos serotipos difieren en los tipos de células que infectan (es decir, su tropismo), lo que permite la transducción preferencial de tipos de células específicos. El término AAV incluye, por ejemplo, el AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 e híbridos de estos, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV de primates, AAV de no primates y AAV ovino. Las secuencias genómicas de varios serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales nativas (TR, por sus siglas en inglés), las proteínas Rep y las subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Tales secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas como GenBank. Un "vector AAV" como se usa en la presente descripción se refiere a un vector AAV que comprende una secuencia heteróloga que no es de origen AAV (es decir, una secuencia de ácido nucleico heteróloga a AAV), que generalmente comprende una secuencia que codifica un polipéptido exógeno de interés. El constructo puede comprender un AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 e híbridos de estos, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV de primate, AAV de no primate y secuencia de cápside de AAV ovino. En general, la

secuencia de ácido nucleico heteróloga (el transgén) se encuentra flanqueada por al menos una, y generalmente por dos, secuencias repetidas terminales inversas (ITR) de AAV. Un vector AAV puede ser monocatenario (ssAAV) o autocomplementario (scAAV). Los ejemplos de serotipos para tejido hepático incluyen AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.74 y AAVhu.37, y particularmente AAV8. En un ejemplo específico, el vector AAV que comprende el constructo de ácido nucleico puede ser un AAV8 recombinante (rAAV8). Un vector rAAV8 como se describe en la presente descripción es uno en el que la cápside es de AAV8. Por ejemplo, un vector AAV que usa ITR de AAV2 y una cápside de AAV8 se considera en la presente descripción como un vector rAAV8.

El tropismo se puede refinar aún más mediante la pseudotipificación, que es la mezcla de una cápside y un genoma de diferentes serotipos virales. Por ejemplo, el 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 eficiencia de la transducción, así como alterar el tropismo. Las cápsides híbridas derivadas de diferentes serotipos también pueden usarse para alterar el tropismo viral. Por ejemplo, el AAV-DJ contiene una cápside híbrida de ocho serotipos y muestra una alta infectividad en un amplio rango de tipos de células *in vivo*. El AAV-DJ8 es otro ejemplo que muestra las propiedades de AAV-DJ pero con una captación cerebral

mejorada. 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 del transgén, se pueden usar variantes de AAV autocomplementarias (scAAV). Debido a que el AAV depende de la maquinaria de replicación del ADN de la célula para sintetizar la hebra complementaria del genoma de ADN monocatenario del AAV, la expresión del transgén puede retrasarse. Para abordar este retraso, se pueden usar scAAV que contienen secuencias complementarias que son capaces de hibridarse espontáneamente tras la infección, eliminando el requisito de la síntesis de ADN de la célula huésped. Sin embargo, también pueden usarse vectores AAV monocatenarios (ssAAV).

Para aumentar la capacidad de empaquetamiento, los transgenes más largos pueden dividirse entre dos plásmidos de transferencia AAV, el primero con un donante de empalme de 3’ y el segundo con un aceptor de empalme de 5’. Tras la coinfección de una célula, estos virus forman concatémeros, se empalman y se puede expresar el transgén de longitud completa. Aunque esto permite una expresión

transgénica más larga, la expresión es menos eficiente. Métodos similares para aumentar la capacidad usan la recombinación homóloga. Por ejemplo, un transgén se puede dividir entre dos plásmidos de transferencia pero con una superposición sustancial de secuencias, de manera que la coexpresión induce la recombinación homóloga y la expresión del transgén de longitud completa.

B. Agentes de nucleasa y sistemas CRISPR/Cas

Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usar agentes de nucleasa tales como los sistemas asociados con las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas (CRISPR, por sus siglas en inglés)/CRISPR (Cas), sistemas de nucleasas con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés) o sistemas de nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés) o componentes de dichos sistemas para modificar un locus genómico diana en un gen diana, como un gen de puerto seguro (p. ej., *ALB*) para la inserción de un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente descripción. En general, los agentes de nucleasa implican el uso de sistemas de escisión diseñados para inducir una rotura bicatenaria o una muesca (es decir, una rotura de una sola cadena) en un sitio diana de nucleasa. La escisión o muesca puede ocurrir usando nucleasas específicas como las ZFN, TALEN o sistemas

CRISPR/Cas diseñadas con un ARN guía diseñado para guiar la escisión o muesca específica del sitio diana de la nucleasa. Cualquier agente de nucleasa que induzca una muesca o rotura bicatenaria en una secuencia diana deseada puede usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente descripción. El agente de nucleasa puede usarse para crear un sitio de inserción en un locus deseado (gen diana) dentro de un genoma huésped, en cuyo sitio se inserta el constructo de ácido nucleico para expresar el polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio). El polipéptido de interés (p. ej., la proteína terapéutica multidominio) puede ser exógeno con respecto a su sitio de inserción o locus (gen diana), tal como un locus de puerto seguro desde el que normalmente no se expresa el polipéptido de interés. Alternativamente, el polipéptido de interés puede ser no exógeno con respecto a su sitio de inserción, tal como la inserción en un locus endógeno que codifica el polipéptido de interés para corregir un gen defectuoso que codifica el polipéptido de interés.

En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas. En otro ejemplo, el agente de nucleasa comprende uno o más ZFN. En aun otro ejemplo, el agente de nucleasa comprende uno o más TALEN. En un ejemplo específico, los sistemas CRISPR/Cas o los componentes de tales sistemas se dirigen a un gen o locus *ALB* (p. ej., locus genómico *ALB*) dentro de una célula, o a un intrón 1 de un gen o locus *ALB*

dentro de una célula. En un ejemplo más específico, los sistemas CRISPR/Cas o los componentes de dichos sistemas se dirigen a un gen o locus o intrón 1 de *ALB* humano de un gen o locus de *ALB* humano dentro de una célula.

Los sistemas CRISPR/Cas incluyen transcripciones y otros elementos involucrados en la expresión o dirección de la actividad de los genes Cas. Un sistema CRISPR/Cas puede ser, por ejemplo, un sistema de tipo I, tipo II, tipo III o un sistema de tipo V (p. ej., el subtipo V-A o subtipo V-B). Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usar sistemas CRISPR/Cas usando complejos CRISPR (que comprenden un ARN guía (ARNg) complejado con una proteína Cas) para la unión dirigida al sitio o la escisión de ácidos nucleicos. Un sistema CRISPR/Cas dirigido a un gen o locus *ALB* comprende una proteína Cas (o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas) y uno o más ARN guía (o ADN que codifican uno o más ARN guía), con cada uno o más ARN guía dirigidos a una secuencia diana de ARN guía diferente en el locus genómico diana (p. ej., gen o locus *ALB*).

Los sistemas CRISPR/Cas usados en las composiciones y los métodos descritos en la presenta descripción pueden no producirse naturalmente. Un sistema que no se produce naturalmente incluye cualquier cosa que indique la participación de la mano del hombre, tal como uno o más componentes del sistema que se alteran o mutan de su estado natural, estando al menos sustancialmente

libre de al menos otro componente con el que se asocian naturalmente en la naturaleza, o estando asociados con al menos otro componente con el que no se asocian naturalmente. Por ejemplo, algunos sistemas CRISPR/Cas usan complejos CRISPR que no se producen naturalmente que comprenden un ARNg y una proteína Cas que no se producen juntos naturalmente, usan una proteína Cas que no se produce naturalmente o usan un ARNg que no se produce naturalmente.

(1) Loci genómicos diana y Albúmina (ALB)

Puede usarse cualquier locus genómico diana capaz de expresar un gen, tal como un locus de puerto seguro (gen de puerto seguro, como el *ALB*) o un locus GAA endógeno. El constructo de ácido nucleico puede integrarse en cualquier parte del locus genómico diana. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en un intrón o un exón de un locus genómico diana o puede reemplazar uno o más intrones y/o exones de un locus genómico diana. En un ejemplo específico, el constructo de ácido nucleico puede integrarse en un intrón del locus genómico diana, como el primer intrón del locus genómico diana (p. ej., el intrón 1 *ALB*). Ver, por ejemplo, los documentos WO 2020/082042, US 2020/0270617, WO 2020/082041, US 2020/0268906, WO 2020/082046, y US 2020/0289628, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Los constructos

integrados en un locus genómico diana pueden vincularse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana (p. ej., el promotor ALB).

Las interacciones entre el ADN exógeno integrado y un genoma huésped pueden limitar la confiabilidad y la seguridad de la integración y pueden conducir a efectos fenotípicos evidentes que no se deben a la modificación genética específica sino a efectos no deseados de la integración en los genes endógenos circundantes. Por ejemplo, los transgenes insertados aleatoriamente pueden estar sujetos a efectos de posición y silenciamiento, lo que hace que su expresión sea poco fiable e impredecible. De la misma manera, la integración de ADN exógeno en un locus cromosómico puede afectar a los genes endógenos circundantes y a la cromatina, alterando de esta manera el comportamiento y los fenotipos celulares. Los loci de puerto seguro incluyen loci cromosómicos donde los transgenes u otras inserciones de ácido nucleico exógeno pueden expresarse de manera estable y confiable en todos los tejidos de interés sin alterar abiertamente el comportamiento o fenotipo celular (es decir, sin ningún efecto nocivo en la célula huésped). *Ver, p. ej.*, Sadelain et al. (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12:51-58, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Por ejemplo, el locus de puerto seguro puede ser uno en el que la expresión de la secuencia del gen insertado no se vea

perturbada por ninguna expresión de lectura completa de los genes circundantes. Por ejemplo, los loci de puerto seguro pueden incluir loci cromosómicos en los que el ADN exógeno puede integrarse y funcionar de manera predecible sin afectar negativamente a la estructura o expresión del gen endógeno. Los loci de puerto seguro pueden incluir regiones extragénicas o regiones intragénicas como, por ejemplo, loci dentro de genes que no son esenciales, prescindibles o pueden alterarse sin consecuencias fenotípicas evidentes.

Tales loci de puerto seguro pueden ofrecer una configuración de cromatina abierta en todos los tejidos y pueden expresarse ubicuamente durante el desarrollo embrionario y en adultos. *Ver, p. ej.*, Zambrowicz et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3789-3794, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Además, los loci de puerto seguro pueden abordarse con alta eficiencia, y los loci de puerto seguro pueden interrumpirse sin un fenotipo evidente. Los ejemplos de loci de puerto seguro incluyen *ALB*, *CCR5*, *HPRT*, *AAVS1* y *Rosa26*. *Ver, p. ej.*, Patentes de EE. UU. núms. 7.888.121; 7.972.854; 7.914.796; 7.951.925; 8.110.379; 8.409.861; 8.586.526; y Publicaciones de Patentes de EE. UU. núms. 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; 2013/0177960; y 2013/0122591, cada uno de los cuales se

incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Otros ejemplos de loci genómicos diana incluyen un locus *ALB*, un locus EESYR, un locus SARS, posición 188.083.272 del cromosoma 1 humano o su ortólogo de mamífero no humano, posición 3.046.320 del cromosoma 10 humano o su ortólogo de mamífero no humano, posición 67, 328.980 del cromosoma 17 humano o su ortólogo de mamífero humano, un sitio de virus adenoasociado 1 (AAVS1, por sus siglas en inglés) en el cromosoma, un sitio donde se produce naturalmente la integración del virus AAV en el cromosoma humano 19 o su ortólogo de mamífero no humano, un gen del receptor de quimiocinas 5 (CCR5), un gen receptor de quimiocinas que codifica un correceptor de VIH-1 o un locus Rosa26 de ratón o su ortólogo de mamífero no murino.

En un ejemplo específico, un locus de puerto seguro es un locus dentro del genoma en donde se puede insertar un gen sin efectos nocivos significativos en la célula huésped, tal como un hepatocito (p. ej., sin causar apoptosis, necrosis y/o senescencia, o sin causar más que 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 40 % de apoptosis, necrosis y/o senescencia en comparación con una población control de células). El locus de puerto seguro puede permitir la sobreexpresión de un gen exógeno sin efectos nocivos significativos en la célula huésped, como un hepatocito (p. ej., sin causar apoptosis, necrosis y/o senescencia, o sin causar más que 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 40 % de

apoptosis, necrosis y/o senescencia en comparación con una población control de células). Un locus de puerto seguro deseable puede ser uno en el que la expresión de la secuencia del gen insertado no se vea perturbada por la expresión de lectura completa de los genes circundantes. El puerto seguro puede ser un puerto seguro humano (p. ej., para un tejido hepático o una célula huésped de hepatocito).

En un ejemplo específico, el locus genómico diana es un locus *ALB*, tal como el intrón 1 de un locus *ALB*. En un ejemplo más específico, el locus genómico objetivo es un locus *ALB* humano, tal como el intrón 1 de un locus *ALB* humano (por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 4).

(2) Proteínas Cas

Las proteínas Cas generalmente comprenden al menos un dominio de unión o reconocimiento de ARN que puede interactuar con los ARN guía. Las proteínas Cas también pueden comprender dominios de nucleasa (p. ej., los dominios de DNasa o dominios de RNasa), dominios de unión al ADN, dominios de helicasa, dominios de interacción proteína-proteína, dominios de dimerización y otros dominios. Algunos de estos dominios (p. ej., dominios de ADNasa) pueden ser de una proteína Cas nativa. Se pueden añadir otros dominios de este tipo para elaborar una proteína Cas modificada. Un dominio de nucleasa posee actividad catalítica para la escisión de ácidos nucleicos,

que incluye la ruptura de los enlaces covalentes de una molécula de ácido nucleico. La escisión puede producir extremos romos o extremos escalonados, y puede ser monocatenaria o bicatenaria. Por ejemplo, una proteína Cas9 de tipo salvaje generalmente creará un producto de escisión roma. Alternativamente, una proteína Cpf1 de tipo salvaje (p. ej., FnCpf1) puede dar como resultado un producto de escisión con un saliente 5' de 5 nucleótidos, y la escisión se produce después del par de bases 18ª de la secuencia PAM en la hebra no diana y después de la base 23ª en la hebra diana. Una proteína Cas puede tener una actividad de escisión completa para crear una ruptura bicatenaria en un locus genómico diana (p. ej., una ruptura bicatenaria con extremos romos), o puede ser una muesca que crea una ruptura de una sola cadena en un locus genómico diana.

Los ejemplos de proteínas Cas incluyen Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9 (Csn1 o Csx12), Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (CasA), Cse2 (CasB), Cse3 (CasE), Cse4 (CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 y Cu1966, y versiones homólogas o modificadas de estas.

Una proteína Cas ilustrativa es una proteína Cas9 o una proteína derivada de una proteína Cas9. Las proteínas

Cas9 son de un sistema CRISPR/Cas de tipo II y generalmente comparten cuatro motivos clave con una arquitectura conservada. Los motivos 1, 2 y 4 son motivos similares a RuvC y el motivo 3 es un motivo HNH. Las proteínas Cas9 ilustrativas son de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocosphaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becscii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*,

Arthrospira sp., *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosipho africanus*, *Acaryochloris marina*, *Neisseria meningitidis* o *Campylobacter jejuni*. Se describen ejemplos adicionales de los miembros de la familia Cas9 en WO 2014/131833, incorporada en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. La Cas9 de *S. pyogenes* (SpCas9) (p. ej., el número de acceso Q99ZW2 del UniProt asignado) es una proteína Cas9 ilustrativa. Una secuencia de proteína SpCas9 ilustrativa se establece en la sec. con núm. de ident.: 8 (codificada por la secuencia de ADN establecida en la sec. con núm. de ident.: 9). Una secuencia ilustrativa de ADNc de SpCas9 ARNm se expone en la sec. con núm. de ident.: 10. Las proteínas Cas9 más pequeñas (p. ej., las proteínas Cas9 cuyas secuencias codificantes son compatibles con la capacidad máxima de empaquetamiento de AAV cuando se combinan con una secuencia codificante de ARN guía y elementos reguladores para la Cas9 y el ARN guía, tales como la SaCas9 y CjCas9 y Nme2Cas9) son otras proteínas Cas9 ilustrativas. Por ejemplo, la Cas9 de *S. aureus* (SaCas9) (p. ej., el número de acceso J7RUA5 del UniProt asignado) es otra proteína Cas9 ilustrativa. De la misma manera, la Cas9 de *Campylobacter jejuni* (CjCas9) (p. ej., el número de acceso Q0P897 del UniProt asignado) es otra proteína Cas9 ilustrativa. *Ver, p. ej.*, Kim et al. (2017) *Nat. Commun.* 8:14500, incorporado en la presente

descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. La SaCas9 es más pequeña que la SpCas9, y la CjCas9 es más pequeña que la SaCas9 y SpCas9. La Cas9 de *Neisseria meningitidis* (Nme2Cas9) es otra proteína Cas9 ilustrativa. *Ver, p. ej.*, Edraki et al. (2019) *Mol. Cell* 73(4):714-726, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Las proteínas Cas9 de *Streptococcus thermophilus* (p. ej., *la Cas9 de Streptococcus thermophilus* LMD-9 codificado por el locus CRISPR1 (St1Cas9) o *la Cas9 de Streptococcus thermophilus* del locus CRISPR3 (St3Cas9)) son otras proteínas Cas9 ilustrativas. La Cas9 de *Francisella novicida* (FnCas9) o la variante RHA de la Cas9 de *Francisella novicida* que reconoce una PAM alternativa (sustituciones E1369R/E1449H/R1556A) son otras proteínas Cas9 ilustrativas. Estas y otras proteínas Cas9 ilustrativas se revisan, p. ej., en Cebrian-Serrano and Davies (2017) *Mamm. Genome* 28(7):247-261, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Se proporcionan ejemplos de las secuencias codificantes de los ARNm de Cas9 y las secuencias de la proteína Cas9 en los documentos WO 2013/176772, WO 2014/065596, WO 2016/106121, WO 2019/067910, WO 2020/082042, US 2020/0270617, WO 2020/082041, US 2020/0268906, WO 2020/082046, y US 2020/0289628, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como

referencia en su totalidad para todos los propósitos. Se proporcionan ejemplos específicos de ORF y secuencias de aminoácidos de Cas9 en la Tabla 30 en el párrafo [0449] de WO 2019/067910, y se proporcionan ejemplos específicos de ARNm y ORF de Cas9 en los párrafos [0214]-[0234] de WO 2019/067910. *Ver también* WO 2020/082046 A2 (págs. 84-85) y la Tabla 24 en WO 2020/069296, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Una secuencia de proteína Cas9 ilustrativa comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 11. Una secuencia ilustrativa de ARNm de SpCas9 que codifica la secuencia de la proteína SpCas9 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 12. Otra secuencia ilustrativa de ARNm de SpCas9 que codifica la secuencia de proteína SpCas9 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 1. Otra secuencia ilustrativa de ARNm de SpCas9 que codifica esa secuencia de proteína SpCas9 comprende la sec. con núm. de ident.: 2. Una secuencia codificante de SpCas9 ilustrativa comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 3.

Otro ejemplo de una proteína Cas es una proteína Cpf1 (CRISPR de *Prevotella* and *Francisella* 1). La Cpf1 es una proteína grande (de aproximadamente 1300 aminoácidos) que contiene un dominio de nucleasa similar a RuvC homólogo

al dominio correspondiente de Cas9 junto con una contraparte del característico grupo rico en arginina de Cas9. Sin embargo, la Cpf1 carece del dominio de nucleasa HNH que se encuentra presente en las proteínas Cas9, y el dominio similar a RuvC es contiguo en la secuencia de Cpf1, en contraste con Cas9, donde contiene insertos largos que incluyen el dominio HNH. *Ver, p. ej.*, Zetsche et al. (2015) *Cell* 163(3):759-771, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Las proteínas Cpf1 ilustrativas son de *Francisella tularensis 1*, *Francisella tularensis subsp. novicida*, *Prevotella albensis*, *Lachnospiraceae bacterium MC2017 1*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium GW2011_GWA2_33_10*, *Parcubacteria bacterium GW2011_GWC2_44_17*, *Smithella sp. SCADC*, *Acidaminococcus sp. BV3L6*, *Lachnospiraceae bacterium MA2020*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi 237*, *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium ND2006*, *Porphyromonas crevioricanis 3*, *Prevotella disiens* y *Porphyromonas macacae*. La Cpf1 de *Francisella novicida* U112 (FnCpf1; número de acceso A0Q7Q2 del UniProt asignado) es una proteína Cpf1 ilustrativa.

Otro ejemplo de una proteína Cas es CasX (Cas12e). La CasX es una endonucleasa de ADN guiada por ARN que genera una ruptura escalonada bicatenaria en el ADN. La CasX tiene un tamaño inferior a 1000 aminoácidos. Los ejemplos de las

proteínas CasX son de *Deltaproteobacteria* (DpbCasX or DpbCas12e) y *Planctomycetes* (PlmCasX or PlmCas12e). Al igual que la Cpf1, la CasX usa un solo sitio activo de RuvC para la escisión del ADN. *Ver, p. ej.*, Liu et al. (2019) *Nature* 566(7743):218-223, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Otro ejemplo de una proteína Cas es CasΦ (CasPhi o Cas12j), que se encuentra únicamente en bacteriófagos. La CasΦ tiene un tamaño inferior a 1000 aminoácidos (p. ej., 700-800 aminoácidos). La escisión de CasΦ genera salientes escalonadas de 5'. Un solo sitio activo de RuvC en CasΦ es capaz de procesar ARNcr y cortar ADN. *Ver, p. ej.*, Pausch et al. (2020) *Science* 369(6501):333-337, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Las proteínas Cas pueden ser proteínas de tipo salvaje (es decir, las que se producen en la naturaleza), proteínas Cas modificadas (es decir, variantes de proteína Cas) o fragmentos de proteínas Cas de tipo salvaje o modificadas. Las proteínas Cas también pueden ser variantes o fragmentos activos con respecto a la actividad catalítica de las proteínas Cas de tipo salvaje o modificadas. Las variantes o fragmentos activos con respecto a la actividad catalítica pueden comprender al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con la proteína Cas de tipo salvaje o

modificada o una porción de esta, en donde las variantes activas retienen la capacidad de cortar en un sitio de escisión deseado y por lo tanto retienen la actividad inductora de muescas o inductora de rotura bicatenaria. Se conocen ensayos para la actividad inductora de muescas o inductora de rotura bicatenaria y generalmente miden la actividad global y la especificidad de la proteína Cas en los sustratos de ADN que contienen el sitio de escisión.

Un ejemplo de una proteína Cas modificada es la proteína SpCas9-HF1 modificada, que es una variante de alta fidelidad de las alteraciones que alberga la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (N497A/R661A/Q695A/Q926A) diseñadas para reducir los contactos de ADN no específicos. *Ver, p. ej.*, Kleinstiver et al. (2016) *Nature* 529(7587):490-495, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Otro ejemplo de una proteína Cas modificada es la variante eSpCas9 modificada (K848A/K1003A/R1060A) diseñada para reducir los efectos no deseados. *Ver, p. ej.*, Slaymaker et al. (2016) *Science* 351(6268):84-88, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Otras variantes de SpCas9 incluyen K855A y K810A/K1003A/R1060A. Estas y otras proteínas Cas modificadas se analizan, p. ej., en Cebrian-Serrano and Davies (2017) *Mamm. Genome* 28(7):247-261, incorporado en su totalidad en la presente descripción

como referencia para todos los propósitos. Otro ejemplo de una proteína Cas9 modificada es xCas9, que es una variante de SpCas9 que puede reconocer un rango ampliado de secuencias PAM. *Ver, p. ej.*, Hu et al. (2018) *Nature* 556:57-63, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Las proteínas Cas pueden modificarse para aumentar o disminuir uno o más de la afinidad de unión de ácidos nucleicos, la especificidad de unión de ácidos nucleicos y la actividad enzimática. Las proteínas Cas también pueden modificarse para cambiar cualquier otra actividad o propiedad de la proteína, como la estabilidad. Por ejemplo, uno o más dominios de nucleasa de la proteína Cas pueden modificarse, eliminarse o inactivarse, o una proteína Cas puede truncarse para eliminar los dominios que no son esenciales para la función de la proteína o para optimizar (p. ej., mejorar o reducir) la actividad o una propiedad de la proteína Cas.

Las proteínas Cas pueden comprender al menos un dominio de nucleasa, como un dominio de ADNasa. Por ejemplo, una proteína Cpf1 de tipo salvaje generalmente comprende un dominio similar a RuvC que escinde ambas hebras de ADN diana, quizás en una configuración dimérica. De la misma manera, CasX y CasΦ generalmente comprenden un solo dominio similar a RuvC que escinde ambas hebras de un ADN diana. Las proteínas Cas también pueden comprender al menos dos dominios de nucleasa, como los dominios de ADNasa. Por

ejemplo, una proteína Cas9 de tipo salvaje generalmente comprende un dominio de nucleasa similar a RuvC y un dominio de nucleasa similar a HNH. Cada uno de los dominios RuvC y HNH puede cortar una hebra diferente de ADN bicatenario para elaborar una ruptura bicatenaria en el ADN. *Ver, p. ej.*, Jinek et al. (2012) *Science* 337(6096):816-821, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Uno o más de los dominios de nucleasa se pueden eliminar o mutar para que ya no sean funcionales o tengan una actividad de nucleasa reducida. Por ejemplo, si uno de los dominios de nucleasa se elimina o muta en una proteína Cas9, la proteína Cas9 resultante se puede denominar nickasa y puede generar una ruptura de una sola hebra dentro de un ADN diana de doble hebra, pero no una ruptura de doble hebra (es decir, puede escindir la cadena complementaria o la hebra no complementaria, pero no ambas). Si ninguno de los dominios de nucleasa se elimina o muta en una proteína Cas9, la proteína Cas9 conservará la actividad inductora de rotura bicatenaria. Un ejemplo de una mutación que convierte a una Cas9 en una nickasa es una mutación D10A (aspartato a alanina en la posición 10 de Cas9) en el dominio RuvC de Cas9 de *S. pyogenes*. De la misma manera, H939A (histidina a alanina en la posición de aminoácido 839), H840A (histidina a alanina en la posición de aminoácido 840) o N863A (asparagina a alanina en la posición de aminoácido N863) en el dominio HNH

de Cas9 de *S. pyogenes* puede convertir la Cas9 en una nickasa. Otros ejemplos de mutaciones que convierten a una Cas9 en una nickasa incluyen las mutaciones correspondientes a Cas9 de *S. thermophilus. Ver, p. ej.*, Sapranauskas et al. (2011) *Nucleic Acids Res.* 39(21):9275-9282 y WO 2013/141680, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Dichas mutaciones pueden generarse usando métodos, tales como la mutagénesis dirigida al sitio, la mutagénesis mediada por PCR o la síntesis de genes total. Se pueden encontrar ejemplos de otras mutaciones que crean nickasas, por ejemplo, en WO 2013/176772 y WO 2013/142578, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Los ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de xCas9 son los mismos que los descritos anteriormente para SpCas9. También se conocen ejemplos de mutaciones inactivantes en los dominios catalíticos de las proteínas Cas9 de *Staphylococcus aureus*. Por ejemplo, la enzima Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) puede comprender una sustitución en la posición N580 (p. ej., sustitución N580A) o una sustitución en la posición D10 (p. ej., sustitución D10A) para generar una nickasa Cas. *Ver, p. ej.*, WO 2016/106236, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en

los dominios catalíticos de Nme2Cas9 (p. ej. D16A o H588A). También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de St1Cas9 (p. ej., D9A, D598A, H599A o N622A). También se conocen ejemplos de mutaciones inactivantes en los dominios catalíticos de St3Cas9 (p. ej., D10A o N870A). También se conocen ejemplos de mutaciones inactivantes en los dominios catalíticos de CjCas9 (p. ej., combinación de D8A o H559A). También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de FnCas9 y RHA FnCas9 (p. ej., N995A).

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

incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de las proteínas CasX. Con referencia a las proteínas CasX de *Deltaproteobacteria*, D672A, E769A y D935A (individualmente o en combinación) o las posiciones correspondientes en otros ortólogos de CasX se están desactivando. *Ver, p. ej.*, Liu et al. (2019) *Nature* 566(7743):218-223, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de las proteínas CasΦ. Por ejemplo, D371A y D394A, solas o combinadas, son mutaciones inactivantes. *Ver, p. ej.*, Pausch et al. (2020) *Science* 369(6501):333-337, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Las proteínas Cas también pueden unirse operativamente a polipéptidos heterólogos como las proteínas de fusión. Por ejemplo, una proteína Cas se puede fusionar con un dominio de escisión. *Ver* WO 2014/089290, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Las proteínas Cas también pueden fusionarse con un polipéptido heterólogo que proporciona una mayor o menor estabilidad. El dominio fusionado o el

polipéptido heterólogo puede ubicarse en el extremo N, el extremo C o internamente dentro de la proteína Cas.

Como ejemplo, una proteína Cas puede fusionarse con uno o más polipéptidos heterólogos que proporcionan localización subcelular. Tales polipéptidos heterólogos pueden incluir, por ejemplo, una o más señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) como la NLS monopartita SV40 y/o una NLS bipartita de importina alfa para dirigirse al núcleo, una señal de localización mitocondrial para dirigirse a las mitocondrias, una señal de retención de ER y lo similar. *Ver, p. ej.*, Lange et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282(8):5101-5105, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Tales señales de localización subcelular pueden ubicarse en el extremo N, el extremo C o en cualquier lugar dentro de la proteína Cas. Una NLS puede comprender un tramo de aminoácidos básicos y puede ser una secuencia monopartita o una secuencia bipartita. Opcionalmente, una proteína Cas puede comprender dos o más NLS, incluida una NLS (p. ej., una NLS de importina alfa o una NLS monopartita) en el extremo N y una NLS (p. ej., una NLS SV40 o una NLS bipartita) en el extremo C. Una proteína Cas también puede comprender dos o más NLS en el extremo N y/o dos o más NLS en el extremo C.

Una proteína Cas puede, por ejemplo, fusionarse con 1-10 NLS (p. ej., fusionarse con 1-5 NLS o fusionarse

con una NLS). Cuando se usa una NLS, la NLS puede unirse al extremo N o al extremo C de la secuencia de la proteína Cas. También se puede insertar dentro de la secuencia de la proteína Cas. Alternativamente, la proteína Cas puede fusionarse con más de una NLS. Por ejemplo, la proteína Cas puede fusionarse con 2, 3, 4 o 5 NLS. En un ejemplo específico, la proteína Cas puede fusionarse con dos NLS. En determinadas circunstancias, las dos NLS pueden ser iguales (p. ej., dos NLS SV40) o diferentes. Por ejemplo, la proteína Cas puede fusionarse con dos secuencias NLS SV40 unidas en el extremo carboxi. Alternativamente, la proteína Cas puede fusionarse con dos NLS, una unida en el extremo N y otra en el extremo C. En otros ejemplos, la proteína Cas puede fusionarse con 3 NLS o sin NLS. La NLS puede ser una secuencia monopartita, tal como, p. ej., NLS SV40, PKKKRKV (sec. con núm. de ident.: 13) o PKKKRRV (sec. con núm. de ident.: 14). La NLS puede ser una secuencia bipartita, tal como la NLS de la nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (sec. con núm. de ident.: 15). En un ejemplo específico, una sola NLS de PKKKRKV (sec. con núm. de ident.: 13) puede enlazarse al extremo C-terminal de la proteína Cas. Uno o más enlazadores se incluyen opcionalmente en el sitio de fusión.

Las proteínas Cas también se pueden unir operativamente a un dominio de penetración celular o a un dominio de transducción de proteínas. Por ejemplo, el dominio de penetración celular puede derivar de la proteína

TAT del VIH-1, el motivo de penetración celular TLM del virus de la hepatitis B humana, MPG, Pep-1, VP22, un péptido de penetración celular del virus Herpes simplex o un secuencia peptídica de poliarginina. *Ver, p. ej.*, WO 2014/089290 y WO 2013/176772, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. El dominio de penetración celular puede ubicarse en el extremo N, el extremo C o en cualquier lugar dentro de la proteína Cas.

Las proteínas Cas también pueden unirse operativamente a un polipéptido heterólogo para facilitar el seguimiento o la purificación, como una proteína fluorescente, una etiqueta de purificación o una etiqueta de epítopo. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen las proteínas fluorescentes verdes (p. ej., GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreenl), proteínas fluorescentes amarillas (p. ej., YFP, eYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellowl), proteínas fluorescentes azules (p. ej., eBFP, eBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), proteínas fluorescentes cian (p. ej., eCFP, Cerulean, CyPet, AmCyanl, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes rojas (p. ej., mKate, mKate2, mPlum, DsRed monomer, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRedl, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), proteínas fluorescentes naranjas (p.

ej., mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato), y cualquier otra proteína fluorescente adecuada. Los ejemplos de etiquetas incluyen glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a quitina (CBP, por sus siglas en inglés), proteína de unión a maltosa, tiorredoxina (TRX), poli(NANP), etiqueta de purificación por afinidad en tándem (TAP, por sus siglas en inglés), myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, hemaglutinina (HA), nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, histidina (His), proteína portadora de biotina carboxilo (BCCP, por sus siglas en inglés) y calmodulina.

Las proteínas Cas también pueden unirse a ácidos nucleicos marcados. Tal enlace (es decir, enlace físico) puede lograrse mediante interacciones covalentes o interacciones no covalentes, y el enlace puede ser directo (p. ej., mediante la fusión directa o conjugación química, que puede lograrse mediante la modificación de los residuos de cisteína o lisina en la proteína o modificación de la proteína) o puede lograrse a través de uno o más enlazadores intermedios o moléculas adaptadoras tales como la estreptavidina o los aptámeros. *Ver, p. ej., Pierce et al. (2005) Mini Rev. Med. Chem.* 5(1):41-55; Duckworth et al. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46(46):8819-8822; Schaeffer y Dixon (2009) *Australian J. Chem.* 62(10):1328-1332; Goodman et al. (2009) *Chembiochem*. 10(9):1551-1557; y

Khatwani et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem.* 20(14):4532-4539, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Las estrategias no covalentes para sintetizar los conjugados de proteína-ácido nucleico incluyen métodos de biotina-estreptavidina y níquel-histidina. Los conjugados covalentes de proteína-ácido nucleico pueden sintetizarse conectando ácidos nucleicos y proteínas debidamente funcionalizados usando una amplia variedad de químicas. Algunas de estas químicas implican la unión directa del oligonucleótido a un residuo de aminoácido en la superficie de la proteína (p. ej., una amina de lisina o un tiol de cisteína), mientras que otros esquemas más complejos requieren la modificación postraduccional de la proteína o la participación de un catalizador o dominio de proteína reactiva. Los métodos para la unión covalente de proteínas a ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, el entrecruzamiento químico de oligonucleótidos con residuos de lisina o cisteína de proteína, unión de proteína expresada, métodos quimioenzimáticos y el uso de fotoaptámeros. El ácido nucleico marcado se puede unir al extremo C, al extremo N o a una región interna dentro de la proteína Cas. En un ejemplo, el ácido nucleico marcado se une al extremo C o al extremo N de la proteína Cas. De la misma manera, la proteína Cas puede unirse al extremo 5', al extremo 3' o a una región interna dentro del ácido nucleico marcado. Es decir, el ácido

nucleico marcado puede unirse en cualquier orientación y polaridad. Por ejemplo, la proteína Cas puede unirse al extremo 5’ o al extremo 3’ del ácido nucleico marcado.

Las proteínas Cas pueden proporcionarse en cualquier forma. Por ejemplo, una proteína Cas puede proporcionarse en forma de proteína, tal como una proteína Cas complejada con un ARNg. Alternativamente, una proteína Cas puede proporcionarse en la forma de un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, tal como un ARN (p. ej., ARN mensajero (ARNm)) o ADN. Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede tener codones optimizados para una traducción eficiente en proteína en una célula u organismo particular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede modificarse para sustituir los codones que tienen una mayor frecuencia de uso en una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata o cualquier otra célula huésped de interés, en comparación con la secuencia de polinucleótidos de que se produce naturalmente. Cuando se introduce en la célula un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, la proteína Cas puede expresarse transitoria, condicional o constitutivamente en la célula.

Los ácidos nucleicos que codifican proteínas Cas pueden integrarse establemente en el genoma de una célula y unirse operativamente a un promotor activo en la célula.

Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas Cas pueden unirse operativamente a un promotor en un constructo de expresión. Los constructos de expresión incluyen cualquier constructo de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen u otra secuencia de ácido nucleico de interés (p. ej., un gen Cas) y que puede transferir tal secuencia de ácido nucleico de interés a una célula diana. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede estar en un vector que comprende un ADN que codifica un ARNg. Alternativamente, puede estar en un vector o plásmido que se encuentra separado del vector que comprende el ADN que codifica el ARNg. Los promotores que pueden usarse en un constructo de expresión incluyen promotores activos, por ejemplo, en una o más de una célula eucariota, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula pluripotente, una célula madre embrionaria (ES, por sus siglas en inglés), una célula madre adulta, una célula progenitora de desarrollo restringido, una célula madre pluripotente inducida (iPS, por sus siglas en inglés) o un embrión en etapa unicelular. Tales promotores pueden ser, por ejemplo, promotores condicionales, promotores inducibles, promotores constitutivos o promotores específicos de tejido. Opcionalmente, el promotor puede ser un promotor bidireccional que dirija la expresión tanto de

una proteína Cas en una dirección como de un ARN guía en la otra dirección. Tales promotores bidireccionales pueden consistir en (1) un promotor Pol III unidireccional, convencional y completo que contiene 3 elementos de control externos: un elemento de secuencia distal (DSE, por sus siglas en inglés), un elemento de secuencia proximal (PSE, por sus siglas en inglés) y una caja TATA; y (2) un segundo promotor Pol III básico que incluye un PSE y una caja TATA fusionados al extremo 5’ del DSE en orientación inversa. Por ejemplo, en el promotor H1, el DSE es adyacente al PSE y la caja TATA, y el promotor puede volverse bidireccional creando un promotor híbrido en el que la transcripción en la dirección inversa se controle agregando un PSE y una caja TATA derivados del promotor U6. Véase, por ejemplo, el documento US 2016/0074535, incorporado en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos. El uso de un promotor bidireccional para expresar genes que codifican una proteína Cas y un ARN guía simultáneamente permite la generación de casetes de expresión compactos para facilitar la entrega. En modalidades preferidas, las autoridades reguladoras aceptan los promotores para su uso en seres humanos. En determinadas modalidades, los promotores dirigen la expresión en una célula hepática.

Pueden usarse diferentes promotores para impulsar la expresión de Cas o la expresión de Cas9. En algunos métodos, se usan pequeños promotores para que la secuencia

codificante Cas o Cas9 pueda encajar en un constructo AAV. Por ejemplo, Cas o Cas9 y uno o más ARNg (p. ej., 1 ARNg o 2 ARNg o 3 ARNg o 4 ARNg) pueden administrarse a través del suministro mediado por LNP (p. ej., en la forma de ARN) o suministro mediado por virus adenoasociados (AAV) (p. ej., suministro mediado por AAV2, suministro mediado por AAV5, suministro mediado por AAV8 o suministro mediado por AAV7m8). Por ejemplo, el agente de nucleasa puede ser CRISPR/Cas9, y un ARNm de Cas9 y un ARNg dirigidos a un intrón 1 de un locus *ALB* humano endógeno pueden suministrarse a través del suministro mediado por LNP o el suministro mediado por AAV. El Cas o Cas9 y los ARNg pueden suministrarse en un solo AAV o mediante dos AAV separados. Por ejemplo, un primer AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9, y un segundo AAV puede llevar un casete de expresión de ARNg. Similarmente, un primer AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9, y un segundo AAV puede llevar dos o más casetes de expresión de ARNg. Alternativamente, un solo AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9 (p. ej., una secuencia codificante de Cas o Cas9 unida operativamente a un promotor) y un casete de expresión de ARNg (p. ej., una secuencia codificante de ARNg unida operativamente a un promotor). Similarmente, un solo AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9 (p. ej., una secuencia codificante de Cas o Cas9 unida operativamente a un promotor) y dos o más casetes de expresión de ARNg (p. ej., secuencias

codificantes de ARNg unidas operativamente a promotores). Pueden usarse diferentes promotores para estimular la expresión del ARNg, tal como un promotor U6 o el pequeño ARNt Gln. De la misma manera, pueden usarse diferentes promotores para estimular la expresión de Cas9. Por ejemplo, se usan promotores pequeños para que la secuencia de codificación de Cas9 pueda encajar en un constructo de AAV. Similarmente, se usan proteínas Cas9 pequeñas (p. ej., SaCas9 o CjCas9 para maximizar la capacidad de empaquetamiento de AAV).

Las proteínas Cas proporcionadas como ARNm pueden modificarse para mejorar la estabilidad y/o las propiedades de inmunogenicidad. Las modificaciones se pueden realizar en uno o más nucleósidos dentro del ARNm. Los ejemplos de modificaciones químicas de las nucleobases de ARNm incluyen pseudouridina, 1-metil-pseudouridina y 5-metil-citidina. El ARNm que codifica las proteínas Cas también se puede proteger. La caperuza puede ser, por ejemplo, una estructura de caperuza 1 en la que el ribonucleótido +1 se encuentra metilado en la posición 2'O de la ribosa. La protección puede, por ejemplo, dar una actividad superior *in vivo* (p. ej., imitando una caperuza natural), puede dar como resultado una estructura natural que reduce la estimulación del sistema inmunitario innato del huésped (p. ej., puede reducir la activación de los receptores de reconocimiento de patrones en el sistema inmunitario innato). El ARNm que codifica las proteínas

Cas también puede poliadenilarse (para formar una cola poli(A)). El ARNm que codifica las proteínas Cas también puede modificarse para incluir pseudouridina (p. ej., puede sustituirse completamente con pseudouridina). Como otro ejemplo, puede usarse ARNm de Cas protegido y poliadenilado que contiene N1-metil-pseudouridina. El ARNm que codifica las proteínas Cas también puede modificarse para incluir N1-metil-pseudouridina (p. ej., puede sustituirse completamente con N1-metil-pseudouridina). Como otro ejemplo, puede usarse ARNm de Cas totalmente sustituido con pseudouridina (es decir, todos los residuos de uracilo estándar se reemplazan con pseudouridina, un isómero de uridina en el que el uracilo se une con un enlace carbono-carbono en lugar de nitrógeno-carbono). Como otro ejemplo, puede usarse ARNm de Cas totalmente sustituido con N1-metil-pseudouridina (es decir, todos los residuos de uracilo estándar se reemplazan con N1-metil-pseudouridina). De la misma manera, los ARNm de Cas pueden modificarse mediante el agotamiento de la uridina usando codones sinónimos. Por ejemplo, puede usarse ARNm de Cas protegido y poliadenilado totalmente sustituido con pseudouridina. Por ejemplo, puede usarse ARNm de Cas protegido y poliadenilado totalmente sustituido con N1-metil-pseudouridina.

Los ARNm de Cas pueden comprender una uridina modificada en al menos una, una pluralidad de o todas las

posiciones de uridina. La uridina modificada puede ser una uridina modificada en la posición 5 (p. ej., con un halógeno, metilo o etilo). La uridina modificada puede ser una pseudouridina modificada en la posición 1 (por ejemplo, con un halógeno, metilo o etilo). La uridina modificada puede ser, por ejemplo, pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 5-metoxiuridina, 5-yodouridina o una combinación de estas. En algunos ejemplos, la uridina modificada es 5-metoxiuridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es 5-yodouridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es pseudouridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es N1-metil-pseudouridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es una combinación de N1-metil pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es una combinación de 5-yodoruridina y N1-metil-pseudouridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-yodoruridina. En algunos ejemplos, la uridina modificada es una combinación de 5-yodoruridina y 5-metoxiuridina.

Los ARNm de Cas descritos en la presente descripción también pueden comprender una protección en 5', como Cap0, Cap1 o Cap2. Una protección 5' es

generalmente un ribonucleótido de 7-metilguanina (que puede modificarse aún más, p. ej., con respecto a ARCA) unido a través de un 5’-trifosfato a la posición 5' del primer nucleótido de la cadena 5’-a-3’ del ARNm (es decir, el primer nucleótido cap proximal a la protección). En Cap0, las ribosas del primer y segundo nucleótido proximales a la protección del ARNm comprenden un 2’-hidroxilo. En Cap1, las ribosas del primer y segundo nucleótido transcrito del ARNm comprenden un 2’-metoxi y un 2’-hidroxilo, respectivamente. En Cap2, las ribosas del primer y segundo nucleótido proximales a la protección del ARNm comprenden ambos un 2’-hidroxilo. *Véase, p. ej.,* Katibah et al. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(33):12025-30 and Abbas et al. (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114(11):E2106-E2115, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. La mayoría de los ARNm de eucariotas superiores endógenos, incluidos los ARNm de mamíferos como los ARNm humanos, comprenden Cap1 o Cap2. La Cap0 y otras estructuras de protección que difieren de Cap1 y Cap2 pueden ser inmunogénicas en mamíferos, tales como los humanos, debido al reconocimiento como no propio por parte de los componentes del sistema inmunitario innato tales como IFIT-1 e IFIT-5, lo que puede provocar niveles de citoquinas elevados incluyendo el interferón tipo I. Los componentes del

sistema inmunitario innato, tales como el IFIT-1 e IFIT-5, también pueden competir con el eIF4E por la unión de un ARNm con una caperuza distinta de Cap1 o Cap2, lo que podría inhibir la traducción del ARNm.

Puede incluirse una caperuza cotrancripcionalmente. Por ejemplo, ARCA (análogo de la caperuza anti-inversión; Thermo Fisher Scientific, cat. núm. AM8045) es un análogo de la caperuza que comprende un 3’-metoxi-5’-trifosfato de 7-metilguanina unido a la posición 5’ de un ribonucleótido de guanina que puede incorporarse in vitro en una transcripción al inicio. El ARCA da como resultado una caperuza Cap0 en la que la posición 2’ del primer nucleótido proximal a la caperuza es hidroxilo. *Ver, p. ej.,* Stepinski et al. (2001) *RNA* 7:1486-1495, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

CleanCap™ AG (m7G(5’)ppp(5’)(2’OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, cat. N-7113) o CleanCap™ GG (m7G(5’)ppp(5’)(2’OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, cat. Núm. N-7133) puede usarse para proporcionar una estructura Cap1 cotranscripcionalmente. Versiones 3'-O-metiladas de CleanCap™ AG y CleanCap™ GG también están disponibles en TriLink Biotechnologies como núms. de cat. núms. N-7413 y N-7433, respectivamente.

Alternativamente, se puede añadir una caperuza a un ARN después de la transcripción. Por ejemplo, la enzima

de recubrimiento de Vaccinia se encuentra disponible comercialmente (New England Biolabs, cat. núm. M2080S) y tiene actividades de ARN trifosfatasa y guanililtransferasa, proporcionadas por su subunidad D1, y guanina metiltransferasa, proporcionada por su subunidad D12. Como tal, puede añadir una 7-metilguanina a un ARN, para dar Cap0, en presencia de S-adenosil metionina y GTP. *Ver, p. ej.,* Guo and Moss (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4023-4027 y Mao and Shuman (1994) *J. Biol. Chem.* 269:24472-24479, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Los ARNm de Cas pueden comprender además una cola poliadenilada (poli-A o poli(A) o poliadenina). La cola poli-A puede, por ejemplo, comprender al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 adeninas, y opcionalmente hasta 300 adeninas. Por ejemplo, la cola poli-A puede comprender 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina.

(3) ARN guía

Un “ARN guía” o “ARNg” es una molécula de ARN que se une a una proteína Cas (p. ej., la proteína Cas9) y dirige la proteína Cas a una ubicación específica dentro de un ADN diana. Los ARN guía pueden comprender dos segmentos: un “segmento dirigido al ADN” (también llamado “secuencia guía”) y un “segmento de unión a proteínas”. El “Segmento” incluye

una sección o región de una molécula, como un tramo contiguo de nucleótidos en un ARN. Algunos ARNg, tales como los de Cas9, pueden comprender dos moléculas de ARN separadas: un "ARN activador" (p. ej., ARNtracr) y un "ARN diana"(p. ej., CRISPR RNA o ARNcr). Otros ARNg son una sola molécula de ARN (un solo polinucleótido de ARN), que también puede denominarse "ARNg de una sola molécula", "ARN guía único" o "ARNsg". *Ver, p. ej.*, WO 2013/176772, WO 2014/065596, WO 2014/089290, WO 2014/093622, WO 2014/099750, WO 2013/142578 y WO 2014/131833, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Un ARN guía puede referirse a un ARN CRISPR (ARNcr) o a la combinación de un ARNcr y un ARN CRISPR transactivador (ARNtracr). El ARNcr y el ARNtracr pueden asociarse como una sola molécula de ARN (ARN guía único o ARNsg) o en dos moléculas de ARN separadas (ARN guía doble o ARNdg). Para Cas9, por ejemplo, un ARN guía único puede comprender un ARNcr fusionado con un ARNtracr (p. ej., a través de un enlazador). Para la Cpf1 y CasΦ, por ejemplo, solo se necesita un ARNcr para lograr la unión a una secuencia diana. Los términos "ARN guía" y "ARNg" incluyen los ARNg de molécula doble (es decir, modulares) y los ARNg de una sola molécula. En algunos de los métodos y composiciones descritos en la presente descripción, un ARNg es un ARNg Cas9 de *S. pyogenes* o un equivalente de este. En algunos de los métodos

y composiciones descritos en la presente descripción, un ARNg es un ARNg Cas9 de *S. aureus* o un equivalente de este.

Un ARNg de dos moléculas ilustrativas comprende una molécula similar a ARNcr ("ARN CRISPR" o "ARN diana" o "ARNcr" o "repetición de ARNcr") y una molécula similar a ARNtracr correspondiente ("ARN CRISPR transactivador" o "ANR activator" o "ANRtracr"). Un ARNcr comprende tanto el segmento dirigido al ADN (monocatenario) del ARNg como un tramo de nucleótidos que forma la mitad del dúplex de ARNbc del segmento de unión a proteínas del ARNg. Un ejemplo de una cola de ARNcr (por ejemplo, para usar con S. pyotenes Cas9) situada aguas abajo (3') del segmento de direccionamiento al ADN, comprende, consiste esencialmente en o consiste en GUUUUAGAGCUAUGCU (sec. con núm. de ident.: 16) o GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (sec. con núm. de ident.: 17). Cualquiera de los segmentos dirigidos al ADN descritos en la presente descripción puede unirse al extremo 5' de la sec. con núm. de ident.: 16 o 17 para formar un ARNcr.

Un ARNtracr (ARN activador) correspondiente comprende un tramo de nucleótidos que forma la otra mitad del dúplex de ARNbc del segmento de unión a proteínas del ARNg. Un tramo de nucleótidos de un ARNcr son complementarios e hibridan con un tramo de nucleótidos de un ARNtracr para formar el dúplex de ARNbc del dominio de unión a proteínas del ARNg. Como tal, puede decirse que cada ARNcr tiene un ARNtracr correspondiente. Los ejemplos

de secuencias de ARNtracr (p. ej., para usar con Cas9 de *S. pyogenes*) comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de cualquiera de AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUU (sec. con núm de ident.: 18), AAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 19) o GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (sec. con núm de ident.:20).

En los sistemas en los que se necesitan tanto un ARNcr como un ARNtracr, el ARNcr y el ARNtracr correspondiente se hibridan para formar un ARNg. En los sistemas en los que solo se necesita un ARNcr, el ARNcr puede ser el ARNg. El ARNcr proporciona adicionalmente el segmento que se dirige al ADN monocatenario que se hibrida con la hebra complementaria de un ADN diana. Si se usa para la modificación dentro de una célula, la secuencia exacta de una molécula de ARNcr o ARNtracr determinada puede diseñarse para que sea específica de la especie en la que se usarán las moléculas de ARN. *Ver, p. ej.*, Mali et al. (2013) *Science* 339(6121):823-826; Jinek et al. (2012) *Science* 337(6096):816-821; Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol* 31(3):227-229; Jiang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(3):233-239; y Cong et al. (2013) *Science* 339(6121):819-823, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

El segmento dirigido al ADN (ARNcr) de un ARNg dado comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia en la hebra complementaria del ADN diana, como se describe con más detalle a continuación. El segmento dirigido al ADN de un ARNg interactúa con el ADN diana de una manera específica de secuencia a través de la hibridación (es decir, emparejamiento de bases). Como tal, la secuencia de nucleótidos del segmento dirigido al ADN puede variar y determina la ubicación dentro del ADN diana con el que interactuarán el ARNg y el ADN diana. El segmento dirigido al ADN de un ARNg sujeto se puede modificar para hibridar con cualquier secuencia deseada dentro de un ADN diana. Los ARNcr que se producen naturalmente difieren según el sistema CRISPR/Cas y el organismo, pero frecuentemente contienen un segmento diana de entre 21 y 72 nucleótidos de longitud, flanqueado por dos repeticiones directas (DR, por sus siglas en inglés) de una longitud de entre 21 y 46 nucleótidos (*ver, p. ej.*, WO 2014/131833, incorporada en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos). En el caso de *S. pyogenes*, las DR tienen una longitud de 36 nucleótidos y el segmento diana tiene una longitud de 30 nucleótidos. La DR ubicada en 3' es complementaria e hibrida con el ARNtracr correspondiente, que a su vez se une a la proteína Cas.

El segmento dirigido al ADN puede tener, por ejemplo, una longitud de al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 17, al menos aproximadamente 18, al menos aproximadamente 19, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35 o al menos aproximadamente 40 nucleótidos. Tales segmentos dirigidos al ADN pueden tener, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 12 a aproximadamente 100, de aproximadamente 12 a aproximadamente 80, de aproximadamente 12 a aproximadamente 50, de aproximadamente 12 a aproximadamente 40, de aproximadamente 12 a aproximadamente 30, de aproximadamente 12 a aproximadamente 25 o de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 nucleótidos. Por ejemplo, el segmento de direccionamiento al ADN puede ser de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 17 a aproximadamente 20 nucleótidos, o aproximadamente 17, 18, 19 o 20 nucleótidos). *Ver, p. ej.*, US 2016/0024523, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Para la Cas9 de *S. pyogenes*, un segmento dirigido al ADN típico tiene una longitud de entre 16 y 20 nucleótidos o una longitud de entre 17 y 20 nucleótidos. Para la Cas9 de *S. aureus*, un segmento de dirigido al ADN típico tiene una longitud de entre 21 y 23 nucleótidos. Para la Cpf1, un segmento dirigido

al ADN típico tiene al menos una longitud de 16 nucleótidos o al menos una longitud de 18 nucleótidos.

En un ejemplo, el segmento dirigido al ADN puede tener una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos. Sin embargo, también pueden usarse secuencias más cortas y más largas para el segmento diana (p. ej., con una longitud de 15-25 nucleótidos, como con una longitud de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos). El grado de identidad entre el segmento dirigido al ADN y la correspondiente secuencia diana de ARN guía (o el grado de complementariedad entre el segmento dirigido al ADN y la otra hebra de la secuencia diana de ARN guía) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente el 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o 100 %. El segmento dirigido al ADN y la correspondiente secuencia diana de ARN guía pueden contener uno o más desajustes. Por ejemplo, el segmento dirigido al ADN del ARN guía y la correspondiente secuencia diana del ARN guía pueden contener 1-4, 1-3, 1-2, 1, 2, 3 o 4 discrepancias (p. ej., donde la longitud total de la secuencia diana del ARN guía es de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 o más nucleótidos). Por ejemplo, el segmento dirigido al ADN del ARN guía y la correspondiente secuencia diana del ARN guía pueden contener 1-4, 1-3, 1-2, 1, 2, 3 o 4 discrepancias donde la longitud total de la secuencia diana del ARN guía es de 20 nucleótidos.

Como ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* human puede comprender un segmento dirigido al ADN (es decir, una secuencia guía) que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido a ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al

menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consta esencialmente de o que consta de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms de ident.: 30-61. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms de ident.: 30-61.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* human puede comprender un segmento dirigido

al ADN (es decir, una secuencia guía) que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido a ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al

ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consta esencialmente de o que consta de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms de ident.: 36, 30, 33, y 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en una cualquiera de las sec. con núms de ident.: 36, 30, 33, y 41.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN (es decir, una secuencia guía) que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en

la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento

al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consta esencialmente de o que consta de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 36.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN (es decir, una secuencia guía) que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de al menos 17, al

menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen

ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consta esencialmente de o que consta de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 30.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN (es decir, una secuencia guía) que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido a ADN que es al menos 75 %, al menos

80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido a ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consta esencialmente de o que consta de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33. Alternativamente, un ARN guía

dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 33.

Como ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN (es decir, una secuencia guía) que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido a ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido a ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 90 %

o al menos 95 % idéntico a la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento de direccionamiento al ADN que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento de direccionamiento al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consta esencialmente de o que consta de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia (segmento dirigido al ADN) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 41. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen ALB humano puede comprender un segmento dirigido al ADN que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20

nucleótidos contiguos de la secuencia (segmento dirigido al ADN) establecida en la sec. con núm. de ident.: 41.

Tabla 2. Secuencias de guía del intrón 1 ALB humano

Secuencia de guía	**Sec. con núm. de ident.:**
GAGCAACCUCACUCUUGUCU	30
AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	31
UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	32
AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	33
GAUCAACAGCACAGGUUUUG	34
UUAAAUAAAGCAUAGUGCAA	35
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	36
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	37
UACUAAAACUUUAUUUUACU	38
AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	39
AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	40
UAAUAAAAUUCAAACAUCCU	41
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUU	42
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	43
UGUAUUUGUGAAGUCUUACA	44
UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	45
UAAUUUUCUUUUGCGCACUA	46
UGACUGAAACUUCACAGAAU	47
GACUGAAACUUCACAGAAUA	48
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	49
AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	50
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	51
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	52
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	53
UUACUAAAACUUUAUUUUAC	54
ACCUUUUUUUUUUUUUACCU	55
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	56
UGAUUCCUACAGAAAAACUC	57
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	58
CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	59
ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	60
UGAGCAACCUCACUCUUGUC	61

Tabla 3. Secuencias de ARNsg del intrón 1 *ALB* humano

Secuencia completa	**Secuencia completa modificada**
GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUU (sec. con núm. de ident.: 62)	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 94)
AUGCAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 63)	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 95)
UGCAUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 64)	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 96)
AUUUAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 65)	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 97)
GAUCAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 66)	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 98)
UUAAAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 67)	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 99)
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 68)	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 100)
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 69)	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 101)
UACUAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 70)	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 102)
AAAGUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 71)	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 103)
AAUGCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 72)	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm

Secuencia completa	Secuencia completa modificada
	GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 104)
UAAUAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 73)	mU*mA*mA*UAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 105)
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 74)	mG*mC*mA*UCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 106)
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 75)	mU*mU*mU*GGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 107)
UGUAUUUGUGAAGUCUUACAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 76)	mU*mG*mU*AUUUGUGAAGUCUUACAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 108)
UCCUAGGUAAAAAAAAAAAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 77)	mU*mC*mC*UAGGUAAAAAAAAAAAAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 109)
UAAUUUUCUUUUGCGCACUAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 78)	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCGCACUAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 110)
UGACUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 79)	mU*mG*mA*CUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 111)
GACUGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 80)	mG*mA*mC*UGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 112)
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 81)	mU*mU*mC*AUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 113)
AUUAUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 82)	mA*mU*mU*AUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 114)
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 83)	mA*mA*mU*UUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 115)
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA	mU*mG*mA*AUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU

Secuencia completa	**Secuencia completa modificada**
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 84)	AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 116)
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 85)	mA*mU*mC*AUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 117)
UUACUAAAACUUUAUUUUACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 86)	mU*mU*mA*CUAAAACUUUAUUUUACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 118)
ACCUUUUUUUUUUUUUACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 87)	mA*mC*mC*UUUUUUUUUUUUUACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 119)
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 88)	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 120)
UGAUUCCUACAGAAAAACUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 89)	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAACUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 121)
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 90)	mU*mG*mG*GCAAGGGAAGAAAAAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 122)
CCUCACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 91)	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 123)
ACCUCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 92)	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 124)
UGAGCAACCUCACUCUUGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (sec. con núm. de ident.: 93)	mU*mG*mA*GCAACCUCACUCUUGUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 125)

Tabla 4. Secuencias de guía del intrón 1 del ratón *Alb*

Secuencia de guía	**Sec. con núm. de ident.:**
CACUCUUGUCUGUGGAAACA	164

Tabla 5. Secuencias de ARNsg del intrón 1 del ratón *Alb*

Secuencia completa	**Secuencia completa modificada**
CACUCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUU (sec. con núm. de ident.: 166)	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 167)

Los ARNtracr pueden estar en cualquier forma (p. ej., ARNtracr completos o ARNtracr parciales activos) y de diferentes longitudes. Pueden incluir transcripciones primarias o formas procesadas. Por ejemplo, los ARNtracr (como parte de un ARN guía único o como una molécula separada como parte de un ARNg de dos moléculas) pueden comprender, constar esencialmente de o constar de la totalidad o una parte de una secuencia de ARNtracr de tipo salvaje (p. ej., aproximadamente o más de aproximadamente 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 o más nucleótidos de una secuencia de ARNtracr de tipo salvaje). Los ejemplos de secuencias de ARNtracr de tipo salvaje de *S. pyogenes* incluyen versiones de 171 nucleótidos, 89 nucleótidos, 75 nucleótidos y 65 nucleótidos. *Ver, p. ej.* Deltcheva et al. (2011) *Nature* 471(7340):602-607; WO 2014/093661, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Los ejemplos de ARNtracr dentro de los ARN guía único (ARNsg) incluyen los segmentos de ARNtracr que se encuentran en las versiones +48, +54, +67 y +85 de los ARNsg, donde "+n" indica que hasta

el nucleótido n+ del ARNtracr de tipo salvaje se incluye en el ARNsg. VéaseUS 8.697.359, incorporado en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

El porcentaje de complementariedad entre el segmento dirigido al ADN del ARN guía y la hebra complementaria del ADN diana puede ser de al menos 60 % (p. ej., al menos el 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 %). El porcentaje de complementariedad entre el segmento dirigido al ADN y la hebra complementaria del ADN diana puede ser de al menos 60 % sobre aproximadamente 20 nucleótidos contiguos. Como un ejemplo, el porcentaje de complementariedad entre el segmento dirigido al ADN y la hebra complementaria del ADN diana puede ser de 100 % sobre los 14 nucleótidos contiguos en el extremo 5' de la hebra complementaria del ADN diana y tan bajo como del 0 % sobre el resto. En tal caso, se puede considerar que el segmento de direccionamiento al ADN tiene una longitud de 14 nucleótidos. Como otro ejemplo, el porcentaje de complementariedad entre el segmento dirigido al ADN y la hebra complementaria del ADN diana puede ser de 100 % sobre los siete nucleótidos contiguos en el extremo 5' de la hebra complementaria del ADN diana y tan bajo como del 0 % sobre el resto. En tal caso, puede considerarse que el segmento de direccionamiento al ADN tiene una longitud de 7 nucleótidos. En algunos ARN guía, al menos 17 nucleótidos dentro del segmento dirigido al ADN son complementarios a la

hebra complementaria del ADN diana. Por ejemplo, el segmento dirigido al ADN puede tener una longitud de 20 nucleótidos y puede comprender 1, 2 o 3 discrepancias con la hebra complementaria del ADN diana. En un ejemplo, las discrepancias no son adyacentes a la región de la hebra complementaria correspondiente a la secuencia del motivo adyacente de protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) (es decir, el complemento inverso de la secuencia de PAM) (p. ej., las discrepancias se encuentran en el extremo 5' del segmento dirigido al ADN del ARN guía, o las discrepancias son al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 pares de bases de distancia de la región de la hebra complementaria correspondiente a la secuencia PAM).

El segmento de unión a proteínas de un ARNg puede comprender dos tramos de nucleótidos que son complementarios entre sí. Los nucleótidos complementarios del segmento de unión a proteínas se hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc). El segmento de unión a proteínas de un ARNg sujeto interactúa con una proteína Cas, y el ARNg dirige la proteína Cas unida a una secuencia de nucleótidos específica dentro del ADN diana a través del segmento dirigido al ADN.

Los ARN guía único pueden comprender un segmento dirigido al ADN y una secuencia de andamiaje (es decir, la secuencia de unión a proteína o de unión a Cas del ARN guía). Por ejemplo, dichos ARN guía pueden tener un segmento

dirigido al ADN en 5’ unido a una secuencia de andamiaje en 3’. Las secuencias de andamios ilustrativas (p. ej., para uso con Cas9 de *S. pyogenes*) comprenden, constan esencialmente de o constan de:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCU (versión 1; sec. con núm. de ident.: 21);

GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (versión 2; sec. con núm. de ident.: 22);

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGC (versión 3; sec. con núm. de ident.: 23); y

GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (versión 4; sec. con núm. de ident.: 24);

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (versión 5; sec. con núm. de ident.: 25);

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (versión 6; sec. con núm. de ident.: 26);

GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU (versión 7; sec. con núm. de ident.: 27); o

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACC

GAGUCGGUGC (versión 8; sec. con núm de ident.: 28). En algunos sgRNA guía, no se encuentran presentes los cuatro residuos U terminales de la versión 6. En algunos sgRNA, solo se encuentran presentes 1, 2 o 3 de los cuatro residuos U terminales de la versión 6. Los ARN guía dirigidos a cualquiera de las secuencias diana del ARN guía descritas en la presente descripción pueden incluir, por ejemplo, un segmento dirigido al ADN en el extremo 5' del ARN guía fusionado con cualquiera de las secuencias de andamiaje del ARN guía ilustrativas en el extremo 3' del ARN guía. Es decir, cualquiera de los segmentos dirigidos al ADN descritos en la presente descripción puede unirse al extremo 5' de cualquiera de las secuencias de andamiaje anteriores para formar un ARN guía único (ARN guía quimérico).

Los ARN guía pueden incluir modificaciones o secuencias que proporcionan características deseables adicionales (p. ej., estabilidad modificada o regulada; focalización subcelular; seguimiento con una etiqueta fluorescente; un sitio de unión para una proteína o un complejo proteico; y lo similar). Es decir, los ARN guía pueden incluir uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, o uno o más componentes o configuraciones que se producen naturalmente o no, que se usan en lugar o además de los residuos canónicos A, G, C y U o además de ellos. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen, por ejemplo, una caperuza de 5' (p. ej., una caperuza de 7-metilguanilato

(m7G)); una cola poliadenilada 3’ (es decir, una cola poli(A) 3’); una secuencia de riboconmutador (p. ej., para permitir la estabilidad regulada y/o la accesibilidad regulada por proteínas y/o complejos de proteínas); una secuencia de control de estabilidad; una secuencia que forma un dúplex de ARNbc (es decir, una horquilla); una modificación o secuencia que dirige el ARN a una ubicación subcelular (p. ej., núcleo, mitocondrias, cloroplastos y lo similar); una modificación o secuencia que proporciona seguimiento (p. ej., conjugación directa con una molécula fluorescente, conjugación con una porción que facilita la detección fluorescente, una secuencia que permite la detección fluorescente, etc.); una modificación o secuencia que proporciona un sitio de unión para proteínas (p. ej., proteínas que actúan sobre el ADN, incluidos activadores transcripcionales, represores transcripcionales, ADN metiltransferasas, ADN desmetilasas, histona acetiltransferasas, histona desacetilasas y lo similar); y combinaciones de estos. Otros ejemplos de modificaciones incluyen estructuras dúplex de tallo-bucle diseñadas, regiones protuberantes diseñadas, horquillas 3’ diseñadas de la estructura dúplex de tallo-bucle o cualquier combinación de estas. *Ver, p. ej.*, US 2015/0376586, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Una protuberancia puede ser una región desparejada de nucleótidos dentro del dúplex formado por la región similar a ARNcr y la región mínima

similar a ARNtracr. Una protuberancia puede comprender, en un lado del dúplex, un 5′-XXXY-3′ desparejado donde X es cualquier purina e Y puede ser un nucleótido que puede formar un par oscilante con un nucleótido en la hebra opuesta y una región de nucleótidos desparejada del otro lado del dúplex.

Los ARN guía pueden comprender nucleósidos modificados y nucleótidos modificados que incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes: (1) alteración o sustitución de uno o ambos de los oxígenos de fosfato no enlazantes y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato enlazantes en el enlace de la estructura fosfodiéster (modificación de la estructura ilustrativa); (2) alteración o sustitución de un constituyente del azúcar ribosa tal como la alteración o el reemplazo del hidroxilo 2′ en el azúcar ribosa (modificación del azúcar ilustrativa); (3) sustitución (p. ej., sustitución completa) de la porción de fosfato con enlaces defosfo (modificación de la estructura ilustrativa); (4) modificación o sustitución de una nucleobase que se produce naturalmente, incluso con una nucleobase no canónica (una modificación de base ilustrativa); (5) sustitución o modificación de la estructura de ribosa-fosfato (modificación de la estructura ilustrativa); (6) modificación del extremo 3′ o 5′ del oligonucleótido (p. ej., eliminación, modificación o sustitución de un grupo fosfato terminal o conjugación de una porción, caperuza o enlace (tales modificaciones de la

caperuza 3’ o 5’ pueden comprender una modificación de azúcar y/o estructura); y (7) modificación o sustitución del azúcar (modificación del azúcar ilustrativa). Otras posibles modificaciones del ARN guía incluyen modificaciones o sustitución de tractos de uracilo o poliuracilo. Ver, por ejemplo, los documentos WO 2015/048577 y US 2016/0237455, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los fines. Se pueden hacer modificaciones similares a los ácidos nucleicos que codifican Cas, tales como los ARNm de Cas. Por ejemplo, los ARNm de Cas pueden modificarse mediante el agotamiento de la uridina usando codones sinónimos.

Las modificaciones químicas tales como las enumeradas anteriormente pueden combinarse para proporcionar ARNg y/o ARNm modificados que comprenden residuos (nucleósidos y nucleótidos) que pueden tener dos, tres, cuatro o más modificaciones. Por ejemplo, un residuo modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase modificada. En un ejemplo, se modifica cada base de un ARNg (p. ej., todas las bases tienen un grupo fosfato modificado, tal como un grupo fosforotioato). Por ejemplo, todos o sustancialmente todos los grupos fosfato de un ARNg pueden sustituirse con grupos fosforotioato. Alternativa o adicionalmente, un ARNg modificado puede comprender al menos un residuo modificado en o cerca del extremo 5’. Como alternativa o adicionalmente, un ARNg

modificado puede comprender al menos un residuo modificado en o cerca del extremo 3'.

Algunos ARNg comprenden uno, dos, tres o más residuos modificados. Por ejemplo, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de las posiciones en un ARNg modificado pueden ser nucleósidos o nucleótidos modificados.

Los ácidos nucleicos no modificados pueden ser propensos a la degradación. Los ácidos nucleicos exógenos también pueden inducir una respuesta inmunitaria innata. Las modificaciones pueden ayudar a introducir estabilidad y reducir la inmunogenicidad. Algunos ARNg descritos en la presente descripción pueden contener uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados para introducir estabilidad frente a nucleasas intracelulares o basadas en suero. Algunos ARNg modificados descritos en la presente descripción pueden mostrar una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introducen en una población de células.

Los ARNg descritos en la presente descripción pueden comprender una modificación de la estructura en la que el grupo fosfato de un residuo modificado puede modificarse reemplazando uno o más de los oxígenos con un sustituyente diferente. La modificación puede incluir la

sustitución total de una porción de fosfato no modificada con un grupo de fosfato modificado como se describe en la presente descripción. Las modificaciones de la estructura de la estructura de fosfato también pueden incluir alteraciones que dan como resultado un enlazador sin carga o un enlazador cargado con una distribución de carga asimétrica.

Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, hidrógeno fosfonatos, fosforoamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, la sustitución de uno de los oxígenos que no forman puentes con uno de los átomos o grupos de átomos anteriores puede hacer que el átomo de fósforo sea quiral. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer la configuración “R” (Rp) o la configuración “S” (Sp). La estructura también puede modificarse sustituyendo un oxígeno puente (es decir, el oxígeno que une el fosfato al nucleósido), con nitrógeno (fosforoamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metilenfosfonatos puenteados). La sustitución puede ocurrir en el enlace de oxígeno o en ambos enlaces de oxígeno.

El grupo fosfato puede sustituirse por conectores que no contienen fósforo en ciertas modificaciones de la estructura. En algunas modalidades, el grupo fosfato cargado puede sustituirse por una porción neutra. Los ejemplos de

porciones que pueden reemplazar el grupo fosfato pueden incluir, sin limitación, p. ej., fosfonato de metilo, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilenoximetilimino.

También se pueden construir andamiajes que pueden imitar a los ácidos nucleicos en donde el enlazador de fosfato y el azúcar de ribosa se sustituyen por sustitutos de nucleósidos o nucleótidos resistentes a nucleasas. Tales modificaciones pueden comprender modificaciones de la estructura y del azúcar. En algunas modalidades, las nucleobases pueden unirse mediante una estructura sustituta. Los ejemplos pueden incluir, sin limitación, los sustitutos de nucleósidos de morfolino, ciclobutilo, pirrolidina y ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés).

Los nucleósidos modificados y los nucleótidos modificados pueden incluir una o más modificaciones al grupo azúcar (una modificación de azúcar). Por ejemplo, el grupo hidroxilo 2’ (OH) puede modificarse (p. ej., sustituirse con varios sustituyentes oxi o desoxi diferentes). Las modificaciones al grupo hidroxilo 2’ pueden mejorar la estabilidad del ácido nucleico ya que el hidroxilo ya no puede desprotonarse para formar un ion alcóxido 2’.

Los ejemplos de modificaciones del grupo hidroxilo en 2’ pueden incluir alcoxi o ariloxi (OR, en donde “R” puede ser, p. ej., alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o un azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ en donde R puede ser, p. ej., H o alquilo opcionalmente sustituido, y n puede ser un número entero de 0 a 20 (p. ej., de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, del 1 al 8, del 1 al 10, del 1 al 16, del 1 al 20, del 2 al 4, del 2 al 8, del 2 al 10, del 2 al 16, del 2 al 20, del 4 al 8, de 4 a 10, de 4 a 16 y de 4 a 20). La modificación del grupo hidroxilo 2’ puede ser 2’-O-Me. De la misma manera, la modificación del grupo hidroxilo 2’ puede ser una modificación 2’-fluoro, que sustituye el grupo hidroxilo 2’ con un fluoruro. La modificación del grupo hidroxilo 2’ puede incluir ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés) en los que el hidroxilo 2' se puede conectar, p. ej., mediante un C_{1-6} alquileno o C_{1-6} puente de heteroalquileno, al carbono 4’ del mismo azúcar ribosa, donde los puentes ilustrativos pueden incluir puentes de metileno, propileno, éter o amino; O-amino (en donde amino puede ser, p. ej., NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina o poliamino) y aminoalcoxi, $O(CH_2)_n$-amino, (en donde amino puede ser, p. ej., NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o

diheteroarilamino, etilendiamina o poliamino). La modificación del grupo hidroxilo 2' puede incluir ácidos nucleicos desbloqueados (UNA, por sus siglas en inglés) en los que el anillo de ribosa carece de la unión C2'-C3'. La modificación del grupo hidroxilo 2' puede incluir el grupo metoxietilo (MOE), ($OCH_2CH_2OCH_3$, p. ej., un derivado de PEG).

Las modificaciones desoxi 2' pueden incluir hidrógeno (es decir, azúcares de desoxirribosa, p. ej., en las porciones sobresalientes de parcialmente ARNbc); halo (p. ej., bromo, cloro, flúor o yodo); amino (en donde amino puede ser, p. ej., NH2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$- amino (en donde amino puede ser, p. ej., como se describe en la presente descripción), -NHC(O)R (en donde R puede ser, p. ej., alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos, p. ej., con un amino como se describe en la presente descripción.

La modificación de azúcar puede comprender un grupo de azúcar que también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, un ácido nucleico modificado puede incluir nucleótidos que contienen, p. ej., arabinosa, como el

azúcar. Los ácidos nucleicos modificados también pueden incluir azúcares abásicos. Estos azúcares abásicos también pueden modificarse adicionalmente en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes. Los ácidos nucleicos modificados también pueden incluir uno o más azúcares que se encuentran en forma de L (p. ej., L-nucleósidos).

Los nucleósidos modificados y los nucleótidos modificados descritos en la presente descripción, que se pueden incorporar en un ácido nucleico modificado, pueden incluir una base modificada, también denominada nucleobase. Los ejemplos de nucleobases incluyen, pero no se limitan a, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U). Estas nucleobases pueden modificarse o sustituirse por completo para proporcionar residuos modificados que pueden incorporarse en ácidos nucleicos modificados. La nucleobase del nucleótido puede seleccionarse independientemente de una purina, una pirimidina, un análogo de purina o un análogo de pirimidina. En algunas modalidades, la nucleobase puede incluir, p. ej., derivados de una base sintéticos y que se producen naturalmente.

En un ARN guía dual, cada uno de los ARNcr y ARNtracr puede contener modificaciones. Tales modificaciones pueden estar en uno o ambos extremos del ARNcr y/o ARNtracr. En un ARNsg, uno o más residuos en uno o ambos extremos del ARNsg pueden modificarse químicamente y/o los nucleósidos internos pueden modificarse y/o todo

el ARNsg puede modificarse químicamente. Algunos ARNg comprenden una modificación del extremo 5′. Algunos ARNg comprenden una modificación del extremo 3′.

Los ARN guía descritos en la presente descripción pueden comprender uno de los patrones de modificación descritos en WO 2018/107028 A1, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Los ARN guía descritos en la presente descripción también pueden comprender una de las estructuras/patrones de modificación descritos en el documento US 2017/0114334, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Los ARN guía descritos en la presente descripción también pueden comprender una de las estructuras/patrones de modificación descritos en los documentos WO 2017/136794, WO 2017/004279, US 2018/0187186 o US 2019/0048338, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los fines.

Como un ejemplo, los nucleótidos en el extremo 5′ o 3′ de un ARN guía pueden incluir enlaces de fosforotioato (p. ej., las bases pueden tener un grupo fosfato modificado que es un grupo fosforotioato). Por ejemplo, un ARN guía puede incluir enlaces de fosforotioato entre los 2, 3 o 4 nucleótidos terminales en el extremo 5′ o 3′ del ARN guía. Como otro ejemplo, los nucleótidos en el extremo 5′ y/o 3′

de un ARN guía pueden tener modificaciones 2'-O-metilo. Por ejemplo, un ARN guía puede incluir modificaciones 2'-O-metilo en los 2, 3 o 4 nucleótidos terminales en el extremo 5' y/o 3' del ARN guía (p. ej., el extremo 5'). *Ver, p. ej.*, WO 2017/173054 A1 and Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Otras modificaciones posibles se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción. En un ejemplo específico, un ARN guía incluye análogos de 2'-O-metilo y enlaces internucleotídicos de fosforotioato 3' en los primeros tres residuos de ARN terminales 5' y 3'. Tales modificaciones químicas pueden, por ejemplo, proporcionar una mayor estabilidad y protección contra las exonucleasas para guiar a los ARN, lo que les permite persistir dentro de las células durante más tiempo que los ARN guía no modificados. Tales modificaciones químicas también pueden, por ejemplo, proteger contra las respuestas inmunitarias intracelulares innatas que pueden degradar activamente el ARN o desencadenar cascadas inmunitarias que conducen a la muerte celular.

Como un ejemplo, cualquiera de los ARN guía descritos en la presente descripción puede comprender al menos una modificación. En un ejemplo, la al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me), un enlace de fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F) o

una combinación de estos. Por ejemplo, la al menos una modificación puede comprender un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me). Alternativa o adicionalmente, la al menos una modificación puede comprender una unión de fosforotioato (PS) entre nucleótidos. Alternativa o adicionalmente, la al menos una modificación puede comprender un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F). En un ejemplo, un ARN guía descrito en la presente descripción comprende uno o más nucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-O-Me) y una o más uniones de fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte del ARN guía. Como un ejemplo, el ARN guía comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía, el ARN guía comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos del extremo 3' del el ARN guía, o una combinación de estos. Por ejemplo, el ARN guía puede comprender uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos del ARN guía, uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos del ARN guía, o una combinación de estos. Como alternativa o adicionalmente, el ARN guía puede comprender nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía, puede comprender nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, o una combinación de estos.

En un ejemplo, un ARNg modificado puede comprender la secuencia siguiente: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (sec. con núm. de ident.: 29), donde "N" puede ser cualquier nucleótido natural o no-natural. Por ejemplo, la totalidad de los residuos de N comprenden un segmento dirigido al ADN del intrón 1 *ALB* humano como se describe en la presente descripción (p. ej., la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.:29, en donde los residuos N se reemplazan con el segmento dirigido al ADN de cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, el segmento dirigido al ADN de cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33 y 41, o el segmento dirigido al ADN de la sec. con núm. de ident.: 36. Por ejemplo, un ARNg modificado puede comprender la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 94-125, la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 100, 94, 97 y 105, o la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 100 en la **Tabla 3**. Los términos "mA", "mC", "mU" y "mG" denotan un nucleótido (A, C, U y G, respectivamente) que ha sido modificado con 2'-O-Me. El símbolo "*" representa una modificación de fosforotioato. En ciertas modalidades, A, C, G, U y N denotan independientemente un azúcar de ribosa, es decir, 2'-OH. En ciertas modalidades en el contexto de una secuencia

modificada, A, C, G, U y N indican un azúcar ribosa, es decir, 2'-OH. Un enlace o unión de fosforotioato se refiere a una unión en la que un azufre se sustituye por un oxígeno fosfato no puente en un enlace fosfodiéster, por ejemplo, en las uniones entre bases de nucleótidos. Cuando se usan fosforotioatos para generar oligonucleótidos, los oligonucleótidos modificados también pueden denominarse S-oligos. Los términos A*, C*, U* o G* denotan un nucleótido que se une al siguiente nucleótido (p. ej., 3') con una unión de fosforotioato. Los términos "mA*", "mC*", "mU*" y "mG*" denotan un nucleótido (A, C, U y G, respectivamente) que ha sido sustituido por 2'-O-Me y que se une al siguiente nucleótido (p. ej., 3') con una unión de fosforotioato.

Otra modificación química que se ha demostrado que influye en los anillos de azúcar de nucleótidos es la sustitución de halógeno. Por ejemplo, la sustitución de 2'-fluoro (2'-F) en los anillos de azúcar de nucleótidos puede aumentar la afinidad de unión de oligonucleótidos y la estabilidad de la nucleasa. Los nucleótidos abásicos se refieren a aquellos que carecen de bases nitrogenadas. Las bases invertidas se refieren a aquellas con enlaces que se encuentran invertidos del enlace normal de 5' a 3' (es decir, un enlace de 5' a 5' o un enlace de 3' a 3').

Un nucleótido abásico puede unirse con un enlace invertido. Por ejemplo, un nucleótido abásico puede unirse al nucleótido 5' terminal a través de un enlace 5' a 5', o

puede unirse un nucleótido abásico al nucleótido 3' terminal a través de un enlace 3' a 3'. Un nucleótido abásico invertido en el nucleótido terminal 5' o 3' también puede denominarse caperuza terminal abásica inversa.

En un ejemplo, se modifican uno o más de los primeros tres, cuatro o cinco nucleótidos en el extremo 5' y uno o más de los últimos tres, cuatro o cinco nucleótidos en el extremo 3'. La modificación puede ser, por ejemplo, un 2'-O-Me, 2'-F, nucleótido abásico inverso, unión de fosforotioato u otra modificación de nucleótido bien conocida para aumentar la estabilidad y/o el rendimiento.

En otro ejemplo, los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' y los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' pueden unirse con enlaces de fosforotioato.

En otro ejemplo, los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' y los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' pueden comprender un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me). En otro ejemplo, los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' y los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' comprenden un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F). En otro ejemplo, los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' y los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' comprenden un nucleótido abásico inverso.

Los ARN guía pueden proporcionarse en cualquier forma. Por ejemplo, el ARNg puede proporcionarse en la forma de ARN, ya sea como dos moléculas (ARNcr y ARNtracr

separados) o como una molécula (ARNsg), y opcionalmente en la forma de un complejo con una proteína Cas. El ARNg también puede proporcionarse en la forma de ADN que codifica el ARNg. El ADN que codifica el ARNg puede codificar una sola molécula de ARN (ARNsg) o moléculas de ARN separadas (p. ej., ARNcr y ARNtracr separados). En el último caso, el ADN que codifica el ARNg puede proporcionarse como una molécula de ADN o como moléculas de ADN separadas que codifican el ARNcr y el ARNtracr, respectivamente.

Cuando se proporciona un ARNg en la forma de ADN, el ARNg puede expresarse transitoria, condicional o constitutivamente en la célula. Los ADN que codifican los ARNg pueden integrarse establemente en el genoma de la célula y unirse operativamente a un promotor activo en la célula. Alternativamente, los ADN que codifican los ARNg pueden unirse operativamente a un promotor en un constructo de expresión. Por ejemplo, el ADN que codifica el ARNg puede estar en un vector que comprende un ácido nucleico heterólogo, como un ácido nucleico que codifica una proteína Cas. Alternativamente, puede estar en un vector o un plásmido que se encuentre separado del vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas. Los promotores que pueden usarse en un constructo de expresión incluyen promotores activos, por ejemplo, en una o más de una célula eucariota, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de mamífero no

humano, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula pluripotente, una célula madre embrionaria (ES), una célula madre adulta, una célula progenitora de desarrollo restringido, una célula madre pluripotente inducida (iPS) o un embrión en etapa unicelular. Tales promotores pueden ser, por ejemplo, promotores condicionales, promotores inducibles, promotores constitutivos o promotores específicos de tejido. Tales promotores también pueden ser, por ejemplo, promotores bidireccionales. Los ejemplos específicos de promotores adecuados incluyen un promotor de ARN polimerasa III, tal como un promotor U6 humano, un promotor de U6 polimerasa III de rata o un promotor de U6 polimerasa III de ratón.

Alternativamente, los ARNg pueden prepararse mediante diversos otros métodos. Por ejemplo, los ARNg pueden prepararse mediante transcripción *in vitro* usando, por ejemplo, ARN polimerasa T7 (*ver, p. ej.*, WO 2014/089290 y WO 2014/065596, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos). Los ARN guía también pueden ser una molécula producida sintéticamente preparada por síntesis química. Por ejemplo, un ARN guía puede sintetizarse químicamente para incluir análogos de 2'-O-metilo y enlaces internucleotídicos de fosforotioato 3' en los tres primeros residuos de ARN terminales 5' y 3'.

Los ARN guía (o los ácidos nucleicos que codifican los ARN guía) pueden estar en composiciones que comprenden uno o más ARN guía (p. ej., 1, 2, 3, 4 o más ARN guía) y un transportador que aumenta la estabilidad del ARN guía (p. ej., prolonga el período en determinadas condiciones de almacenamiento (p. ej., -20 °C, 4 °C o temperatura ambiente) por el cual los productos de degradación permanecen por debajo de un umbral, como por debajo del 0,5 % en peso del ácido nucleico o la proteína de partida; o aumentando la estabilidad in vivo). Los ejemplos no limitantes de tales vehículos incluyen microesferas de poli(ácido láctico) (PLA, por sus siglas en inglés), microesferas poli(D,L-láctico-coglicólico-ácido) (PLGA, por sus siglas en inglés), liposomas, micelas, micelas inversas, cocleatos de lípidos y microtúbulos de lípidos. Tales composiciones pueden comprender además una proteína Cas, tal como una proteína Cas9, o un ácido nucleico que codifica una proteína Cas.

Como un ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 62-125. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento dirigido al ADN establecido en cualquiera de las sec. con

núms. de ident.: 62-125. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento dirigido a ADN establecido en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 62-125. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 62-125.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento dirigido al ADN establecido en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento dirigido a ADN establecido en cualquiera de las sec. con núms. de

ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia que difiere en no más que 3, no más que 2 o no más que 1 nucleótido de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 68 o 100. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico al segmento dirigido a ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 68 o 100. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento de direccionamiento al ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 68 o 100. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que difiere en no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleótido de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 62 o 94. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir una secuencia que es al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico al segmento dirigido a ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 62 o 94. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento de direccionamiento al ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 62 o 94. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que difiere en no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleótido de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 62 o 94.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 65 o 97. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos el 75 %, al menos el 80 %, al

menos el 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico al segmento de direccionamiento al ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 65 o 97. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento de direccionamiento al ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 65 o 97. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que difiere en no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleótido de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 65 o 97.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, constar esencialmente de o constar de la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 73 o 105. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntico al segmento de direccionamiento al ADN establecido en la sec. con núm. de ident.: 73 o 105. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica al segmento de direccionamiento al ADN expuesto en la sec. con núm. de

ident.: 73 o 105. Alternativamente, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia que difiere en no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleótido de la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 73 o 105.

(4) Secuencias diana del ARN guía

Los ADN diana para los ARN guía incluyen secuencias de ácido nucleico presentes en un ADN al que se unirá un segmento dirigido al ADN de un ARNg, siempre que existan las condiciones suficientes para la unión. Las condiciones de unión de ADN/ARN adecuadas incluyen condiciones fisiológicas normalmente presentes en una célula. En la técnica se conocen otras condiciones de unión de ADN/ARN adecuadas (p. ej., condiciones en un sistema libre de células) (*ver, p. ej.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001), incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos). La hebra del ADN diana que es complementaria y se hibrida con el ARNg puede denominarse “hebra complementaria” y la hebra del ADN diana que es complementaria a la “hebra complementaria” (y por lo tanto no es complementaria a la proteína Cas o ARNg) puede denominarse “hebra no complementaria” o “hebra plantilla”.

El ADN diana incluye tanto la secuencia de la hebra complementaria con la que se hibrida el ARN guía como la secuencia correspondiente de la hebra no complementaria (p. ej., adyacente al motivo adyacente de protoespaciador (PAM)). El término “secuencia diana del ARN guía” como se usa en la presente descripción se refiere específicamente a la secuencia en la hebra no complementaria correspondiente a (es decir, el complemento inverso de) la secuencia con la que se hibrida el ARN guía en la hebra complementaria. Es decir, la secuencia diana del ARN guía se refiere a la secuencia en la hebra no complementaria adyacente al PAM (p. ej., corriente arriba o 5’ del PAM en el caso de Cas9). Una secuencia diana del ARN guía es equivalente al segmento dirigido al ADN de un ARN guía, pero con timinas en lugar de uracilos. Como un ejemplo, una secuencia diana del ARN guía para una enzima SpCas9 puede referirse a la secuencia corriente arriba del 5’-NGG-3’ PAM en la hebra no complementaria. Un ARN guía se encuentra diseñado para tener complementariedad con la hebra complementaria de un ADN diana, donde la hibridación entre el segmento dirigido al ADN del ARN guía y la hebra complementaria del ADN diana promueve la formación de un complejo CRISPR. No se requiere necesariamente la complementariedad completa, siempre que haya suficiente complementariedad para hacer la hibridación y promover la formación de un complejo CRISPR. Si en la presente descripción se hace referencia a un ARN guía como

dirigido a una secuencia diana del ARN guía, lo que significa es que el ARN guía se hibrida con la secuencia de la hebra complementaria del ADN diana que es el complemento inverso de la secuencia diana del ARN guía en la secuencia de la hebra no complementaria.

Una secuencia diana del ADN diana o de ARN guía puede comprender cualquier polinucleótido y puede localizarse, por ejemplo, en el núcleo o citoplasma de una célula o dentro de un orgánulo de una célula, tal como una mitocondria o un cloroplasto. Una secuencia diana del ADN diana o ARN guía puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico endógena o exógena a una célula. La secuencia diana del ARN guía puede ser una secuencia que codifica un producto génico (p. ej., una proteína) o una secuencia no codificante (p. ej., una secuencia reguladora) o puede incluir ambas.

La unión específica del sitio y la escisión de un ADN diana por una proteína Cas pueden ocurrir en ubicaciones determinadas por (i) la complementariedad de emparejamiento de bases entre el ARN guía y la hebra complementaria del ADN diana y (ii) un motivo corto, denominado el motivo adyacente protoespaciador (PAM), en la hebra no complementaria del ADN diana. El PAM puede flanquear la secuencia diana del ARN guía. Opcionalmente, la secuencia diana del ARN guía puede estar flanqueada en el extremo 3’ por el PAM (p. ej., para la Cas9). Alternativamente, la secuencia diana del ARN guía puede estar flanqueada en el extremo 5’ por el PAM (p. ej.,

para la Cpf1). Por ejemplo, el sitio de escisión de las proteínas Cas puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 pares de bases (p. ej., 3 pares de bases) corriente arriba o corriente abajo de la secuencia PAM (p. ej., dentro de la secuencia diana del ARN guía). En el caso de SpCas9, la secuencia PAM (es decir, en la hebra no complementaria) puede ser 5'-N_1GG-3', donde N_1 es cualquier nucleótido de ADN, y donde el PAM se encuentra inmediatamente en 3' de la secuencia diana del ARN guía en la hebra no complementaria del ADN diana. Como tal, la secuencia correspondiente al PAM en la cadena complementaria (es decir, el complemento inverso) sería 5'-CCN_2-3', donde N_2 es cualquier nucleótido de ADN y está inmediatamente 5' de la secuencia a la que el segmento dirigido al DNA del ARN guía se hibrida en la cadena complementaria del ADN objetivo. En algunos de estos casos, N_1 y N_2 pueden ser complementarios y el par de bases N_1- N_2 puede ser cualquier par de bases (p. ej., N_1=C y N_2=G; N_1=G y N_2=C; N_1=A y N_2=T; o N_1=T y N_2=A). En el caso de Cas9 de *S. aureus*, el PAM puede ser NNGRRT o NNGRR, donde N puede ser A, G, C o T, y R puede ser G o A. En el caso de Cas9 de *C. jejuni*, el PAM puede ser, por ejemplo, NNNNACAC o NNNNRYAC, donde N puede ser A, G, C o T, y R puede ser G o A. En algunos casos (p. ej., para la FnCpf1), la secuencia PAM puede estar corriente arriba del extremo 5' y tener la secuencia 5'-TTN-3'. En el caso de DpbCasX, el PAM puede

tener la secuencia 5'-TTCN-3'. En el caso de CasΦ, el PAM puede tener la secuencia 5'-TBN-3', en donde B es G, T o C.

Un ejemplo de una secuencia diana de ARN guía es una secuencia del ADN de 20 nucleótidos que precede inmediatamente a un motivo NGG reconocido por una proteína SpCas9. Por ejemplo, dos ejemplos de secuencias objetivo del ARN guía más el PAM son $GN_{19}NGG$ (sec. con núm. de ident.: 5) o $N_{20}NGG$ (sec. con núm. de ident.: 6). *Ver, p. ej.*, WO 2014/165825, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. La guanina en el extremo 5' puede facilitar la transcripción mediante la ARN polimerasa en células. Otros ejemplos de secuencias diana del ARN guía más los PAM pueden incluir dos nucleótidos de guanina en el extremo 5' (p. ej., $GGN_{20}NGG$; sec. con núm. de ident.: 7) para facilitar la transcripción eficiente mediante la polimerasa T7 *in vitro*. *Ver, p. ej.*, WO 2014/065596, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Otras secuencias diana del ARN guía más los PAM pueden tener entre 4-22 nucleótidos de longitud de las sec. con núms. de ident.: 5-7, incluyendo el 5' G o GG y el 3' GG o NGG. Sin embargo, otras secuencias diana del ARN guía más los PAM pueden tener entre 14 y 20 nucleótidos de longitud de las sec. con núms. de ident.: 5-7.

La formación de un complejo CRISPR hibridado con un ADN diana puede resultar en la escisión de una o ambas

hebras del ADN diana dentro o cerca de la región correspondiente a la secuencia diana del ARN guía (es decir, la secuencia diana del ARN guía en la hebra no complementaria del ADN diana y el complemento inverso en la hebra complementaria con la que se hibrida el ARN guía). Por ejemplo, el sitio de escisión puede estar dentro de la secuencia diana del ARN guía (p. ej., en una ubicación definida relativa a la secuencia PAM). El "sitio de escisión" incluye la posición de un ADN diana en el que una proteína Cas produce una rotura de una sola hebra o una rotura de doble hebra. El sitio de escisión puede estar en una sola hebra (p. ej., cuando se usa una nickasa) o en ambas hebras de un ADN de doble hebra. Los sitios de escisión pueden estar en la misma posición en ambas hebras (produciendo extremos romos; p. ej. Cas9)) o puede estar en diferentes sitios en cada hebra (produciendo extremos escalonados (es decir, salientes); por ejemplo, Cpf1). Los extremos escalonados pueden producirse, por ejemplo, usando dos proteínas Cas, cada una de las cuales produce una rotura de una sola hebra en un sitio de escisión diferente en una hebra diferente, produciendo de esta manera una rotura de doble hebra. Por ejemplo, una primera nickasa puede crear una rotura de una sola hebra en la primera hebra del ADN de doble hebra (ADNds) y una segunda nickasa puede crear una rotura de una sola hebra en la segunda hebra del ADNds de modo que se creen secuencias salientes. En algunos casos, la secuencia diana

del ARN guía o el sitio de escisión de la nickasa en la primera hebra se encuentran separados de la secuencia diana del ARN guía o el sitio de escisión de la nickasa en la segunda hebra por al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 pares de bases.

La secuencia diana del ARN guía también puede seleccionarse para minimizar la modificación no deseada o evitar efectos no deseados (p. ej., evitando dos o menos discrepancias con las secuencias genómicas no deseadas).

Como ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a la secuencia diana del ARN guía establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 126-157. Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia diana del ARN guía establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 126-157.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a la secuencia diana del ARN guía establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 132, 126, 129, y 137. Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia diana del ARN guía establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 132, 126, 129, y 137.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a la secuencia diana del ARN guía expuesta en la sec. con núm. de ident.: 132. Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia diana del ARN guía expuesta en la sec. con núm. de ident.: 132.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a la secuencia diana del ARN guía expuesta en la sec. con núm. de ident.: 126. Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia diana del ARN guía expuesta en la sec. con núm. de ident.: 126.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a la secuencia diana del ARN guía expuesta en la sec. con núm. de ident.: 129. Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia diana del ARN guía expuesta en la sec. con núm. de ident.: 129.

Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a la secuencia diana

del ARN guía establecida en la sec. con núm. de ident.: 137. Como otro ejemplo, un ARN guía dirigido al intrón 1 de un gen *ALB* humano puede dirigirse a al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia diana del ARN guía establecida en la sec. con núm. de ident.: 137.

Tabla 6. Secuencias diana del ARN guía del intrón 1 *ALB* humano

Secuencia diana de ARN guía	**Sec. con núm. de ident.:**
GAGCAACCTCACTCTTGTCT	126
ATGCATTTGTTTCAAAATAT	127
TGCATTTGTTTCAAAATATT	128
ATTTATGAGATCAACAGCAC	129
GATCAACAGCACAGGTTTTG	130
TTAAATAAAGCATAGTGCAA	131
TAAAGCATAGTGCAATGGAT	132
TAGTGCAATGGATAGGTCTT	133
TACTAAAACTTTATTTTACT	134
AAAGTTGAACAATAGAAAAA	135
AATGCATAATCTAAGTCAAA	136
TAATAAAATTCAAACATCCT	137
GCATCTTTAAAGAATTATTT	138
TTTGGCATTTATTTCTAAAA	139
TGTATTTGTGAAGTCTTACA	140
TCCTAGGTAAAAAAAAAAAA	141
TAATTTTCTTTTGCGCACTA	142
TGACTGAAACTTCACAGAAT	143
GACTGAAACTTCACAGAATA	144
TTCATTTTAGTCTGTCTTCT	145
ATTATCTAAGTTTGAATATA	146
AATTTTTAAAATAGTATTCT	147
TGAATTATTCTTCTGTTTAA	148
ATCATCCTGAGTTTTTCTGT	149

Secuencia diana de ARN guía	Sec. con núm. de ident.:
TTACTAAAACTTTATTTTAC	150
ACCTTTTTTTTTTTTTACCT	151
AGTGCAATGGATAGGTCTTT	152
TGATTCCTACAGAAAAACTC	153
TGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	154
CCTCACTCTTGTCTGGGCAA	155
ACCTCACTCTTGTCTGGGCA	156
TGAGCAACCTCACTCTTGTC	157

Tabla 7. Secuencias diana del ARN guía del intrón 1 *Alb* de ratón

Secuencia diana de ARN guía	Sec. con núm. de ident.:
CACTCTTGTCTGTGGAAACA	165

(5) Nanopartículas lipídicas que comprenden agentes de nucleasa

También se proporcionan nanopartículas lipídicas que comprenden los agentes de nucleasa (p. ej., los sistemas CRISPR/Cas). Las nanopartículas lipídicas pueden comprender alternativa o adicionalmente un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) como se describe en la presenta descripción. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden comprender un agente de nucleasa (p. ej., un sistema CRISPR/Cas), pueden comprender un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) o pueden comprender tanto

un agente de nucleasa (p. ej., un sistema CRISPR/Cas) y un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio). Con respecto a los sistemas CRISPR/Cas, las nanopartículas lipídicas pueden comprender la proteína Cas en cualquier forma (p. ej., proteína, ADN o ARNm) y/o pueden comprender los ARN guía en cualquier forma (p. ej., ADN o ARN). En un ejemplo, las nanopartículas lipídicas comprenden la proteína Cas en la forma de ARNm (p. ej., un ARN modificado como se describe en la presente descripción) y los ARN guía en la forma de ARN (p. ej., un ARN guía modificado como se describe en la presente descripción). Como otro ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden comprender la proteína Cas en la forma de proteína y los ARN guía en la forma de ARN). En un ejemplo específico, el ARN guía y la proteína Cas se introducen cada uno en la forma de ARN a través del suministro mediado por LNP en el mismo LNP. Como se analiza con más detalle en otra parte de la presente descripción, se pueden modificar uno o más de los ARN. Por ejemplo, los ARN guía pueden modificarse para que comprendan una o más modificaciones del extremo estabilizador en el extremo 5′ y/o el extremo 3′. Tales modificaciones pueden incluir, por ejemplo, uno o más enlaces de fosforotioato en el extremo 5′ y/o el extremo 3′ y/o una o más modificaciones 2′-O-metilo en el extremo 5′ y/o el extremo 3′. Como otro ejemplo, las modificaciones del ARNm de Cas pueden incluir la sustitución

con pseudouridina (p. ej., sustitución completa con pseudouridina), caperuzas 5' y poliadenilación. Como otro ejemplo, las modificaciones del ARNm de Cas pueden incluir la sustitución con N1-metil-pseudouridina (p. ej., totalmente sustituido con N1-metil-pseudouridina), caperuzas 5' y poliadenilación. También se contemplan otras modificaciones como se describe en otra parte de la presente descripción. El suministro a través de tales métodos puede dar como resultado una expresión transitoria de Cas y/o una presencia transitoria del ARN guía, y los lípidos biodegradables mejoran la eliminación, mejoran la tolerabilidad y disminuyen la inmunogenicidad. Las formulaciones de lípidos pueden proteger las moléculas biológicas de la degradación al tiempo que mejoran su absorción celular. Las nanopartículas lipídicas son partículas que comprenden una pluralidad de moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí por fuerzas intermoleculares. Estas incluyen microesferas (incluidas vesículas unilaminares y multilaminares, p. ej., liposomas), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión. Tales nanopartículas lipídicas pueden usarse 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 los lípidos neutros (es decir, lípidos sin carga o zwitteriónicos), lípidos aniónicos, lípidos

auxiliares que mejoran la transfección y lípidos ocultos que aumentan el tiempo durante el cual pueden existir las nanopartículas *in vivo*. Se pueden encontrar ejemplos de lípidos catiónicos, lípidos neutros, lípidos aniónicos, lípidos auxiliares y lípidos sigilosos adecuados en WO 2016/010840 A1 y WO 2017/173054 A1, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Una nanopartícula lipídica ilustrativa puede comprender un lípido catiónico y uno o más de otros componentes. En un ejemplo, el otro componente puede comprender un lípido auxiliar tal como el colesterol. En otro ejemplo, los otros componentes pueden comprender un lípido auxiliar tal como el colesterol y un lípido neutro tal como la diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC). En otro ejemplo, los otros componentes pueden comprender un lípido auxiliar como el colesterol, un lípido neutro opcional como DSPC y un lípido oculto como S010, S024, S027, S031 o S033.

La LNP puede contener uno o más o todos los siguientes: (i) un lípido para la encapsulación y para el escape endosómico; (ii) un lípido neutro para la estabilización; (iii) un lípido auxiliar para la estabilización; y (iv) un lípido sigiloso. *Ver, p. ej.*, Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235 y WO 2017/173054 A1, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los

propósitos. En ciertas LNP, la carga puede incluir un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía. En ciertas LNP, la carga puede incluir un ARNm que codifica una nucleasa Cas, como Cas9, y un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía. En ciertas LNP, la carga puede incluir un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) como se describe en otra parte de la presente descripción. En ciertas LNP, la carga puede incluir un ARNm que codifica una nucleasa Cas, como Cas9, un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía, y un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio). En algunos LNP, el componente lipídico comprende un lípido de amina tal como un lípido ionizable biodegradable. En algunos casos, el componente lipídico comprende lípidos biodegradables, ionizables, colesterol, DSPC y PEG-DMG. Por ejemplo, ARNm y ARNg de Cas9 pueden suministrarse a células y animales usando formulaciones de lípidos que comprenden lípidos ionizables ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo) (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienoato), colesterol, DSPC y PEG2k-DMG.

En algunos ejemplos, los LNP comprenden lípidos catiónicos. En algunos ejemplos, los LNP comprenden (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo octadeca-9,12-dienoato, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienoato) u otro lípido ionizable. *Véase, p. ej.,* WO 2019/067992, WO 2017/173054, WO 2015/095340 y WO 2014/136086, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. En algunos ejemplos, los LNP comprenden relaciones molares de una amina lipídica catiónica a fosfato de ARN (N:P) de aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0 o aproximadamente 6,5. En algunos ejemplos, los términos catiónico e ionizable en el contexto de los lípidos LNP son intercambiables (p. ej., en donde los lípidos ionizables son catiónicos según el pH).

El lípido para la encapsulación y el escape endosómico puede ser un lípido catiónico. El lípido también puede ser un lípido biodegradable, tal como un lípido ionizable biodegradable. Un ejemplo de un lípido adecuado es el Lípido A o LP01, que es (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, también

denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. *Ver, p. ej.*, Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235 y WO 2017/173054 A1, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Otro ejemplo de un lípido adecuado es el Lípido B, que es ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil)bis(decanoato), también denominado ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil)bis(decanoato). Otro ejemplo de un lípido adecuado es el Lípido C, que es 2-((4-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)hexadecanoil)oxi)propano-1,3-diil(9Z,9'Z, 12Z,12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoato). Otro ejemplo de un lípido adecuado es el Lípido D, que es 3-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)-13-(octanoiloxi)tridecilo 3-octilundecanoato. Otros lípidos adecuados incluyen heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimetilamino)butanoate (también conocido como [(6*Z*,9*Z*,28*Z*,31*Z*)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il] 4-(dimetilamino)butanoato o Dlin-MC3-DMA (MC3))).

Algunos de tales lípidos adecuados para su uso en los LNP descritos en la presente descripción son biodegradables. *in vivo*.

Tales lípidos pueden ser ionizables según el pH del medio en el que se encuentren. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, los lípidos pueden protonarse y por lo tanto tener una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, tal como por ejemplo la sangre, cuyo pH es de aproximadamente 7,35, los lípidos pueden no estar protonados y por lo tanto no tener carga. En algunas modalidades, los lípidos pueden protonarse a un pH de al menos aproximadamente 9, 9,5 o 10. La capacidad de tal lípido para soportar una carga se relaciona con su pKa intrínseco. Por ejemplo, el lípido puede, independientemente, tener un pKa en el rango de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2.

Los lípidos neutros funcionan para estabilizar y mejorar el procesamiento de los LNP. Los ejemplos de lípidos neutros adecuados incluyen una variedad de lípidos neutros, sin carga o zwitteriónicos. Los ejemplos de fosfolípidos neutros adecuados para usar en la presente descripción incluyen, entre otros, 5-heptadecilbenceno-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-

palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC)), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn -glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (SOPC), y combinaciones de estos. Por ejemplo, el fosfolípido neutro puede seleccionarse del grupo que consiste en diestearoilfosfatidilcolina (DSPC, por sus siglas en inglés) y dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE, por sus siglas en inglés).

Los lípidos auxiliares incluyen lípidos que mejoran la transfección. El mecanismo por el cual el lípido auxiliar mejora la transfección puede incluir mejorar la estabilidad de las partículas. En ciertos casos, el lípido auxiliar puede mejorar la fusogenicidad de la membrana. Los lípidos auxiliares incluyen esteroides, esteroles y alquilresorcinoles. Los ejemplos de lípidos auxiliares adecuados incluyen colesterol, 5-heptadecilresorcinol y

hemisuccinato de colesterol. En un ejemplo, el lípido auxiliar puede ser colesterol o hemisuccinato de colesterol.

Los lípidos sigilosos incluyen lípidos que alteran el tiempo que las nanopartículas pueden existir in vivo. Los lípidos sigilosos pueden ayudar en el proceso de formulación, por ejemplo, reduciendo la agregación de partículas y controlando el tamaño de las partículas. Los lípidos sigilosos pueden modular las propiedades farmacocinéticas del LNP. Los lípidos sigilosos adecuados incluyen lípidos que tienen un grupo principal hidrofílico unido a una porción lipídica.

El grupo principal hidrófilo del lípido sigiloso puede comprender, por ejemplo, una porción de polímero seleccionado de polímeros a base de PEG (a veces denominado poli(óxido de etileno)), poli(oxazolina), poli(alcohol vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos y poli N-(2-hidroxipropil)metacrilamida. El término PEG significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de éter de polialquileno. En ciertas formulaciones de LNP, el PEG es un PEG-2K, también denominado PEG 2000, que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 daltons. *Ver, p. ej.*, WO 2017/173054 A1, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

La porción lipídica del lípido sigiloso puede derivar, por ejemplo, de diacilglicerol o diacilglicamida,

incluidos aquellos que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tiene una longitud de cadena de alquilo que comprende independientemente de aproximadamente C4 a aproximadamente C40 átomos de carbono saturados o insaturados, en donde la cadena puede comprender uno o más grupos funcionales como, por ejemplo, una amida o un éster. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos.

Como un ejemplo, el lípido sigiloso puede seleccionarse de PEG-dilauroilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSPE), PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicerina y PEG-diestearoilglicamida, PEG-colesterol (l-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol)éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DMPE), o 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metilpolioxietilenglicol-2000 (PEG2k-DMG), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileno glicol)-2000] (PEG2k-DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG2k-DSG), poli(etilenglicol)-2000-dimetacrilato (PEG2k-DMA) y 1,2- diestеariloxipropil-3-amina-N-

[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSA). En un ejemplo particular, el lípido sigiloso puede ser PEG2k-DMG.

En algunas modalidades, el lípido PEG incluye un grupo glicerol. En algunas modalidades, el lípido PEG incluye un grupo dimiristoilglicerol (DMG). En algunas modalidades, el lípido PEG comprende PEG2k. En algunas modalidades, el lípido PEG es un PEG-DMG. En algunas modalidades, el lípido PEG es un PEG2k-DMG. En algunas modalidades, el lípido PEG es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000. En algunas modalidades, el PEG2k-DMG es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000.

Los LNP pueden comprender diferentes relaciones molares respectivas de los lípidos componentes en la formulación. El % mol del lípido CCD puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 60 % mol. El % mol del lípido auxiliar puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 30 % mol a aproximadamente 60 % mol. El % mol del lípido neutro puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente 20 % mol. El % mol del lípido sigiloso puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 % mol a aproximadamente 10 % mol

Los LNP pueden tener diferentes proporciones entre los grupos amina cargados positivamente del lípido biodegradable (N) y los grupos fosfato cargados negativamente (P) del ácido nucleico a encapsular. Esto puede representarse matemáticamente mediante la ecuación

N/P. Por ejemplo, la relación N/P puede ser de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100. La relación N/P también puede ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

En algunos LNP, la carga puede comprender ARNm de Cas (p. ej., ARNm de Cas9) y ARNg. El ARNm de Cas y los ARNg pueden estar en diferentes proporciones. Por ejemplo, la formulación de LNP puede incluir una proporción de ARNm de Cas a ácido nucleico de ARNg que varía entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:25. Alternativamente, la formulación de LNP puede incluir una relación de ARNm de Cas a ácido nucleico de ARNg de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2. En ejemplos específicos, la proporción de Cas ARNm a ARNg puede ser de aproximadamente 2:1.

En algunos LNP, la carga puede comprender un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) y ARNg. El constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) y los ARNg pueden estar en diferentes proporciones. Por ejemplo, la formulación de LNP puede incluir una proporción de constructo de ácido nucleico a ácido nucleico de ARNg que varía entre aproximadamente 25:1 y aproximadamente 1:25.

Un ejemplo específico de un LNP adecuado tiene una proporción de nitrógeno a fosfato (N/P) de aproximadamente 4,5 y contiene lípidos catiónicos

biodegradables, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de aproximadamente 45:44:9:2 (aproximadamente 45:aproximadamente 44:aproximadamente 9:aproximadamente 2). El lípido catiónico biodegradable puede ser (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propiloctadeca -9,12-dienoato, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. *Ver, p. ej.*, Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235, incorporado en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción en peso de aproximadamente 1:1 (aproximadamente 1:aproximadamente 1) con respecto al ARN guía. Otro ejemplo específico de un LNP adecuado contiene Dlin-MC3-DMA (MC3), colesterol, DSPC y PEG-DMG en una relación molar de aproximadamente 50:38,5:10:1,5 (aproximadamente 50:aproximadamente 38,5:aproximadamente 10:aproximadamente 1,5). El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 1:2 (aproximadamente 1:aproximadamente 2) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 1:1 (aproximadamente 1:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción

de aproximadamente 2:1 (aproximadamente 2:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía.

Un ejemplo específico de un LNP adecuado tiene una proporción de nitrógeno a fosfato (N/P) de aproximadamente 6 y contiene lípidos catiónicos biodegradables, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de aproximadamente 50:38:9:3 (aproximadamente 50:aproximadamente 38:aproximadamente 9:aproximadamente 3). El lípido catiónico biodegradable puede ser el Lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propiloctadeca -9,12-dienoato, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. El ARNm de Cas9 puede estar en una relación de aproximadamente 1:2 (aproximadamente 1:aproximadamente 2) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una relación de aproximadamente 1:1 (aproximadamente 1:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 2:1 (aproximadamente 2:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía.

Otro ejemplo específico de un LNP adecuado tiene una proporción de nitrógeno a fosfato (N/P) de aproximadamente 3 y contiene un lípido catiónico, un lípido estructural, colesterol (p. ej., colesterol (ovino) (Avanti

700000)) y PEG2k-DMG (p. ej., PEG-DMG 2000 (NOF America-SUNBRIGHT® GM-020(DMG-PEG)) en una proporción de aproximadamente 50:10:38,5:1,5 (aproximadamente 50:aproximadamente 10:aproximadamente 38,5:aproximadamente 1,5) o una proporción de aproximadamente 47:10:42:1 (aproximadamente 47:aproximadamente 10:aproximadamente 42:aproximadamente 1). El lípido estructural puede ser, por ejemplo, DSPC (p. ej., DSPC (Avanti 850365)), SOPC, DOPC o DOPE. El lípido catiónico/ionizable puede ser, por ejemplo, Dlin-MC3-DMA (p. ej., Dlin-MC3-DMA (Biofine International)). El ARNm de Cas9 puede estar en una relación de aproximadamente 1:2 (aproximadamente 1:aproximadamente 2) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 1:1 (aproximadamente 1:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 2:1 (aproximadamente 2:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía.

Otro ejemplo específico de un LNP adecuado contiene Dlin-MC3-DMA, DSPC, colesterol y un lípido PEG en una proporción de aproximadamente 45:9:44:2 (aproximadamente 45:aproximadamente 9:aproximadamente 44:aproximadamente 2). Otro ejemplo específico de un LNP adecuado contiene Dlin-MC3-DMA, DOPE, colesterol y PEG lípido o PEG DMG en una proporción de aproximadamente 50:10:39:1 (aproximadamente 50:aproximadamente 10:aproximadamente 39:aproximadamente 1).

Otro ejemplo específico de un LNP adecuado tiene Dlin-MC3-DMA, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG en una proporción de aproximadamente 55:10:32,5:2,5 (aproximadamente 55:aproximadamente 10:aproximadamente 32,5:aproximadamente 2,5). Otro ejemplo específico de un LNP adecuado tiene Dlin-MC3-DMA, DSPC, colesterol y PEG-DMG en una proporción de aproximadamente 50:10:38,5:1,5 (aproximadamente 50:aproximadamente 10:aproximadamente 38,5:aproximadamente 1,5). Otro ejemplo específico de un LNP adecuado tiene Dlin-MC3-DMA, DSPC, colesterol y PEG-DMG en una proporción de aproximadamente 50:10:38,5:1,5 (aproximadamente 50:aproximadamente 10:aproximadamente 38,5:aproximadamente 1,5). El ARNm de Cas9 puede estar en una relación de aproximadamente 1:2 (aproximadamente 1:aproximadamente 2) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 1:1 (aproximadamente 1:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía. El ARNm de Cas9 puede estar en una proporción de aproximadamente 2:1 (aproximadamente 2:aproximadamente 1) en peso con respecto al ARN guía.

Otros ejemplos de LNP adecuados se pueden encontrar, p. ej., en WO 2019/067992, WO 2020/082042, US 2020/0270617, WO 2020/082041, US 2020/0268906, WO 2020/082046 (*ver, p. ej.*, págs. 85-86), y EE. UU. 2020/0289628, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

(6) Vectores que comprenden agentes de nucleasa

Los agentes de nucleasa descritos en la presente descripción (p. ej., ZFN, TALEN o CRISPR/Cas) pueden proporcionarse en un vector para la expresión. Un vector puede comprender secuencias adicionales como, por ejemplo, los orígenes de replicación, promotores y genes que codifican la resistencia a antibióticos.

Algunos vectores pueden ser circulares. Alternativamente, el vector puede ser lineal. El vector puede empaquetarse para suministrarse a través de una nanopartícula lipídica, un liposoma, una nanopartícula no lipídica o una cápside viral. Los vectores ilustrativos no limitantes incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales, minicromosomas, transposones, vectores virales y vectores de expresión.

La introducción de ácidos nucleicos también puede lograrse mediante el suministro mediado por virus, tal como el suministro mediado por AAV o el suministro mediado por lentivirus. Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores virales tales como los vectores de virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés). El AAV puede ser cualquier serotipo adecuado y puede ser un AAV monocatenario (ssAAV) o un AAV autocomplementario (scAAV). Otros virus/vectores virales ilustrativos incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, vaccinia virus, poxvirus y virus del herpes simple. Los virus pueden infectar células en división, células que no se

dividen o tanto células en división como células que no se dividen. Los virus pueden integrarse en el genoma del huésped o, alternativamente, no integrarse en el genoma del huésped. Dichos virus también pueden diseñarse para tener una inmunidad reducida. Los virus pueden ser competentes para la replicación o pueden ser defectuosos en la replicación (p. ej., defectuosos en uno o más genes necesarios para rondas adicionales de replicación y/o empaquetamiento del virión). El vector viral puede modificarse genéticamente a partir de sus contrapartes silvestre. Por ejemplo, el vector viral puede comprender una inserción, deleción o sustitución de uno o más nucleótidos para facilitar la clonación o de tal manera que cambie una o más propiedades del vector. Dichas propiedades pueden incluir la capacidad de empaquetamiento, eficiencia de transducción, inmunogenicidad, integración del genoma, replicación, transcripción y traducción. En algunos ejemplos, se puede delecionar una parte del genoma viral de manera que el virus sea capaz de empaquetar secuencias exógenas que tengan un tamaño mayor. En algunos ejemplos, el vector viral puede tener una mejor eficiencia de transducción. En algunos ejemplos, puede reducirse la respuesta inmunitaria inducida por el virus en un huésped. En algunos ejemplos, los genes virales (como la integrasa) que promueven la integración de la secuencia viral en el genoma del huésped pueden mutar de tal manera que el virus no se integre. En algunos ejemplos, el vector viral puede

tener una replicación defectuosa. En algunos ejemplos, el vector viral puede comprender secuencias de control transcripcionales o traduccionales exógenas para estimular la expresión de secuencias codificantes en el vector. En algunos ejemplos, el virus puede depender del auxiliar. Por ejemplo, el virus puede necesitar uno o más virus auxiliares para suministrar los componentes virales (como las proteínas virales) necesarios para amplificar y empaquetar los vectores en partículas virales. En tal caso, uno o más componentes auxiliares, incluidos uno o más vectores que codifican los componentes virales, pueden introducirse en una célula huésped o población de células huésped junto con el sistema de vectores descrito en la presente descripción. En otros ejemplos, el virus puede no necesitar auxiliares. Por ejemplo, el virus puede ser capaz de amplificar y empaquetar los vectores sin un virus auxiliar. En algunos ejemplos, el sistema de vectores descrito en la presente descripción también puede codificar los componentes virales necesarios para la amplificación y el empaquetamiento del virus.

Los títulos virales ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{16} vg/ml. Otros títulos virales ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{16} vg/kg del peso corporal.

Los virus adenoasociados (AAV) son endémicos en múltiples especies, incluidos los primates humanos y no

humanos (NHP, por sus siglas en inglés). Hasta la fecha se han aislado y caracterizado al menos 12 serotipos naturales y cientos de variantes naturales. *Ver, p. ej.*, Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Las partículas de AAV se componen naturalmente por una cápside de proteína icosaédrica sin envoltura que contiene un genoma de ADN monocatenario (ssDNA). El genoma de ADN se encuentra flanqueado por dos repeticiones terminales inversas (ITR, por sus siglas en inglés) que sirven como los orígenes virales de replicación y señales de empaquetamiento. El gen *rep* codifica cuatro proteínas requeridas para la replicación y el empaquetamiento viral, mientras que el gen *cap* codifica las tres subunidades estructurales de la cápside que dictan el serotipo AAV y la proteína activadora del ensamblaje (AAP, por sus siglas en inglés) que promueve el ensamblaje del virión en algunos serotipos.

El AAV recombinante (rAAV, por sus siglas en inglés) es actualmente uno de los vectores virales más comúnmente usados en la terapia génica para tratar enfermedades humanas mediante la entrega de transgenes terapéuticos dirigidos a las células diana *in vivo*. De hecho, los vectores de rAAV se componen de cápsides icosaédricas similares a los AAV naturales, pero los viriones de rAAV no encapsidan las secuencias de

codificación de proteínas AAV o de replicación de AAV. Estos vectores virales no se replican. Las únicas secuencias virales requeridas en los vectores rAAV son las dos ITR, que son necesarias para guiar la replicación y el empaquetamiento del genoma durante la fabricación del vector rAAV. Los genomas rAAV se encuentran desprovistos de genes *rep* y *cap* de AAV, haciéndolos no replicantes *in vivo*. Los vectores rAAV se producen al expresar los genes *rep* y *cap* junto con las proteínas auxiliares virales adicionales *in trans*, en combinación con el casete transgénico deseado flanqueado por las ITR de AAV.

En los genomas terapéuticos de rAAV, se coloca un casete de expresión génica entre las secuencias de ITR. Generalmente, los casetes del genoma de rAAV constan de un promotor para estimular la expresión de un transgén terapéutico, seguido de una secuencia de poliadenilación. Las ITR que flanquean un casete de expresión de rAAV generalmente se derivan de AAV2, el primer serotipo que se aisló y convirtió en un vector viral recombinante. Desde entonces, la mayoría de los métodos de producción de rAAV dependen de los sistemas de empaque basados en AAV2 *Reps*. *Ver, p. ej.*, Colella et al. (2017) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 8:87-104, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Algunos ejemplos no limitantes de ITR que se pueden usar incluyen ITR que comprenden, consisten

esencialmente en o consisten en la sec. con núm. de ident.: 158, sec. con núm. de ident.: 159 o sec. con núm. de ident.: 160. Otros ejemplos de ITR comprenden una o más mutaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.: 158, sec. con núm. de ident.: 159 o sec. con núm. de ident.: 160 y pueden ser al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a la sec. con núm. de ident.: 158, sec. con núm. de ident.: 159 o sec. con núm. de ident.: 160. En algunos genomas de rAAV descritos en la presente descripción, el ácido nucleico que codifica el agente nucleasa (o componente del mismo) está flanqueado en ambos lados por la misma ITR (es decir, la ITR en el extremo 5' y el complemento inverso de la ITR en el extremo 3', tal como la sec. con núm. de ident.: 158 en el extremo 5' y la sec. con núm. de ident.: 168 en el extremo 3', o la sec. con núm. de ident.: 159 en el extremo 5' y la sec. con núm. de ident.: 710 en el extremo 3', o la sec. con núm. de ident.: 160 en el extremo 5' y la sec. con núm. de ident.: 711 en el extremo 3'). En un ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 158 (es decir, la sec. con núm. de ident.: 158 en el extremo 5' y el complemento inverso en el extremo 3'). En otro ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la

sec. con núm. de ident.: 159 (es decir, la sec. con núm. de ident.: 159 en el extremo 5' y el complemento inverso en el extremo 3'). En un ejemplo, la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en el extremo 5' comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en el extremo 3' comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 160 (es decir, la sec. con núm. de ident.: 160 en el extremo 5' y el complemento inverso en el extremo 3'). En un ejemplo, la ITR en cada extremo puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la sec. con núm. de ident.: 160. En otros genomas de rAAV descritos en la presente descripción, el ácido nucleico que codifica el agente de nucleasa (o componente de este) se encuentra flanqueado por diferentes ITR en cada extremo. En un ejemplo, la ITR en un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 158, y la ITR en el otro extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 159. En otro ejemplo, la ITR en un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 158, y la ITR en el otro extremo comprende, consiste esencialmente en o

consiste en la sec. con núm. de ident.: 160. En un ejemplo, la ITR en un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 159, y la ITR en el otro extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

El serotipo específico de un vector de AAV recombinante influye en su tropismo *in vivo* a tejidos específicos. Las proteínas de la cápside de AAV son responsables de mediar la unión y la entrada en las células diana, seguidas del escape endosomal y el tráfico hacia el núcleo. Por lo tanto, la elección del serotipo al desarrollar un vector rAAV influirá en qué tipos de células y tejidos es más probable que el vector se una y transduzca cuando se inyecta *in vivo*. Varios serotipos de rAAV, incluido el rAAV8, son capaces de transducir el hígado cuando se suministran sistémicamente en ratones, NHP y humanos. *Ver, p. ej.*, Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Una vez en el núcleo, el genoma de ssDNA se libera del virión y se sintetiza una cadena de ADN complementaria para generar una molécula de ADN bicatenario (dsDNA). Los genomas de AAV bicatenarios se circularizan naturalmente a través de sus ITR y se convierten en episomas que persistirán extracromosómicamente en el núcleo. Por lo tanto, para los programas de terapia génica episomal, los

episomas de rAAV suministrados por rAAV proporcionan una expresión génica estimulada por promotores a largo plazo en células que no se dividen. Sin embargo, este ADN episomal suministrado por rAAV se diluye a medida que las células se dividen. Por el contrario, la terapia génica descrita en la presente descripción se basa en la inserción de genes para permitir la expresión génica a largo plazo.

Cuando los rAAV específicos que comprenden secuencias específicas (p. ej., secuencias constructivas bidireccionales específicas o secuencias constructivas unidireccionales específicas) se describen en la presente descripción, se pretende que abarquen la secuencia descrita o el complemento inverso de la secuencia. Por ejemplo, si un constructo bidireccional o unidireccional descrita en la presente descripción consiste en la secuencia hipotética 5'-CTGGACCGA-3', también pretende abarcar el complemento inverso de esa secuencia (5'-TCGGTCCAG-3'). De la misma manera, cuando los rAAV que comprenden elementos constructivos bidireccionales o unidireccionales en un orden específico de 5' a 3' se describen en la presente descripción, también pretenden abarcar el complemento inverso del orden de esos elementos. Por ejemplo, si se describe en la presente descripción un rAAV que comprende un constructo bidireccional que comprende de 5' a 3' un primer aceptor de empalme, una primera secuencia de codificación, un primer terminador, un complemento inverso de un segundo terminador, un complemento

inverso de una segunda secuencia codificante y un complemento inverso de un segundo aceptor de empalme, también pretende abarcar un constructo que comprende de 5’ a 3’ el segundo aceptor de empalme, la segunda secuencia codificante, el segundo terminador, un complemento inverso del primer terminador, un complemento inverso de la primera secuencia codificante y un complemento inverso del primer aceptor de empalme. Los genomas de AAV monocatenarios se empaquetan como sentido (cadena positiva) o antisentido (genomas de cadena negativa), y los genomas de AAV monocatenarios de polaridad + y − se empaquetan con la misma frecuencia en viriones de rAAV maduros. *Ver, p. ej.*, LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499 y Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

El genoma de ssDNA AAV consta de dos marcos de lectura abiertos, Rep y Cap, flanqueados por dos repeticiones terminales inversas que permiten la síntesis de la cadena de ADN complementaria. Al construir un plásmido de transferencia AAV, el transgén se coloca entre los dos ITR y se pueden suministrar Rep y Cap *in 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 se pueden

transfectar en células HEK293 que contienen el gen E1+ del adenovirus para producir partículas AAV infecciosas. Alternativamente, el Rep, el Cap y los genes auxiliares adenovirus pueden combinarse en un solo plásmido. Se pueden usar células y métodos de empaquetamiento similares para otros virus, tales como los retrovirus.

Se han identificado múltiples serotipos de AAV. Estos serotipos difieren en los tipos de células que infectan (es decir, su tropismo), lo que permite la transducción preferencial de tipos de células específicos. El término AAV incluye, por ejemplo, el AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 e híbridos de estos, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV de primates, AAV de no primates y AAV ovino. Las secuencias genómicas de varios serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales nativas (TR, por sus siglas en inglés), las proteínas Rep y las subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Tales secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas como GenBank. Un "vector AAV" como se usa en la presente descripción se refiere a un vector AAV que comprende una secuencia heteróloga que no es de origen AAV (es decir, una secuencia de ácido nucleico heteróloga a AAV), que generalmente comprende una secuencia que codifica un polipéptido exógeno de interés. El constructo

puede comprender un AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 e híbridos de estos, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV de primate, AAV de no primate y secuencia de cápside de AAV ovino. En general, la secuencia de ácido nucleico heteróloga (el transgén) se encuentra flanqueada por al menos una, y generalmente por dos, secuencias repetidas terminales inversas (ITR) de AAV. Un vector AAV puede ser monocatenario (ssAAV) o autocomplementario (scAAV). Los ejemplos de serotipos para tejido hepático incluyen AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.74 y AAVhu.37, y particularmente AAV8. En un ejemplo específico, el vector AAV que comprende el constructo de ácido nucleico puede ser un AAV8 recombinante (rAAV8). Un vector rAAV8 como se describe en la presente descripción es uno en el que la cápside es de AAV8. Por ejemplo, un vector AAV que usa ITR de AAV2 y una cápside de AAV8 se considera en la presente descripción como un vector rAAV8.

El tropismo se puede refinar aún más mediante la pseudotipificación, que es la mezcla de una cápside y un genoma de diferentes serotipos virales. Por ejemplo, el 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 eficiencia de la transducción, así como alterar el tropismo. Las cápsides

híbridas derivadas de diferentes serotipos también pueden usarse para alterar el tropismo viral. Por ejemplo, el AAV-DJ contiene una cápside híbrida de ocho serotipos y muestra una alta infectividad en un amplio rango de tipos de células *in vivo*. El AAV-DJ8 es otro ejemplo que muestra las propiedades de AAV-DJ pero con una captación cerebral mejorada. 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 del transgén, se pueden usar variantes de AAV autocomplementarias (scAAV). Debido a que el AAV depende de la maquinaria de replicación del ADN de la célula para sintetizar la hebra complementaria del genoma de ADN monocatenario del AAV, la expresión del transgén puede retrasarse. Para abordar este retraso, se pueden usar scAAV que contienen secuencias complementarias que son capaces de hibridarse espontáneamente tras la infección, eliminando el requisito de la síntesis de ADN de la célula huésped. Sin embargo, también pueden usarse vectores AAV monocatenarios (ssAAV).

Para aumentar la capacidad de empaquetamiento, los transgenes más largos pueden dividirse entre dos plásmidos de transferencia AAV, el primero con un donante de empalme de 3’ y el segundo con un aceptor de empalme de 5’. Tras la coinfección de una célula, estos virus forman concatémeros, se empalman y se puede expresar el transgén de longitud completa. Aunque esto permite una expresión transgénica más larga, la expresión es menos eficiente. Métodos similares para aumentar la capacidad usan la recombinación homóloga. Por ejemplo, un transgén se puede dividir entre dos plásmidos de transferencia pero con una superposición sustancial de secuencias, de manera que la coexpresión induce la recombinación homóloga y la expresión del transgén de longitud completa.

En ciertos AAV, la carga puede incluir ácidos nucleicos que codifican uno o más ARN guía (p. ej., ADN que codifica un ARN guía o ADN que codifica dos o más ARN guía). En ciertos AAV, la carga puede incluir un ácido nucleico (p. ej., ADN) que codifica una nucleasa Cas, tal como Cas9, y un ADN que codifica uno o más ARN guía (p. ej., ADN que codifica un ARN guía o ADN que codifica dos o más ARN guía). En ciertos AAV, la carga puede incluir un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio). En ciertos AAV, la carga puede incluir un ácido nucleico (p. ej., ADN) que codifica una nucleasa Cas, tal como Cas9, un ADN que

codifica un ARN guía (o varios ARN guía) y un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio).

Por ejemplo, Cas o Cas9 y uno o más ARNg (p. ej., 1 ARNg o 2 ARNg o 3 ARNg o 4 ARNg) pueden suministrarse a través del suministro mediado por LNP (p. ej., en la forma de ARN) o suministro mediado por virus adenoasociados (AAV) (p. ej., suministro mediado por rAAV8). Por ejemplo, un ARNm de Cas9 y un ARNg pueden suministrarse a través del suministro mediado por LNP, o el ADN que codifica Cas9 y el ADN que codifica un ARNg pueden suministrarse a través del suministro mediado por AAV. El Cas o Cas9 y los ARNg pueden suministrarse en un solo AAV o mediante dos AAV separados. Por ejemplo, un primer AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9, y un segundo AAV puede llevar un casete de expresión de ARNg. Similarmente, un primer AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9, y un segundo AAV puede llevar dos o más casetes de expresión de ARNg. Alternativamente, un solo AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9 (p. ej., una secuencia codificante de Cas o Cas9 unida operativamente a un promotor) y un casete de expresión de ARNg (p. ej., una secuencia codificante de ARNg unida operativamente a un promotor). Similarmente, un solo AAV puede llevar un casete de expresión Cas o Cas9 (p. ej., una secuencia codificante de Cas o Cas9 unida operativamente a un promotor) y dos o más casetes de expresión de ARNg (p. ej., secuencias

codificantes de ARNg unidas operativamente a promotores). Pueden usarse diferentes promotores para estimular la expresión del ARNg, tal como un promotor U6 o el pequeño ARNt Gln. De la misma manera, pueden usarse diferentes promotores para estimular la expresión de Cas9. Por ejemplo, se usan promotores pequeños para que la secuencia de codificación de Cas9 pueda encajar en un constructo de AAV. Similarmente, se usan proteínas Cas9 pequeñas (p. ej., SaCas9 o CjCas9 para maximizar la capacidad de empaquetamiento de AAV).

C. Células o animales o genomas

En la presente descripción también se proporcionan células o animales (es decir, sujetos) que comprenden cualquiera de las composiciones anteriores (p. ej., un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio), agentes de nucleasa, vectores, nanopartículas lipídicas o cualquier combinación de estos). Tales células o animales (o genomas) pueden producirse mediante los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, las células o los animales pueden comprender cualquiera de los constructos de ácido nucleico que codifican un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) descrita en la presente descripción, cualquiera de los agentes de nucleasa descritos en la presente descripción, o ambos. Tales

células o animales (o genomas) pueden ser células o animales (o genomas) neonatales. Alternativamente, tales células o animales (o genomas) pueden ser células o animales (o genomas) no neonatales.

Un sujeto neonatal (p. ej., un animal) puede ser un sujeto humano hasta la edad de 1 año (52 semanas) o menos, preferentemente hasta la edad de 24 semanas o menos, más preferentemente hasta la edad de 12 semanas o menos, más preferentemente hasta la edad de 8 semanas o menos, e incluso más preferentemente hasta la edad de 4 semanas o menos. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 4 semanas de edad. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 8 semanas de edad. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 3 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 2 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 semana después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 7 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 6 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 5 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 4 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 3 días después del nacimiento. En otra

modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 2 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 día después del nacimiento. Las ventanas de tiempo descritas anteriormente son para sujetos humanos y también pretenden cubrir las ventanas de tiempo de desarrollo correspondientes para otros animales.

Las células neonatales pueden ser células de cualquier sujeto neonatal. Por ejemplo, pueden ser de un sujeto humano hasta la edad de 1 año (52 semanas) o menos, preferentemente hasta la edad de 24 semanas o menos, más preferentemente hasta la edad de 12 semanas o menos, más preferentemente hasta la edad de 8 semanas o menos, e incluso más preferentemente hasta la edad de 4 semanas o menos. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 4 semanas de edad. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 8 semanas de edad. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 3 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 2 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 semana después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 7 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 6 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 5 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto

humano neonatal está dentro de los 4 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 3 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 2 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 día después del nacimiento. Las ventanas de tiempo descritas anteriormente son para sujetos humanos y también pretenden cubrir las ventanas de tiempo de desarrollo correspondientes para otros animales.

En algunas de tales células, animales o genomas, el constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) puede integrarse genómicamente en un locus genómico diana, como un locus de puerto seguro (p. ej., un locus *ALB* o un locus *ALB* humano, como el intrón 1 de un locus *ALB* o un locus *ALB* humano). En algunas de tales células, animales o genomas, el polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) codificado por el constructo de ácido nucleico se expresa en la célula, animal o genoma. Por ejemplo, si el constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) se integra en un locus *ALB* (p. ej., un intrón 1 de un locus *ALB* humano), el polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) se puede expresar a partir del locus *ALB*. La secuencia de codificación para el polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio)

se puede vincular operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o se puede vincular operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. Si el constructo de ácido nucleico es un constructo de ácido nucleico bidireccional descrita en la presente descripción, el genoma neonatal, la célula neonatal o el animal neonatal puede expresar el primer polipéptido de interés o puede expresar el segundo polipéptido de interés. En algunos genomas neonatales, células neonatales o animales neonatales, el locus genómico diana es un locus *ALB*. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico puede integrarse genómicamente en el intrón 1 del locus *ALB* endógeno. El exón 1 *ALB* endógeno puede después empalmarse en la secuencia codificante del polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) en el constructo de ácido nucleico.

El locus genómico diana en el que se integra establemente el constructo de ácido nucleico puede ser heterocigoto para el constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) u homocigoto para el constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una proteína terapéutica multidominio). 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.

Las células, neonatales o genomas pueden ser de cualquier especie adecuada, tales como células eucariotas o eucariotas, o células de mamíferos o mamíferos (p. ej., células de mamíferos no humanos o mamíferos no humanos, o células humanas o humanos). Un mamífero puede ser, por ejemplo, un mamífero no humano, un ser humano, un roedor, una rata, un ratón o un hámster. Otros mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, p. ej., monos y simios. El término “no humano” excluye a los humanos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, células humanas/seres humanos, células de roedores/roedores, células de ratón/ratones, células de rata/ratas y células de primates no humanos/primates no humanos. En un ejemplo específico, la célula es una célula humana o el animal es un ser humano. De la misma manera, las células pueden ser cualquier tipo adecuado de célula. En un ejemplo específico, la célula es una célula hepática tal como un hepatocito (p. ej., una célula hepática humana o un hepatocito humano).

Las células pueden ser células aisladas (p. ej., *in vitro*), células *ex-vivo* o puede ser *in vivo* dentro de un animal (es decir, en un sujeto). Las células pueden ser células mitóticamente competentes o células mitóticamente inactivas, células meióticamente competentes o células meióticamente inactivas. Similarmente, 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, una célula germinal, un gametocito o una célula madre indiferenciada. Por ejemplo, las células neonatales pueden ser células hepáticas, tales como hepatocitos (p. ej., ratón, primate no humano o hepatocitos humanos).

Las células proporcionadas en la presente descripción pueden ser células normales, sanas, o pueden ser células enfermas o portadoras de mutantes. Por ejemplo, las células pueden tener una deficiencia del polipéptido de interés o pueden ser de un sujeto con deficiencia del polipéptido de interés. Por ejemplo, las células pueden tener una deficiencia de GAA, pueden tener una mutación que da como resultado una deficiencia de GAA o pueden ser de un sujeto con una deficiencia de GAA que tiene una mutación que da como resultado una deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe. En algunas modalidades, las células son de un sujeto neonatal.

Las células proporcionadas en la presente descripción pueden ser células en división (p. ej., células en división activa). Alternativamente, las células proporcionadas en la presente descripción pueden ser células que no se dividen.

III. Métodos terapéuticos y métodos para introducir, integrar o expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés en células o sujetos

Los constructos y composiciones de ácido nucleico descritos en la presente descripción pueden usarse en métodos para insertar o integrar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés en un locus genómico diana o métodos para expresar un polipéptido de interés en una célula, en una población de células o en un sujeto (p. ej., en una célula neonatal, en una población de células neonatales o en un sujeto neonatal).

Los constructos y composiciones de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio descritas en la presente descripción se pueden usar en métodos para introducir un constructo de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), métodos para insertar o integrar un constructo de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células o un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), métodos para reducir la acumulación de glucógeno

en una célula o una población de células o un tejido en un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), métodos para tratar la enfermedad de Pompe o la deficiencia de GAA en un sujeto, y métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe o la deficiencia de GAA en un sujeto.

Las composiciones de proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción (p. ej., constructos de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio o constructos de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio en combinación con los agentes de nucleasa (p. ej., sistemas CRISPR/Cas) son útiles para el tratamiento de la deficiencia de GAA o la enfermedad de Pompe y /o mejorar al menos un síntoma asociado con la deficiencia de GAA o la enfermedad de Pompe (p. ej., en comparación con un sujeto de control no tratado). Las composiciones de proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción (p. ej., constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio en combinación con los agentes de nucleasa (p. ej., sistemas CRISPR/Cas) también son útiles para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe (p. ej., en comparación con un sujeto de control no tratado). De la misma manera, las composiciones descritas en la presente descripción se pueden usar para la preparación

de una composición farmacéutica o medicamento para tratar a un sujeto que tiene deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe.

Con respecto a la deficiencia de GAA o la enfermedad de Pompe, los términos “tratar”, “tratado”, “tratándose” y “tratamiento” incluyen la administración de los constructos de ácido nucleico de dominio terapéutico multidominio descritas en este documento (p. ej., junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción) a sujetos para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe, aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo el desarrollo adicional de la deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la deficiencia de GAA o la enfermedad de Pompe, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de esta) o de supresión terapéutica o alivio de los síntomas después de la manifestación de la deficiencia de GAA o la enfermedad de Pompe.

La deficiencia de GAA se refiere a que los niveles de expresión y/o actividad de GAA son más bajos en el sujeto (p. ej., sujeto neonatal) que los niveles normales de expresión y/o actividad de GAA, de tal manera que las funciones normales de GAA no se llevan a cabo totalmente en el sujeto (p. ej., lo que resulta en la enfermedad de Pompe). La enfermedad de Pompe también se conoce como

deficiencia de maltasa ácida, enfermedad por deficiencia de maltasa ácida, deficiencia de alfa-1,4-glucosidasa, AMD, deficiencia de alfa-glucosidasa, deficiencia de GAA, enfermedad por depósito de glucógeno tipo II, glucogenosis tipo II, GSD II, GSD2 y la enfermedad de Pompe.

La enfermedad de Pompe es un trastorno hereditario causado por la acumulación de glucógeno en las células del cuerpo. La acumulación de glucógeno en ciertos órganos y tejidos, especialmente en los músculos, afecta su capacidad para funcionar con normalidad. Los diferentes tipos de enfermedad de Pompe difieren en la gravedad y la edad en que aparecen. Estos tipos se conocen como enfermedad de Pompe de aparición infantil (aparición infantil clásica y aparición infantil no clásica) y enfermedad de Pompe de aparición tardía. Los sujetos con enfermedad de Pompe de aparición tardía tienen niveles de enzima GAA más altos que los que se encuentran en las formas de aparición infantil de la enfermedad, pero generalmente menos que 40 por ciento de la actividad enzimática normal. Los pacientes con enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica suelen tener menos que 1 por ciento de la actividad de la enzima GAA, mientras que aquellos con formas no clásicas suelen tener menos que 10 por ciento.

La forma clásica de la enfermedad de Pompe de aparición infantil comienza a los pocos meses del nacimiento. Algunos fenotipos, como las miocardiopatías,

pueden estar presentes al nacer. Los bebés con este trastorno suelen experimentar debilidad muscular (miopatía), tono muscular deficiente (hipotonía), agrandamiento del hígado (hepatomegalia) y defectos cardíacos. Los bebés afectados también pueden no aumentar de peso y crecer al ritmo esperado (retraso en el crecimiento) y tener problemas respiratorios. Si no se trata, esta forma de enfermedad de Pompe conduce a la muerte por insuficiencia cardíaca en el primer año de vida.

La forma no clásica de la enfermedad de Pompe de aparición infantil suele aparecer al año de edad. Se caracteriza por habilidades motoras retrasadas (como darse la vuelta y sentarse) y debilidad muscular progresiva. El corazón puede ser anormalmente grande (cardiomegalia), pero las personas afectadas generalmente no experimentan insuficiencia cardíaca. La debilidad muscular en este trastorno conduce a problemas respiratorios graves, y la mayoría de los niños con enfermedad de Pompe de aparición infantil no clásica viven solo hasta la primera infancia.

El tipo de enfermedad de Pompe de aparición tardía puede no manifestarse hasta más tarde en la niñez, la adolescencia o la edad adulta. La enfermedad de Pompe de aparición tardía suele ser más leve que las formas de aparición infantil de este trastorno y es menos probable que afecte al corazón. La mayoría de las personas con enfermedad de Pompe de aparición tardía experimentan debilidad muscular

progresiva, especialmente en las piernas y el tronco, incluidos los músculos que controlan la respiración. A medida que avanza el trastorno, los problemas respiratorios pueden provocar insuficiencia respiratoria.

Las mutaciones en el gen *GAA* pueden causar la enfermedad de Pompe. El gen *GAA* codifica una enzima llamada glucosidasa alfa. Esta enzima es activa en los lisosomas. La enzima normalmente descompone el glucógeno en glucosa. Las mutaciones en el gen *GAA* evitan que la glucosidasa alfa ácida descomponga el glucógeno efectivamente, lo que permite que este azúcar se acumule hasta niveles tóxicos en los lisosomas. Esta acumulación daña los órganos y tejidos de todo el cuerpo, particularmente los músculos, lo que lleva a los signos y síntomas progresivos de la enfermedad de Pompe.

Dado que esta es una condición genética, las personas que contraen esta enfermedad la heredan de uno de los padres. Sin embargo, es común que ninguno de los padres muestre ningún síntoma. La enfermedad es rara. En los Estados Unidos, solo 1 de cada 40.000 personas se ve afectada por la enfermedad de Pompe. Puede afectar tanto a hombres como a mujeres de todos los grupos étnicos.

Los síntomas de la enfermedad de Pompe pueden ser diferentes, dependiendo de cuándo se presente la enfermedad. Para el tipo clásico, los síntomas infantiles pueden incluir los siguientes: músculos débiles, tono muscular deficiente, agrandamiento del hígado, falta de aumento de peso y

crecimiento al ritmo esperado (retraso en el crecimiento), dificultad para respirar, problemas para alimentarse, infecciones en el sistema respiratorio y problemas con la audición. Para el tipo no clásico, los síntomas del bebé pueden incluir lo siguiente: retraso en las habilidades motoras (como darse la vuelta y sentarse), los músculos se vuelven cada vez más débiles, un corazón anormalmente grande y problemas respiratorios. Para el tipo de inicio tardío, los síntomas pueden incluir los siguientes: las piernas y el tronco se debilitan progresivamente, problemas respiratorios, agrandamiento del corazón, mayor dificultad para caminar, dolor muscular en un área grande, pérdida de la capacidad para hacer ejercicio, caídas frecuentes, frecuentes infecciones pulmonares, dificultad para respirar cuando la persona se esfuerza, dolores de cabeza por la mañana, cansancio durante el día, pérdida de peso, no puede tragar tan fácilmente como antes, latidos cardíacos irregulares, mayor dificultad para escuchar y niveles más altos de creatina quinasa.

La patología en la enfermedad de Pompe puede comenzar mucho antes de que los sujetos presenten síntomas. La enfermedad de Pompe puede diagnosticarse tomando una muestra de sangre, y se estudian y cuentan las enzimas en la sangre. La confirmación puede hacerse a través de pruebas de ADN. Por ejemplo, la actividad de la enzima GAA puede medirse mediante espectrometría de masas en tándem de inyección de

flujo, y la secuenciación completa del gen GAA se realiza en recién nacidos con baja actividad de la enzima GAA. *Ver, p. ej.*, Ficicioglu et al. (2020) *Int. J. Neonatal Screen.* 6(4):89, Tang et al. (2020) *Int. J. Neonatal Screen.* 6(1):9, and Klug et al. (2020) *Int. J. Neonatal Screen* 6(1):11, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. La actividad de GAA puede evaluarse mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, para evaluar la actividad de GAA (o deficiencias de actividad), los ensayos basados en sangre pueden medir la actividad de GAA en gotas de sangre seca o sangre fresca. La actividad de GAA también puede medirse en fibroblastos de una biopsia de piel o una biopsia de músculo. Otras medidas secundarias pueden ser la medición de tetrasacáridos de glucosa en orina mediante espectrometría de masas. Estos pueden combinarse con análisis genéticos para diagnosticar la enfermedad de Pompe infantil y de aparición tardía. Puede considerarse que los sujetos asintomáticos tienen la enfermedad de Pompe si se diagnostica mediante cribado genético. Por ejemplo, se considera que un sujeto descrito en la presente descripción tiene la enfermedad de Pompe, incluso si es asintomático, si tiene una actividad reducida de GAA y una variante o mutación patógena de GAA. Se conocen mutaciones patogénicas de GAA y variantes asociadas con la enfermedad de Pompe. *Ver, p. ej.*, Ficicioglu et al. (2020) *Int. J. Neonatal Screen.* 6(4):89, Tang et al.

(2020) *Int. J. Neonatal Screen.* 6(1):9, and Klug et al. (2020) *Int. J. Neonatal Screen* 6(1):11, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Como es el caso de varias otras enfermedades lisosomales, la enfermedad de Pompe se trata actualmente con terapia de sustitución enzimática (ERT, por sus siglas en inglés). El GAA humano recombinante se suministra mediante infusión intravenosa a los pacientes cada dos semanas. Si bien la ERT ha tenido éxito en el tratamiento de las manifestaciones cardíacas de la enfermedad de Pompe, el músculo esquelético y el sistema nervioso central (SNC) siguen siendo mínimamente tratados con ERT.

Las células o poblaciones de células pueden ser células neonatales o poblaciones de células neonatales, y el sujeto puede ser sujeto neonatal en algunos métodos de introducción de un constructo de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), métodos para insertar o integrar un constructo de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células o un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto (p. ej., en

una célula o población de células en un sujeto), métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células o un tejido en un sujeto (p. ej., en una célula o población de células en un sujeto), y métodos para tratar la enfermedad de Pompe o deficiencia de GAA en un sujeto. Un sujeto neonato puede ser un sujeto humano hasta la edad de 1 año (52 semanas) o menos, preferentemente hasta la edad de 24 semanas o menos, más preferentemente hasta la edad de 12 semanas o menos, más preferentemente hasta la edad de 8 semanas o menos, e incluso más preferentemente hasta la edad de 4 semanas o menos. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 4 semanas de edad. En ciertas modalidades, un sujeto humano neonatal tiene hasta 8 semanas de edad. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 3 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal se encuentra dentro de las 2 semanas después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 semana después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 7 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 6 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 5 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 4 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 3

días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de los 2 días después del nacimiento. En otra modalidad, un sujeto humano neonatal está dentro de 1 día después del nacimiento. Las ventanas de tiempo descritas anteriormente son para sujetos humanos y también pretenden cubrir las ventanas de tiempo de desarrollo correspondientes para otros animales. Como se usa en la presente descripción, una “célula neonatal” es una célula de un sujeto neonatal, y una población de células neonatales es una población de células de un sujeto neonatal. En otros métodos, las células o poblaciones de células no son células neonatales y no son poblaciones de células neonatales, y los sujetos no son sujetos neonatales.

En un ejemplo, en la presente descripción se proporcionan métodos para introducir un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto que lo necesita (p. ej., en una célula o una población de células en el sujeto). Las células o poblaciones de células pueden ser células neonatales o poblaciones de células neonatales, y el sujeto puede ser sujeto neonato en algunos métodos. En otros métodos, las células o poblaciones de células no son células neonatales y no son poblaciones de células neonatales, y los sujetos no son sujetos neonatales. Tales métodos pueden comprender administrar cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en

la presente descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) a la célula. El constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción, o puede administrarse solo. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede ser una que exprese la proteína terapéutica multidominio sin estar integrada en un locus genómico diana (p. ej., un vector episomal o un vector de expresión en el que la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor). En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio se puede administrar junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede

unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen *ALB*, la proteína Cas puede escindir la secuencia diana del ARN guía, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado.

En otro ejemplo, en la presente descripción se proporcionan métodos para expresar una proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células o un sujeto que la necesita (p. ej., en una célula o una población de células en el sujeto). Las células o poblaciones de células pueden ser células neonatales o poblaciones de células neonatales, y el sujeto puede ser sujeto neonato en algunos métodos. En otros métodos, las células o poblaciones de células no son células neonatales y no son poblaciones de células neonatales, y los sujetos no son sujetos neonatales. Tales métodos pueden comprender administrar cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en la presente

descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) a la célula. En algunos métodos, el constructo o composición de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio que comprende el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede administrarse sin un agente de nucleasa (p. ej., si el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio comprende elementos necesarios para la expresión de la proteína terapéutica multidominio sin integración en un locus genómico diana). En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede unirse operativamente a un promotor

endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen *ALB*, la proteína Cas puede escindir la secuencia diana del ARN guía, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado.

En otro ejemplo, en la presente descripción se proporcionan métodos para insertar o integrar un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células o un sujeto que necesite de estos (p. ej., en una célula o una población de células en el tema). Las células o poblaciones de células pueden ser células neonatales o poblaciones de células neonatales, y el sujeto puede ser sujeto neonato en algunos métodos. En otros métodos, las células o poblaciones de células no son células neonatales y no son poblaciones de células neonatales, y los sujetos no son sujetos neonatales. Tales métodos pueden comprender administrar cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en la presente

descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) a la célula. En algunos métodos, la composición o constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio que comprende el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado. La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen

ALB, la proteína Cas puede escindir la secuencia diana del ARN guía, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado.

En cualquiera de los métodos anteriores, las células pueden ser de cualquier especie adecuada, como células eucariotas o células de mamíferos (p. ej., células de mamíferos no humanos o células humanas). Un mamífero puede ser, por ejemplo, un mamífero no humano, un ser humano, un roedor, una rata, un ratón o un hámster. Otros mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, p. ej., monos y simios. El término “no humano” excluye a los humanos. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, células humanas, células de roedor, células de ratón, células de rata y células de primates no humanos. En un ejemplo específico, la célula es una célula humana. De la misma manera, las células pueden ser cualquier tipo adecuado de célula. En un ejemplo específico, la célula es una célula hepática tal como un hepatocito (p. ej., una célula hepática humana o un hepatocito humano). Las células pueden ser células neonatales o pueden ser células no neonatales.

Las células pueden ser células aisladas (p. ej., *in vitro*), células *ex-vivo* o puede ser *in vivo* dentro de un animal (es decir, en un sujeto). En un ejemplo específico, la célula es *in vivo* (p. ej., en un sujeto que

tiene una deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe). Las células pueden ser células mitóticamente competentes o células mitóticamente inactivas, células meióticamente competentes o células meióticamente inactivas. Similarmente, 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, una célula germinal, un gametocito o una célula madre indiferenciada. Por ejemplo, las células pueden ser células hepáticas, tales como los hepatocitos (p. ej., ratón, primate no humano o hepatocitos humanos).

Las células proporcionadas en la presente descripción pueden ser células normales, sanas, o pueden ser células enfermas o portadoras de mutantes. Por ejemplo, las células pueden tener una deficiencia de GAA o pueden ser de un sujeto con deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe.

También se proporcionan métodos para tratar una deficiencia de glucosidasa alfa lisosomal (GAA) en un sujeto que necesite de estos (p. ej., un sujeto con enfermedad de Pompe). La enfermedad de Pompe puede ser cualquier tipo de enfermedad de Pompe (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil (aparición infantil clásica o aparición infantil no clásica) o enfermedad de Pompe de aparición tardía). Por ejemplo, el sujeto puede tener la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica). La

enfermedad de Pompe se describe con más detalle en otra parte de la presente descripción. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se administra e internaliza en el músculo esquelético, el hígado o el tejido cardíaco en el sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético o en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido del músculo esquelético del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético, hígado y tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético y tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético, hígado, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético, corazón o tejido

del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido del músculo esquelético del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético, hígado, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido muscular esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método

reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, hígado y tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético y en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido muscular esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, hígado, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos casos, los niveles de glucógeno se reducen a niveles de tipo silvestre. En algunos casos, los niveles de glucógeno en

el músculo esquelético, el corazón y/o el tejido del sistema nervioso central se reducen a niveles comparables a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto (p. ej., restaura la fuerza muscular a niveles de tipo silvestre). En algunos métodos, el método evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un control. En algunos métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. Tales métodos pueden comprender la administración de cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en la presente descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) al sujeto de tal manera que una se alcanza un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA en el sujeto. En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o la composición que comprende el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse sin un agente de nucleasa (p. ej., si el constructo de ácido

nucleico de proteína terapéutica multidominio comprende elementos necesarios para la expresión de la proteína terapéutica multidominio sin integración en un locus genómico diana). En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado (p. ej., de tal manera que se logre en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA). La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía

puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen *ALB*, la proteína Cas puede escindir el ARN guía diana, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado (p. ej., de manera tal que se alcance en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA).

También se proporcionan métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células o un tejido en un sujeto que necesite de estos (p. ej., un sujeto con enfermedad de Pompe). Similarmente, se proporcionan métodos para reducir la acumulación de glucógeno en una célula o una población de células. La enfermedad de Pompe puede ser cualquier tipo de enfermedad de Pompe (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil (aparición infantil clásica o aparición infantil no clásica) o enfermedad de Pompe de aparición tardía). Por ejemplo, el sujeto puede tener la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica). La enfermedad de Pompe se describe con más detalle en otra parte de la presente descripción. En algunos métodos, el método reduce la

acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido muscular esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, hígado y tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético y en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido muscular esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido del sistema

nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, hígado, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos casos, los niveles de glucógeno se reducen a niveles de tipo silvestre. En algunos casos, los niveles de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y/o el tejido del sistema nervioso central se reducen a niveles comparables a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto (p. ej., restaura la fuerza muscular a niveles de tipo silvestre). En algunos métodos, el método evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un control. En algunos métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. Tales métodos pueden comprender la administración de cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en la presente descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) al sujeto de tal manera que una se alcanza un

nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA en el sujeto. En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o la composición que comprende el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse sin un agente de nucleasa (p. ej., si el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio comprende elementos necesarios para la expresión de la proteína terapéutica multidominio sin integración en un locus genómico diana). En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado (p. ej., de tal manera que se logre en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica

multidominio circulante o GAA). La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen *ALB*, la proteína Cas puede escindir el ARN guía diana, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado (p. ej., de manera tal que se alcance en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA).

También se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto. La enfermedad de Pompe puede ser cualquier tipo de enfermedad de Pompe (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil (aparición infantil clásica o aparición infantil no clásica) o enfermedad de Pompe de aparición tardía). Por ejemplo, el sujeto puede tener la enfermedad de Pompe de aparición

infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica). La enfermedad de Pompe se describe con más detalle en otra parte de la presente descripción. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido muscular esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, hígado y tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético y en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido muscular esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto.

En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método reduce la acumulación de glucógeno en el tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, hígado, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede reducirse en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos casos, los niveles de glucógeno se reducen a niveles de tipo silvestre. En algunos casos, los niveles de glucógeno en el músculo esquelético, el corazón y/o el tejido del sistema nervioso central se reducen a niveles comparables a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. En algunos métodos, el método mejora la fuerza muscular en el sujeto (p. ej., restaura la fuerza muscular a niveles de tipo silvestre). En algunos métodos, el método evita la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un control. En algunos métodos, el método da como resultado que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles de tipo silvestre a la misma edad. Tales métodos pueden comprender la administración de cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en la presente descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio

descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) al sujeto de tal manera que una se alcanza un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA en el sujeto. En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o la composición que comprende el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse sin un agente de nucleasa (p. ej., si el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio comprende elementos necesarios para la expresión de la proteína terapéutica multidominio sin integración en un locus genómico diana). En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado (p. ej., de tal manera que se logre en el sujeto un nivel

terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA). La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen *ALB*, la proteína Cas puede escindir el ARN guía diana, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado (p. ej., de manera tal que se alcance en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA).

El tratamiento se refiere a cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para una enfermedad o trastorno en un sujeto e incluye la inhibición de la enfermedad, la detención de su desarrollo, el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad, la

curación de la enfermedad o la prevención de la recurrencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento de la enfermedad de Pompe puede comprender el alivio de los síntomas de la enfermedad de Pompe. La enfermedad de Pompe se describió en detalle anteriormente y se refiere a un trastorno causado por la falta o defecto de un gen *GAA* o polipéptido GAA. El gen *GAA* defectuoso o el polipéptido GAA pueden dar como resultado una expresión reducida de GAA y/o una actividad de GAA.

También se proporcionan métodos para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto (p. ej., en comparación con un sujeto de control no tratado). Por prevención se entiende que el signo o síntoma de la enfermedad de Pompe nunca se presenta. Tales signos y síntomas son bien conocidos y se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción. La enfermedad de Pompe puede ser cualquier tipo de enfermedad de Pompe (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil (aparición infantil clásica o aparición infantil no clásica) o enfermedad de Pompe de aparición tardía). Por ejemplo, la enfermedad de Pompe puede ser una enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica). La enfermedad de Pompe se describe con más detalle en otra parte de la presente descripción. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el

músculo esquelético, hígado o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético o tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido del músculo esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede prevenirse o reducirse en el músculo esquelético, hígado y tejido cardíaco del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede prevenirse o reducirse en el músculo esquelético y tejido cardíaco del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, hígado, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido del músculo esquelético del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido hepático del sujeto. En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco del sujeto.

En algunos métodos, el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la acumulación de glucógeno puede prevenirse o reducirse en el músculo esquelético, hígado, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto. Por ejemplo, la aparición de la acumulación de glucógeno puede prevenirse o reducirse en el músculo esquelético, el corazón y el tejido del sistema nervioso central del sujeto. Tales métodos pueden comprender la administración de cualquiera de los constructos de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descritas en la presente descripción (o cualquiera de las composiciones que comprenden un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción, incluidos, por ejemplo, vectores o nanopartículas lipídicas) al sujeto de tal manera que una se alcanza un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA en el sujeto. En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o la composición que comprende el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse sin un agente de nucleasa (p. ej., si el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio comprende

elementos necesarios para la expresión de la proteína terapéutica multidominio sin integración en un locus genómico diana). En algunos métodos, el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede administrarse junto con un agente de nucleasa descrito en la presente descripción (p. ej., simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden). El agente de nucleasa puede escindir una secuencia diana de nucleasa dentro de un locus genómico diana (p. ej., un gen diana), el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del locus genómico diana modificado (p. ej., de tal manera que se logre en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA). La secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio puede unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana tras la integración en el locus genómico diana, o puede unirse operativamente a un promotor exógeno presente en el constructo de ácido nucleico. En un ejemplo, el agente de nucleasa es un sistema CRISPR/Cas y el gen diana es *ALB* (p. ej., intrón 1 de *ALB*). En tales métodos, el ARN guía puede unirse a la proteína Cas y dirigir la proteína Cas a

la secuencia diana del ARN guía en el intrón 1 del gen *ALB*, la proteína Cas puede escindir el ARN guía diana, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en el gen *ALB* para crear un gen *ALB* modificado, y la proteína terapéutica multidominio puede expresarse a partir del gen *ALB* modificado (p. ej., de manera tal que se alcance en el sujeto un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio o expresión de GAA o un nivel terapéuticamente efectivo de proteína terapéutica multidominio circulante o GAA).

En algunos métodos, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o la composición que comprende el constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio o la combinación del constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio y el agente de nucleasa (p. ej., sistema CRISPR/Cas). Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en la técnica podrá determinarla usando técnicas conocidas. *Ver, p. ej.*, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding. En un ejemplo específico, los niveles séricos de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml de la proteína terapéutica multidominio se consideran

terapéuticamente eficaces y corresponden a la corrección completa del depósito de glucógeno en los músculos.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, suministro, tolerancia y lo similar. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. *Ver también* Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J. Pharm. Sci. Technol.* 52:238-311. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas no son pirógenas.

Las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse para aliviar o prevenir o disminuir la gravedad de uno o más de los síntomas de deficiencia de GAA o enfermedad de Pompe. Tales síntomas se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción.

El sujeto en cualquiera de los métodos anteriores puede ser uno que necesite mejorar o tratar la deficiencia de GAA o la enfermedad de Pompe. El sujeto en cualquiera de los métodos anteriores puede ser de cualquier especie adecuada, como una eucariota o un mamífero. Un mamífero

puede ser, por ejemplo, un mamífero no humano, un ser humano, un roedor, una rata, un ratón o un hámster. Otros mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, p. ej., monos y simios. El término “no humano” excluye a los humanos. Los ejemplos específicos de especies adecuadas incluyen, pero no se limitan a, humanos, roedores, ratones, ratas y primates no humanos. En un ejemplo específico, el sujeto es un ser humano. El sujeto en algunos métodos puede ser un sujeto neonatal. En otros métodos, el sujeto no es un sujeto neonatal.

En los métodos en los que un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio se integra genómicamente, puede usarse cualquier locus genómico diana capaz de expresar un gen, como un locus de puerto seguro (gen de puerto seguro) o un locus *GAA* endógeno. Tales loci se describen con más detalle en otra parte la presente descripción. En un ejemplo específico, el locus genómico diana puede ser un locus *ALB* endógeno, tal como un locus *ALB* humano endógeno. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico puede integrarse genómicamente en el intrón 1 del locus *ALB* endógeno. El exón 1 *ALB* endógeno puede después empalmarse en la secuencia de codificación para la proteína terapéutica multidominio en el constructo de ácido nucleico.

La inserción diana del constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia de codificación de la proteína

terapéutica multidominio en un locus genómico diana, y particularmente un locus *ALB* endógeno, ofrece múltiples ventajas. Tales métodos dan como resultado una modificación estable para permitir una expresión estable a largo plazo de la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. Con respeto al locus *ALB*, tales métodos son capaces de usar el promotor *ALB* endógeno y las regiones reguladoras para lograr niveles de expresión terapéuticamente efectivos. Por ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en el constructo de ácido nucleico puede comprender un gen sin promotor, y el constructo de ácido nucleico insertado puede unirse operativamente a un promotor endógeno en el locus genómico diana (p. ej., locus *ALB*). El uso de un promotor endógeno es ventajoso porque evita la necesidad de incluir un promotor en el constructo de ácido nucleico, lo que permite el empaquetamiento de transgenes más grandes que normalmente no se empaquetan de eficientemente (p. ej., en AAV). Alternativamente, la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio en el constructo de ácido nucleico puede unirse operativamente a un promotor exógeno en el constructo de ácido nucleico. Los ejemplos de tipos de promotores que pueden usarse se describen en otra parte de la presente descripción.

Opcionalmente, algunos o todos los genes endógenos (p. ej., gen *ALB* endógeno) en el locus genómico

diana puede expresarse tras la inserción de la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio del constructo de ácido nucleico. Alternativamente, en algunos métodos, no se expresa ninguno de los genes endógenos en el locus genómico diana. Como un ejemplo, el locus genómico diana modificado (p. ej., el locus *ALB* modificado) después de la integración del constructo de ácido nucleico puede codificar una proteína quimérica que comprende una señal de secreción endógena (p. ej., la señal de secreción de albúmina) y la proteína terapéutica multidominio codificada por el constructo de ácido nucleico. En otro ejemplo, el primer intrón de un locus *ALB* puede ser la diana. La señal de secreción del péptido de *ALB* se codifica por el exón 1 del gen *ALB*. En tal escenario, un casete sin promotor que soporta un aceptor de empalme y la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio apoyará la expresión y secreción de la proteína terapéutica multidominio. El empalme entre el exón 1 ALB endógeno y la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio integrada crea un ARNm quimérico y una proteína que incluye la secuencia ALB endógena codificada por el exón 1 unido operativamente a la secuencia codificada de la proteína terapéutica multidominio por el constructo de ácido nucleico integrado.

El constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede insertarse en el locus

genómico diana por cualquier medio, incluida la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) como se describe en otra parte de la presente descripción. En un ejemplo específico, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio se inserta por NHEJ (p. ej., no comprende un brazo de homología y se inserta por NHEJ).

En otro ejemplo específico, el constructo de ácido nucleico puede insertarse a través de una integración dirigida independiente de la homología (p. ej., integración dirigida independiente de la homología direccional). Por ejemplo, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio en el constructo de ácido nucleico puede estar flanqueada en cada lado por un sitio diana para un agente de nucleasa (p. ej., el mismo sitio diana que en el locus genómico diana y el mismo agente nucleasa que se usa para escindir el sitio diana en el locus genómico diana). El agente de nucleasa puede después escindir los sitios diana que flanquean la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio. En un ejemplo específico, el constructo de ácido nucleico se suministra a través de un suministro mediado por AAV y la escisión de los sitios diana que flanquean la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio puede eliminar las repeticiones terminales inversas (ITR) del AAV. La eliminación de las ITR puede facilitar la evaluación de la

orientación exitosa, porque la presencia de los ITR puede dificultar los esfuerzos de secuenciación debido a las secuencias repetidas. En algunos métodos, el sitio diana en el locus genómico diana (p. ej., una secuencia diana de ARNg que incluye el motivo adyacente de protoespaciador flanqueante) ya no se encuentra presente si la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio se inserta en el locus genómico diana en la orientación correcta, pero se reforma si la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio se inserta en el locus genómico diana en la orientación opuesta. Esto puede ayudar a garantizar que la secuencia de codificación de la proteína terapéutica multidominio se inserte en la orientación correcta para la expresión.

En cualquiera de los métodos anteriores, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede administrarse simultáneamente con el agente de nucleasa (p. ej., sistema CRISPR/Cas) o no simultáneamente (p. ej., secuencialmente en cualquier combinación). Por ejemplo, en un método que comprende administrar una composición que comprende el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio y un agente de nucleasa, pueden administrarse por separado. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede administrarse antes del agente de nucleasa, después del agente de nucleasa o al

mismo tiempo que el agente de nucleasa. Puede usarse cualquier método adecuado para administrar constructos de ácido nucleico y agentes de nucleasa a las células, particularmente métodos de administración al hígado, y los ejemplos de tales métodos se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción. En métodos de tratamiento o en métodos para dirigirse a una célula *in vivo* en un sujeto, el constructo de ácido nucleico puede insertarse en tipos particulares de células en el sujeto. El método y vehículo para introducir el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio y/o el agente de nucleasa en el sujeto pueden afectar a qué tipos de células del sujeto se dirigen. En algunos métodos, p. ej., el constructo de ácido nucleico se inserta en un locus genómico diana (p. ej., un locus ALB endógeno *ALB*) en las células hepáticas, como los hepatocitos. Los métodos y vehículos para introducir tales constructos y agentes de nucleasa en el sujeto (incluidos los métodos y vehículos que se dirigen al hígado o hepatocitos, tal como el suministro mediado por nanopartículas lipídicas y el suministro mediado por AAV (p. ej., suministro mediado por rAAV8) e inyección intravenosa), se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción.

En los métodos en los que se administra una composición que comprende un constructo de ácido nucleico (o vector o LNP) y un agente de nucleasa (es decir, en los

métodos en los que se administra un constructo de ácido nucleico (o vector o LNP) y un agente de nucleasa), el constructo de ácido nucleico y el agente de nucleasa pueden administrarse simultáneamente. Alternativamente, el constructo de ácido nucleico y el agente de nucleasa pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico puede administrarse después del agente de nucleasa, o el agente de nucleasa puede administrarse después del constructo de ácido nucleico. Por ejemplo, el agente de nucleasa puede administrarse de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 12 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas o aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas antes o después de la administración del constructo de ácido nucleico.

En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico se administra aproximadamente 4 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 1 semana antes de administrar el agente de nucleasa. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico se administra al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos alrededor de 4 días, al menos alrededor de 5 días, al menos alrededor de 6 días o al menos aproximadamente 1 semana antes de administrar el agente de nucleasa. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico se administra de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días, de

aproximadamente 3 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 6 días a aproximadamente 7 días o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días antes de administrar el agente nucleasa.

En un ejemplo, el constructo de ácido nucleico se administra aproximadamente 4 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 1 semana después de administrar el agente de nucleasa. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico se administra al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos alrededor de 4 días, al menos alrededor de 5 días, al menos alrededor de 6 días o al menos aproximadamente 1 semana después de administrar el agente de nucleasa. En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico se administra de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 7 días, de

aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 6 días a aproximadamente 7 días o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días después de administrar el agente nucleasa.

En cualquiera de los métodos anteriores, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio y el agente de nucleasa (p. ej., sistema CRISPR/Cas) pueden administrarse usando cualquier sistema de suministro adecuado y método conocido. Los componentes del agente nucleasa y el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio (p. ej., el ARN guía, la proteína Cas y el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio) pueden administrarse individualmente o juntos en cualquier combinación, usando los mismos o diferentes métodos de suministro, según corresponda.

En los métodos en los que se usa un sistema CRISPR/Cas, puede introducirse o administrarse un ARN guía a

un sujeto o célula, p. ej., en la forma de ARN (p. ej., ARN transcrito *in vitro*, como los ARN guía modificados descritos en la presente descripción) o en la forma de un ADN que codifica el ARN guía. Cuando se introduce en la forma de ADN, el ADN que codifica un ARN guía puede unirse operativamente a un promotor activo en la célula o en una célula del sujeto. Por ejemplo, un ARN guía puede suministrarse a través de AAV y expresarse *in vivo* bajo un promotor U6. Tales ADN pueden estar en una o más constructos de expresión. Por ejemplo, tales constructos de expresión pueden ser componentes de una sola molécula de ácido nucleico. Alternativamente, pueden separarse en cualquier combinación entre dos o más moléculas de ácido nucleico (es decir, los ADN que codifican uno o más ARN CRISPR y los ADN que codifican uno o más ARNtracr pueden ser componentes de moléculas de ácido nucleico separadas).

De la misma manera, las proteínas Cas pueden introducirse en un sujeto o célula en cualquier forma. Por ejemplo, una proteína Cas puede proporcionarse en forma de proteína, tal como una proteína Cas complejada con un ARNg. Alternativamente, una proteína Cas puede proporcionarse en la forma de un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, tal como un ARN (p. ej., ARN mensajero (ARNm)), tal como un ARNm modificado como se describe en la presente descripción, o ADN). Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede tener codones optimizados para una traducción eficiente en proteína en una célula u

organismo particular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede modificarse para sustituir los codones que tienen una mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero, una célula humana, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata o cualquier otra célula huésped de interés, en comparación con la secuencia de polinucleótidos que se producen naturalmente. Cuando un ácido nucleico que codifica la proteína Cas se introduce en una célula o un sujeto, la proteína Cas puede expresarse transitoria, condicional o constitutivamente en la célula o en una célula del sujeto.

En un ejemplo, la proteína Cas se introduce en la forma de un ARNm (p. ej., un ARNm modificado como se describe en la presente descripción), y el ARN guía se introduce en la forma de ARN, tal como un ARNg modificado como se describe en la presente descripción (p. ej., junto con la misma nanopartícula lipídica). Los ARN guía pueden modificarse como se describe en otra parte de la presente descripción. De la misma manera, los ARNm de Cas pueden modificarse como se describe en otra parte de la presente descripción.

En métodos en los que un constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio se inserta después de la escisión por un sistema de edición de genes (p. ej., una proteína Cas), el sistema de edición de genes (p. ej., proteína Cas) puede escindir el locus genómico diana para crear una rotura de una sola hebra (corte) o doble

cadena, y el locus cortado o mellado puede repararse mediante la inserción del constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio mediante inserción mediada por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología. Opcionalmente, la reparación con el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio elimina o interrumpe la(s) secuencia(s) diana del ARN guía para que los reactivos CRISPR/Cas no puedan volver a dirigirse a los alelos que han sido diana.

Como se explica con más detalle en otra parte de la presente descripción, los constructos de ácidos nucleicos de la proteína terapéutica multidominio pueden comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), pueden ser de una sola hebra o de hebra doble y pueden tener forma lineal o circular. Los constructos de ácidos nucleicos de la proteína terapéutica multidominio pueden ser ácidos nucleicos desnudos o pueden ser suministrados por virus, tal como el AAV. En un ejemplo específico, el constructo de ácidos nucleicos de la proteína terapéutica multidominio puede suministrarse a través de AAV y puede ser capaz de insertarse en el locus genómico diana (p. ej., un gen de puerto seguro, un gen *ALB* o intrón 1 de un gen *ALB*) por unión de extremos no homólogos (p. ej., el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede ser una que no comprenda un brazo de homología).

Algunos constructos de ácido nucleico de la proteínas terapéutica multidominio pueden insertarse mediante la unión de extremos no homólogos. En algunos casos, dichos constructos de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio no comprenden un brazo de homología. Por ejemplo, dichos constructos de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio pueden insertarse en una rotura de doble hebra de extremo romo después de la escisión con una proteína Cas. En un ejemplo específico, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede administrarse a través de AAV y puede insertarse mediante la unión de extremos no homólogos (p. ej., el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede ser una que no comprenda un brazo de homología).

En otro ejemplo, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede insertarse mediante integración dirigida independiente de la homología. Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede estar flanqueada en cada lado por una secuencia diana de ARN guía (p. ej., el mismo sitio diana que en el locus genómico diana y el reactivo CRISPR/Cas (proteína Cas y ARN guía) que se usa para escindir el sitio diana en el locus genómico diana). La proteína Cas puede después escindir los sitios diana que flanquean el inserto de ácido nucleico. En un ejemplo específico, el constructo

de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio se suministra mediante el suministro mediado por AAV, y la escisión de los sitios diana que flanquean el inserto de ácido nucleico puede eliminar las repeticiones terminales inversas (ITR) del AAV. En algunos métodos, el sitio diana en el locus genómico diana (p. ej., una secuencia diana de ARN guía que incluye el motivo adyacente de protoespaciador flanqueante) ya no se encuentra presente si el inserto de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana en la orientación correcta, pero es reformado si el inserto de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana en la orientación opuesta.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender introducir o administrar a un sujeto (p. ej., un animal o mamífero, tal como un ser humano) o una célula un constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio y opcionalmente un agente de nucleasa tales como reactivos CRISPR/Cas, incluso en la forma de ácidos nucleicos (p. ej., ADN o ARN), proteínas o complejos de ácido nucleico-proteína. “Introducir” o “administrar” incluye presentar a la célula o sujeto la(s) molécula(s) (p. ej., ácido(s) nucleico(s) o proteína(s)) de tal manera que tenga acceso al interior de la célula o al interior de las células dentro del sujeto. La introducción puede realizarse por cualquier medio, y dos o más de los componentes (p. ej., dos de los componentes,

o todos los componentes) pueden introducirse en la célula o el sujeto simultánea o secuencialmente en cualquier combinación. Por ejemplo, una proteína Cas puede introducirse en una célula o sujeto antes de la introducción de un ARN guía, o puede introducirse después de la introducción del ARN guía. Como otro ejemplo, un constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede introducirse antes de la introducción de una proteína Cas y un ARN guía, o puede introducir después de la introducción de la proteína Cas y el ARN guía (p. ej., el constructo de ácido nucleico de la proteína terapéutica multidominio puede administrarse aproximadamente 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36, 48 o 72 horas antes o después de la introducción de la proteína Cas y el ARN guía). *Ver, p. ej.*, EE. UU. 2015/0240263 y WO 2015/0110762, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Además, pueden introducirse dos o más de los componentes en la célula o el sujeto mediante el mismo método de suministro o diferentes métodos de suministro. Similarmente, dos o más de los componentes pueden introducirse en un sujeto por la misma vía de administración o por diferentes vías de administración.

Un ARN guía puede introducirse en un sujeto o una célula, por ejemplo, en la forma de ARN (p. ej., ARN transcrito *in vitro*) o en la forma de un ADN que codifica

el ARN guía. Los ARN guía pueden modificarse como se describe en otra parte de la presente descripción. Cuando se introduce en la forma de ADN, el ADN que codifica un ARN guía puede unirse operativamente a un promotor activo en la célula o en una célula del sujeto. Por ejemplo, un ARN guía puede suministrarse a través de AAV y expresarse *in vivo* bajo un promotor U6. Tales ADN pueden estar en una o más constructos de expresión. Por ejemplo, tales constructos de expresión pueden ser componentes de una sola molécula de ácido nucleico. Alternativamente, pueden separarse en cualquier combinación entre dos o más moléculas de ácido nucleico (es decir, los ADN que codifican uno o más ARN CRISPR y los ADN que codifican uno o más ARNtracr pueden ser componentes de moléculas de ácido nucleico separadas).

De la misma manera, las proteínas Cas pueden proporcionarse en cualquier forma. Por ejemplo, una proteína Cas puede proporcionarse en forma de proteína, tal como una proteína Cas complejada con un ARNg. Alternativamente, una proteína Cas puede proporcionarse en la forma de un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, tal como un ARN (p. ej., ARN mensajero (ARNm)) o ADN. Los ARN Cas pueden modificarse como se describe en otra parte de la presente descripción. Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede tener codones optimizados para una traducción eficiente en proteína en una célula u organismo particular. Por ejemplo, el ácido

nucleico que codifica la proteína Cas puede modificarse para sustituir los codones que tienen una mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero, una célula humana, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata o cualquier otra célula huésped de interés, en comparación con la secuencia de polinucleótidos que se producen naturalmente. Cuando un ácido nucleico que codifica la proteína Cas se introduce en una célula o un sujeto, la proteína Cas puede expresarse transitoria, condicional o constitutivamente en la célula o en una célula del sujeto.

Los ácidos nucleicos que codifican proteínas Cas o ARN guía pueden unirse operativamente a un promotor en un constructo de expresión. Los constructos de expresión incluyen cualquier constructo de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen u otra secuencia de ácido nucleico de interés (p. ej., un gen Cas) y que puede transferir tal secuencia de ácido nucleico de interés a una célula diana. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede estar en un vector que comprende un ADN que codifica uno o más ARNg. Alternativamente, puede estar en un vector o plásmido que se encuentre separado del vector que comprende el ADN que codifica uno o más ARNg. Los promotores adecuados que pueden usarse en un constructo de expresión incluyen promotores activos, por ejemplo, en una o más de una célula eucariota, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de

mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de hámster, una célula pluripotente, una célula madre embrionaria (ES, por sus siglas en inglés), una célula madre adulta, una célula progenitora restringida en el desarrollo, una célula madre pluripotente inducida (iPS, por sus siglas en inglés) o un embrión en etapa unicelular. Por ejemplo, un promotor adecuado puede estar activo en una célula hepática tal como un hepatocito. Tales promotores pueden ser, por ejemplo, promotores condicionales, promotores inducibles, promotores constitutivos o promotores específicos de tejido. Opcionalmente, el promotor puede ser un promotor bidireccional que dirija la expresión tanto de una proteína Cas en una dirección como de un ARN guía en la otra dirección. Tales promotores bidireccionales pueden consistir en (1) un promotor Pol III unidireccional, convencional y completo que contiene 3 elementos de control externos: un elemento de secuencia distal (DSE, por sus siglas en inglés), un elemento de secuencia proximal (PSE, por sus siglas en inglés) y una caja TATA; y (2) un segundo promotor Pol III básico que incluye un PSE y una caja TATA fusionados al extremo 5’ del DSE en orientación inversa. Por ejemplo, en el promotor H1, el DSE es adyacente al PSE y la caja TATA, y el promotor puede volverse bidireccional creando un promotor híbrido en el que la transcripción en la dirección inversa se controle agregando un PSE y una

caja TATA derivados del promotor U6. Véase, por ejemplo, el documento US 2016/0074535, incorporado en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos. El uso de un promotor bidireccional para expresar genes que codifican una proteína Cas y un ARN guía simultáneamente permite la generación de casetes de expresión compactos para facilitar el suministro. En modalidades preferidas, las autoridades reguladoras aceptan los promotores para su uso en seres humanos. En determinadas modalidades, los promotores dirigen la expresión en una célula hepática.

Las moléculas (p. ej., las proteínas Cas o ARN guía o codificación de ácidos nucleicos) introducidas en el sujeto o la célula pueden proporcionarse en composiciones que comprendan un vehículo que aumente la estabilidad de las moléculas introducidas (p. ej., prolongando el período en determinadas condiciones de almacenamiento (p. ej., -20 °C, 4 °C o temperatura ambiente) para los que los productos de degradación permanecen por debajo de un umbral, como por debajo del 0,5 % en peso del ácido nucleico o la proteína de partida; o aumentando la estabilidad in vivo). Los ejemplos no limitantes de tales vehículos incluyen microesferas de poli(ácido láctico) (PLA, por sus siglas en inglés), microesferas poli(D,L-láctico-coglicólico-ácido) (PLGA, por sus siglas en inglés), liposomas, micelas, micelas inversas, cocleatos de lípidos y microtúbulos de lípidos.

En la presente descripción se proporcionan varios métodos y composiciones para permitir la introducción de una molécula (p. ej., un ácido nucleico o una proteína) en una célula o sujeto. Se conocen métodos para introducir moléculas en diversos tipos de células e incluyen, por ejemplo, métodos de transfección estables, métodos de transfección transitoria y métodos mediados por virus.

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

La introducción de ácidos nucleicos o proteínas en una célula también puede estar mediada por electroporación, inyección intracitoplasmática, infección viral, adenovirus,

virus adenoasociado, lentivirus, retrovirus, transfección, transfección mediada por lípidos o por nucleofección. La nucleofección es una tecnología de electroporación mejorada que permite que los sustratos de ácido nucleico se suministren no solo al citoplasma sino también a través de la membrana nuclear y al núcleo. Además, el uso de la nucleofección en los métodos descritos en la presente descripción generalmente requiere muchas menos células que la electroporación normal (p. ej., solo aproximadamente 2 millones en comparación con los 7 millones de la electroporación normal). En un ejemplo, la nucleofección se realiza usando el sistema LONZA® NUCLEOFECTOR™.

La introducción de moléculas (p. ej., ácidos nucleicos o proteínas) en una célula (p. ej., un cigoto) también puede realizarse mediante microinyección. En los cigotos (es decir, embriones en etapa unicelular), la microinyección puede realizarse en el pronúcleo materno y/o paterno o en el citoplasma. Si la microinyección es en un solo pronúcleo, es preferible el pronúcleo paterno debido a su mayor tamaño. La microinyección de un ARNm es preferentemente en el citoplasma (p. ej., para entregar el ARNm directamente a la maquinaria de traducción), mientras que la microinyección de una proteína Cas o un polinucleótido que codifica una proteína Cas o codifica un ARN es preferible en el núcleo/pronúcleo. Alternativamente, la microinyección puede realizarse mediante una inyección

en el núcleo/pronúcleo y en el citoplasma: primero puede introducirse una aguja en el núcleo/pronúcleo y puede inyectarse una primera cantidad, y mientras se extrae la aguja del embrión en etapa unicelular puede inyectarse una segunda cantidad en el citoplasma. Si se inyecta una proteína Cas en el citoplasma, la proteína Cas preferentemente comprende una señal de localización nuclear para asegurar el suministro al núcleo/pronúcleo. Los métodos para llevar a cabo la microinyección son bien conocidos. *Ver, p. ej.*, Nagy et al. (Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); *ver también* Meyer et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:15022-15026 y Meyer et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:9354-9359, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

Otros métodos para introducir moléculas (p. ej., ácido nucleico o proteínas) en una célula o sujeto pueden incluir, por ejemplo, el suministro de vectores, el suministro mediado por partículas, el suministro mediado por exosomas, el suministro mediado por nanopartículas de lípidos, el suministro de péptidos de penetración celular o suministro mediado por dispositivo implantable. Como ejemplos específicos, puede introducirse un ácido nucleico o una proteína en una célula o sujeto en un vehículo como

una microesfera de poli(ácido láctico) (PLA), una microesfera poli(D,L-láctico-coglicólico-ácido) (PLGA), una liposoma, una micela, una micela inversa, un cocleato lipídico o un microtúbulo lipídico. Algunos ejemplos específicos de suministro a un sujeto incluyen el suministro hidrodinámico, suministro mediado por virus (p. ej., suministro mediado por virus adenoasociados (AAV)) y suministro mediado por nanopartículas de lípidos.

La introducción de ácidos nucleicos y proteínas en células o sujetos puede lograrse mediante suministro hidrodinámico (HDD). Para el suministro de genes a las células parenquimatosas, solo es necesario inyectar las secuencias de ADN esenciales a través de un vaso sanguíneo seleccionado, lo que elimina las preocupaciones de seguridad asociadas con los vectores virales 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 evitan que los 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 eficiente de ARN, proteínas y otros compuestos pequeños *in vivo*. *Ver, p. ej.*,

Bonamassa et al. (2011) *Pharm. Res.* 28(4):694-701, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

La introducción de ácidos nucleicos también puede lograrse mediante el suministro mediado por virus, tal como el suministro mediado por AAV o el suministro mediado por lentivirus. Otros virus/vectores virales ilustrativos incluyen retrovirus, adenovirus, vaccinia virus, poxvirus y virus del herpes simple. Los virus pueden infectar células en división, células que no se dividen o tanto células en división como células que no se dividen. Los virus pueden integrarse en el genoma del huésped o, alternativamente, no integrarse en el genoma del huésped. Dichos virus también pueden diseñarse para tener una inmunidad reducida. Los virus pueden ser competentes para la replicación o pueden ser defectuosos en la replicación (p. ej., defectuosos en uno o más genes necesarios para rondas adicionales de replicación y/o empaquetamiento del virión). Los virus pueden causar una expresión transitoria o una expresión más duradera. El vector viral puede modificarse genéticamente a partir de sus contrapartes silvestre. Por ejemplo, el vector viral puede comprender una inserción, deleción o sustitución de uno o más nucleótidos para facilitar la clonación o de tal manera que cambie una o más propiedades del vector. Dichas propiedades pueden incluir la capacidad de empaquetamiento, eficiencia de transducción, inmunogenicidad, integración del

genoma, replicación, transcripción y traducción. En algunos ejemplos, se puede delecionar una parte del genoma viral de manera que el virus sea capaz de empaquetar secuencias exógenas que tengan un tamaño mayor. En algunos ejemplos, el vector viral puede tener una mejor eficiencia de transducción. En algunos ejemplos, puede reducirse la respuesta inmunitaria inducida por el virus en un huésped. En algunos ejemplos, los genes virales (como la integrasa) que promueven la integración de la secuencia viral en el genoma del huésped pueden mutar de tal manera que el virus no se integre. En algunos ejemplos, el vector viral puede tener una replicación defectuosa. En algunos ejemplos, el vector viral puede comprender secuencias de control transcripcionales o traduccionales exógenas para estimular la expresión de secuencias codificantes en el vector. En algunos ejemplos, el virus puede depender del auxiliar. Por ejemplo, el virus puede necesitar uno o más virus auxiliares para suministrar los componentes virales (como las proteínas virales) necesarios para amplificar y empaquetar los vectores en partículas virales. En tal caso, uno o más componentes auxiliares, incluidos uno o más vectores que codifican los componentes virales, pueden introducirse en una célula huésped o población de células huésped junto con el sistema de vectores descrito en la presente descripción. En otros ejemplos, el virus puede no necesitar auxiliares. Por ejemplo, el virus puede ser capaz de amplificar y empaquetar

los vectores sin un virus auxiliar. En algunos ejemplos, el sistema de vectores descrito en la presente descripción también puede codificar los componentes virales necesarios para la amplificación y el empaquetamiento del virus.

Los títulos virales ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{16} vg/ml. Otros títulos virales ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{16} vg/kg del peso corporal.

La introducción de ácidos nucleicos y proteínas también puede lograrse mediante el suministro mediado por nanopartículas lipídicas (LNP). Por ejemplo, el suministro mediado por LNP puede usarse para suministrar una combinación de ARNm de Cas y ARN guía o una combinación de proteína Cas y ARN guía. El suministro mediado por LNP puede usarse para entregar un ARN guía en la forma de ARN. En un ejemplo específico, el ARN guía y la proteína Cas se introducen cada uno en la forma de ARN a través del suministro mediado por LNP en el mismo LNP. Como se analiza con más detalle en otra parte de la presente descripción, se pueden modificar uno o más de los ARN. Por ejemplo, los ARN guía pueden modificarse para que comprendan una o más modificaciones del extremo estabilizador en el extremo 5’ y/o el extremo 3’. Tales modificaciones pueden incluir, por ejemplo, uno o más enlaces de fosforotioato en el extremo 5’ y/o el extremo 3’ o una o más modificaciones 2’-O-metilo

en el extremo 5’ y/o el extremo 3’. Como otro ejemplo, las modificaciones del ARNm de Cas pueden incluir la sustitución con pseudouridina (p. ej., sustitución completa con pseudouridina), caperuzas 5’ y poliadenilación. Como otro ejemplo, las modificaciones del ARNm de Cas pueden incluir la sustitución con N1-metil-pseudouridina (p. ej., totalmente sustituido con N1-metil-pseudouridina), caperuzas 5’ y poliadenilación. También se contemplan otras modificaciones como se describe en otra parte de la presente descripción. El suministro a través de tales métodos puede dar como resultado una expresión transitoria de Cas y/o una presencia transitoria del ARN guía, y los lípidos biodegradables mejoran la eliminación, mejoran la tolerabilidad y disminuyen la inmunogenicidad. Las formulaciones de lípidos pueden proteger las moléculas biológicas de la degradación al tiempo que mejoran su absorción celular. Las nanopartículas lipídicas son partículas que comprenden una pluralidad de moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí por fuerzas intermoleculares. Estas incluyen microesferas (incluidas vesículas unilaminares y multilaminares, p. ej., liposomas), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión. Tales nanopartículas lipídicas pueden usarse 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 los lípidos neutros (es decir, lípidos sin carga o zwitteriónicos), lípidos aniónicos, lípidos auxiliares que mejoran la transfección y lípidos ocultos que aumentan el tiempo durante el cual pueden existir las nanopartículas *in vivo*. Se pueden encontrar ejemplos de lípidos catiónicos, lípidos neutros, lípidos aniónicos, lípidos auxiliares y lípidos sigilosos adecuados en WO 2016/010840 A1 y WO 2017/173054 A1, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. Una nanopartícula lipídica ilustrativa puede comprender un lípido catiónico y uno o más de otros componentes. En un ejemplo, el otro componente puede comprender un lípido auxiliar tal como el colesterol. En otro ejemplo, los otros componentes pueden comprender un lípido auxiliar como el colesterol y un lípido neutro como el DSPC. En otro ejemplo, los otros componentes pueden comprender un lípido auxiliar como el colesterol, un lípido neutro opcional como DSPC y un lípido oculto como S010, S024, S027, S031 o S033.

La LNP puede contener uno o más o todos los siguientes: (i) un lípido para la encapsulación y para el escape endosómico; (ii) un lípido neutro para la estabilización; (iii) un lípido auxiliar para la estabilización; y (iv) un lípido sigiloso. *Ver, p. ej.*, Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235 y WO 2017/173054 A1,

cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia para todos los propósitos. En ciertas LNP, la carga puede incluir un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía. En ciertas LNP, la carga puede incluir un ARNm que codifica una nucleasa Cas, como Cas9, y un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía. En ciertas LNP, la carga puede incluir un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio. En ciertas LNP, la carga puede incluir un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como la Cas9, un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía y un constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio. Las LNP para usar en los métodos se describen con más detalle en otra parte de la presente descripción.

El modo de suministro puede seleccionarse para disminuir la inmunogenicidad. Por ejemplo, una proteína Cas y un ARNg pueden suministrarse mediante diferentes modos (p. ej., suministro bimodal). Estos diferentes modos pueden conferir propiedades farmacodinámicas o farmacocinéticas diferentes a la molécula suministrada en cuestión (p. ej., codificación de ácido nucleico o Cas, codificación de ácido nucleico o ARNg o constructo de ácido nucleico de proteína terapéutica multidominio. Por ejemplo, los diferentes modos pueden resultar en una distribución tisular diferente, una vida media diferente o una distribución temporal diferente. Algunos modos de

suministro (p. ej., el suministro de un vector de ácido nucleico que persiste en una célula por replicación autónoma o integración genómica) dan como resultado una expresión y presencia de la molécula más persistentes, mientras que otros modos de suministro son transitorios y menos persistentes (p. ej., el suministro de un ARN o una proteína). El suministro de proteínas Cas de una manera más transitoria, por ejemplo como ARNm o proteína, puede garantizar que el complejo Cas/gRNA solo se encuentre presente y activo durante un corto período de tiempo y puede reducir la inmunogenicidad causada por los péptidos de la enzima Cas derivada de bacterias que se muestra en la superficie de la célula mediante las moléculas MHC. Tal suministro transitorio también puede reducir la posibilidad de modificaciones no deseadas.

La administración *in vivo* puede ser por cualquier vía adecuada que incluye, por ejemplo, las vías sistémicas de administración tal como la administración parenteral, p. ej., intravenosa, subcutánea, intraarterial o intramuscular. En un ejemplo específico, la administración *in vivo* es intravenosa.

Las composiciones que comprenden los ARN guía y/o las proteínas Cas (o los ácidos nucleicos que codifican los ARN guía y/o las proteínas Cas) pueden formularse usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológica y farmacéuticamente aceptables. La formulación

puede depender de la vía de administración elegida. Farmacéuticamente aceptable significa que el vehículo, diluyente, excipiente o auxiliar es compatible con los demás ingredientes de la formulación y no es sustancialmente perjudicial para el receptor de esta. En un ejemplo específico, la vía de administración y/o la formulación elegida para el suministro al hígado (p. ej., hepatocitos).

Los métodos descritos en la presente descripción pueden aumentar los niveles de la proteína terapéutica multidominio o proteína GAA y/o los niveles de la proteína terapéutica multidominio o actividad de GAA en una célula o sujeto (p. ej., niveles circulantes, séricos o plasmáticos en un sujeto) y pueden comprender la medición de la proteína terapéutica multidominio o niveles de proteína GAA y/o la proteína terapéutica multidominio o niveles de actividad de GAA en una célula o sujeto (p. ej., niveles circulantes, séricos o plasmáticos en un sujeto). En un ejemplo, los métodos dan como resultado una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio. Por ejemplo, los métodos pueden dar como resultado niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica

la proteína terapéutica multidominio. Los métodos también pueden dar como resultado una mayor actividad de proteína terapéutica multidominio o actividad GAA en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio. Los niveles de proteína terapéutica multidominio circulante o actividad de GAA pueden medirse usando métodos bien conocidos.

En algunos métodos, los niveles de actividad y/o expresión de GAA en un sujeto aumentan hasta aproximadamente o al menos aproximadamente 2 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 25 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 75 % o al menos aproximadamente 100 % o más del nivel normal. En algunos métodos, los niveles de actividad y/o expresión de GAA en un sujeto aumentan hasta aproximadamente o al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 75 % o al menos aproximadamente 100 % o más de nivel normal. En ciertas modalidades, el nivel de expresión o actividad se mide en una célula o tejido en el que se encuentra presente un signo o síntoma de pérdida de función de GAA. Por ejemplo, cuando la pérdida de función da como resultado una disfunción

muscular, el nivel o la actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA se mide en una célula muscular. Se entiende que dependiendo de la proteína exógena el nivel de actividad de la proteína terapéutica multidominio puede no compararse 1:1 con una proteína GAA nativa basada en el peso. En tal modalidad, puede compararse la actividad relativa de la proteína terapéutica multidominio y la GAA nativa. En ciertas modalidades, la pérdida de la función es casi total de tal manera que no puede determinarse una actividad relativa. En ciertas modalidades, la comparación se realiza con un sujeto de control apropiado. La selección de un sujeto de control apropiado se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. En determinadas modalidades, el nivel de expresión es suficiente para tratar al menos un signo o síntoma resultante de la pérdida de función de la GAA. La actividad de GAA puede evaluarse mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, para evaluar la actividad de GAA (o deficiencias de actividad), los ensayos basados en sangre pueden medir la actividad de GAA en gotas de sangre seca o sangre fresca. La actividad de GAA también puede medirse en fibroblastos de una biopsia de piel o una biopsia de músculo. Otras medidas secundarias pueden ser la medición de tetrasacáridos de glucosa en orina mediante espectrometría de masas.

En algunos métodos, los niveles de proteína terapéutica multidominio circulante (es decir, los niveles

séricos) son aproximadamente o al menos aproximadamente 0,5, aproximadamente o al menos aproximadamente 1, aproximadamente o al menos aproximadamente 2, aproximadamente o al menos aproximadamente 3, aproximadamente o al menos aproximadamente 4, aproximadamente o al menos aproximadamente 5, aproximadamente o al menos aproximadamente 6, aproximadamente o al menos aproximadamente 7, aproximadamente o al menos aproximadamente 8, aproximadamente o al menos aproximadamente 9, o aproximadamente o al menos aproximadamente 10 µg/ml. En algunos métodos, los niveles de la proteína terapéutica multidominio son al menos aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente µ1 g/ml. En algunos métodos, los niveles de proteína terapéutica multidominio son al menos aproximadamente 2 µg/ml o aproximadamente 2 µg/ml. En algunos métodos, los niveles de proteína terapéutica multidominio son al menos aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 5 µg/ml. En algunos métodos, los niveles de proteína terapéutica multidominio son de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml a

aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml. Por ejemplo, el método puede resultar en niveles de la proteína terapéutica multidominio de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml o 2 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml. Por ejemplo, el método puede dar como resultado niveles de proteína terapéutica multidominio de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml o 5 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 1 mes después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 2 meses después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 3 meses después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 4 meses después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 5 meses después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 6 meses después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 9 meses después de la administración. En algunas modalidades, los niveles de expresión enumerados son al menos 12 mes después de la administración.

En algunos métodos, el método aumenta la expresión y/o la actividad de GAA o la proteína terapéutica multidominio por encima de la expresión y/o actividad del valor de referencia del sujeto (es decir, la expresión y/o la actividad antes de la administración). En algunos métodos, el método aumenta la expresión y/o actividad de GAA por encima de la expresión y/o actividad del valor de referencia del sujeto (es decir, la expresión y/o actividad antes de la administración. En algunos métodos, la actividad de GAA y/o la expresión de GAA o los niveles séricos en un sujeto aumentan aproximadamente o al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 25 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 75 % o aproximadamente o al menos aproximadamente 100 % o más, en comparación con la expresión de GAA del sujeto o los niveles séricos y/o la actividad (p. ej., la actividad de GAA) antes de la administración (es decir, los niveles del valor de referencia del sujeto). Se entiende que dependiendo de la proteína terapéutica multidominio, el nivel de actividad de la proteína terapéutica multidominio puede no compararse 1:1 con una proteína nativa basada en el peso. En tal modalidad, puede compararse la actividad relativa de la proteína terapéutica multidominio y la GAA nativa. En ciertas modalidades, la pérdida de la función es casi total

de tal manera que no puede determinarse una actividad relativa. En determinadas modalidades, el nivel de expresión es suficiente para tratar al menos un signo o síntoma resultante de la pérdida de función de la GAA.

En algunos métodos, el método aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína terapéutica multidominio por encima de la expresión y/o actividad del valor de referencia de la célula (es decir, la expresión y/o la actividad antes de la administración). En algunos métodos, el método aumenta la expresión y/o actividad de GAA por encima de la expresión y/o actividad del valor de referencia de la célula (es decir, la expresión y/o actividad antes de la administración. En algunos métodos, los niveles de actividad y/o expresión de GAA en una célula o población de células (p. ej., células hepáticas o hepatocitos) aumentan aproximadamente o al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 25 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente o al menos aproximadamente 100 % o más, en comparación con los niveles de actividad y/o expresión de GAA antes de la administración (es decir, los niveles del valor de referencia del sujeto). Se entiende que dependiendo de la proteína terapéutica multidominio, el nivel de actividad de la proteína terapéutica multidominio puede no compararse 1:1 con una

proteína GAA nativa basada en el peso. En tal modalidad, se puede comparar la actividad relativa de la proteína terapéutica multidominio y la proteína GAA nativa. En ciertas modalidades, la pérdida de función de GAA es casi completa de manera que no se puede determinar una actividad relativa. En determinadas modalidades, el nivel de expresión es suficiente para tratar al menos un signo o síntoma resultante de la pérdida de función de la GAA.

En un ejemplo específico, los niveles de actividad de GAA en un sujeto aumentan hasta no más que aproximadamente 300 %, no más que aproximadamente 250 %, no más que aproximadamente 200 % o no más que aproximadamente 150 % de los niveles normales de actividad de GAA normales.

En un ejemplo específico, los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan hasta al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales. En un ejemplo específico, los

niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan hasta al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales.

En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica) y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales. En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de

aparición infantil clásica) y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales.

En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica o no clásica) y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan hasta al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales (p. ej., al menos aproximadamente 10 %, al

menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 % %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales). En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica o no clásica), y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales.

En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición tardía y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 5 %, al

menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales (p. ej., al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales).

En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica), y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan más que aproximadamente 1 %, más que aproximadamente 5 %, más que aproximadamente 10 %, más que aproximadamente 15 %, más que aproximadamente 20 %, más que aproximadamente 25 %, más que

aproximadamente 30 %, más que aproximadamente 35 %, más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 % o más que aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales. En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica) y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan a más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 %, o más que aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales

En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica o no clásica), y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan a más que aproximadamente 2 % más que aproximadamente 5 % aproximadamente, más que aproximadamente 10 %, más que aproximadamente 15 %, más que

aproximadamente 20 %, más que aproximadamente 25 %, más que aproximadamente 30 %, más que aproximadamente 35 %, más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 % o más que aproximadamente 100 % de los niveles normales de actividad de GAA (p. ej., más que aproximadamente 10 %, más que aproximadamente 15 %, más que aproximadamente 20 %, más que aproximadamente 25 %, más que aproximadamente 30 %, más que aproximadamente 35 %, más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 % o más que aproximadamente 100 % de los niveles normales de actividad de GAA). En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil (p. ej., la enfermedad de Pompe de aparición infantil clásica o no clásica) y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan a más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que

aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 %, o más que aproximadamente 100 % de los niveles de actividad de GAA normales.

En un ejemplo específico, un sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición tardía y los niveles de actividad de GAA en el sujeto aumentan a más que aproximadamente 2 % más que aproximadamente 5 %, más que aproximadamente 10 %, más que aproximadamente 15 %, más que aproximadamente 20 %, más que aproximadamente 25 %, más que aproximadamente 30 %, más que aproximadamente 35 %, más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 % o más que aproximadamente 100 % de los niveles normales de actividad de GAA (p. ej., más que aproximadamente 40 %, más que aproximadamente 45 %, más que aproximadamente 50 %, más que aproximadamente 55 %, más que aproximadamente 60 %, más que aproximadamente 65 %, más que aproximadamente 70 %, más que aproximadamente 75 %, más que aproximadamente 80 %, más que aproximadamente 85 %, más que aproximadamente 90 % o más que aproximadamente 100 % de los niveles normales de actividad de GAA).

En algunos métodos, el método da como resultado una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto (p. ej., sujeto neonatal) en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica el polipéptido de interés en un sujeto de control. En algunos métodos, el método da como resultado mayores niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto (p. ej., sujeto neonatal) en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica el polipéptido de interés en un sujeto de control.

En algunos métodos, el método aumenta la expresión o la actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA sobre la expresión o actividad del valor de referencia del sujeto (p. ej., del sujeto neonatal) de la proteína terapéutica multidominio o GAA (es decir, cualquier cambio porcentual en la expresión que sea mayor que las típicas barras de error). En algunos métodos, el método da como resultado la expresión de la proteína terapéutica multidominio o GAA a un nivel detectable por encima de cero, p. ej., a un nivel estadísticamente significativo, un nivel clínicamente relevante.

Algunos métodos comprenden lograr un efecto duradero o sostenido en un ser humano, tal como un efecto de al menos 8 semanas, al menos 24 semanas, por ejemplo, al menos 1 año u opcionalmente al menos 2 años, y en algunas

modalidades, un efecto de al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años. Algunos métodos comprenden lograr el efecto terapéutico en un ser humano de una manera duradera y sostenida, tal como un efecto de al menos 8 semanas, al menos 24 semanas, por ejemplo, al menos 1 año u opcionalmente al menos 2 años, y en algunas modalidades, un efecto de al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años. En algunos métodos, la proteína terapéutica multidominio aumentada o la actividad y/o el nivel de expresión de GAA en un ser humano es estable durante al menos 8 semanas, al menos 24 semanas, por ejemplo, al menos 1 año, opcionalmente al menos 2 años, y en algunas modalidades, al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años. En algunos métodos, se logra una actividad y/o un nivel de estado estacionario de la proteína terapéutica multidominio o GAA en un ser humano en al menos 7 días, al menos 14 días o al menos 28 días, opcionalmente al menos 56 días, al menos 80 días. días o al menos 96 días. En métodos adicionales, el método comprende mantener la proteína terapéutica multidominio o la actividad y/o los niveles de GAA después de una dosis única en un ser humano durante al menos 8 semanas, al menos 16 semanas o al menos 24 semanas, o en algunas modalidades al menos 1 año o al menos 2 años, opcionalmente al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años. Por ejemplo, la expresión de la proteína terapéutica multidominio o GAA se puede sostener en el sujeto humano durante al menos aproximadamente 8 semanas,

al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 24 semanas, en ciertas modalidades, al menos aproximadamente 1 año o al menos aproximadamente 2 años después del tratamiento y, en algunas modalidades, al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años después del tratamiento. De la misma manera, la actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA se puede sostener en el sujeto humano durante al menos aproximadamente 8 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 24 semanas, en ciertas modalidades, al menos aproximadamente 1 año o al menos aproximadamente 2 años después del tratamiento y, en algunas modalidades, al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años después del tratamiento. En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA se mantiene a un nivel más alto que la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA antes del tratamiento (es decir, el valor de referencia del sujeto). En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA se considera sostenida si se mantiene en un nivel de expresión o actividad terapéuticamente efectiva. Las duraciones relativas, en otros organismos, se entienden basadas, p. ej., en la duración de la vida y las etapas de desarrollo, se abarcan dentro de la descripción anterior. En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio o GAA se considera “sostenida” si

la expresión o actividad en un ser humano a los seis meses después de la administración, un año después de la administración o dos años después de la administración, la expresión o actividad se encuentra en menos 50 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medido para ese sujeto. En determinadas modalidades, a los seis meses, p. ej., de 24 semanas a 28 semanas, después de la administración, la expresión o actividad es al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medida para ese sujeto. En ciertas modalidades, al año, es decir, aproximadamente 12 meses, p. ej., a los 11-13 meses, después de la administración, la expresión o actividad es al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medido para ese sujeto. En ciertas modalidades, a los dos años, es decir, aproximadamente 24 meses, p. ej., a los 23-25 meses, después de la administración, la expresión o actividad es al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medido para ese sujeto. En ciertas modalidades, seis meses después de la administración, la expresión o actividad es al menos 50 %, preferentemente al menos 60 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medido para ese sujeto. En ciertas modalidades, un meses después

de la administración, la expresión o actividad es al menos 50 %, preferentemente al menos 60 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medido para ese sujeto. En ciertas modalidades, dos años después de la administración, la expresión o actividad es al menos 50 %, preferentemente al menos 60 % de la expresión o actividad del nivel máximo de expresión o actividad medido para ese sujeto. En modalidades preferidas, el sujeto tiene un control de rutina de los niveles de expresión o actividad del polipéptido, p. ej., semanalmente, mensualmente, particularmente poco después de la administración, p. ej., dentro de los primeros seis meses. Las mediciones periódicas pueden establecer que el efecto sobre la expresión o la actividad se mantiene en, p. ej., 6 meses después de la administración, un año después de la administración o dos años después de la administración. En algunos métodos en sujetos neonatales, la expresión de la proteína terapéutica multidominio o GAA se sostiene cuando el sujeto neonatal se convierte en adulto. En algunos métodos, la expresión de la proteína terapéutica multidominio o GAA se sostiene durante toda la vida del sujeto o del sujeto neonatal.

En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 24 semanas después de la administración. En algunos métodos, la

expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración. En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 24 semanas después de la administración. En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración. En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 2 años después de la administración. En algunos métodos, la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 24 semanas después de la administración.

En algunos métodos que implican la inserción en un locus *ALB*, los niveles de albúmina circulante del sujeto o los niveles de albúmina de la célula son normales. Dichos métodos pueden comprender mantener los niveles de albúmina

circulante del sujeto o los niveles de albúmina de la célula dentro de ±5 %, ±10 %, ±15 %, ±20 % o ±50 % de los niveles de albúmina circulante normales o los niveles de albúmina normales. En algunos métodos, los niveles de albúmina del sujeto o de la célula no cambian en comparación con los niveles de albúmina de los individuos no tratados al menos en la semana 4, al menos en la semana 8, al menos en la semana 12 o al menos en la semana 20. En algunos métodos, los niveles de albúmina del sujeto o de la célula caen transitoriamente y después vuelven a los niveles normales. En particular, los métodos pueden comprender no detectar alteraciones significativas en los niveles de albúmina en plasma.

En algunos métodos, el método comprende además evaluar la inmunidad anti-GAA preexistente en un sujeto antes de administrar cualquiera de los constructos de ácido nucleico descritos en la presente descripción. Por ejemplo, dichos métodos podrían comprender evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales (TAb) o un ensayo de anticuerpos neutralizantes (NAb). En algunos métodos, al sujeto no se le ha administrado previamente proteína GAA recombinante.

En algunos métodos, el método comprende además evaluar la inmunidad anti-AAV preexistente (por ejemplo, anti-AAV8) en un sujeto antes de administrar cualquiera de los constructos de ácido nucleico descritos en la presente

descripción. Por ejemplo, dichos métodos podrían comprender evaluar la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales (TAb) o un ensayo de anticuerpos neutralizantes (NAb). *Ver, p. ej.*, Manno et al., (2006) *Nat. Med.* 12(3):342-347, Kruzik et al. (2019) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 14:126-133, y Weber (2021) *Front. Immunol.* 12:658399, cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos. En algunas modalidades, los ensayos de TAb buscan anticuerpos que se unan al vector AAV, mientras que los ensayos de NAb evalúan si los anticuerpos que están presentes impiden que el vector AAV transduzca células objetivo. Con ensayos de TAb, se puede usar el medicamento o una cápside vacía para capturar los anticuerpos; Los ensayos de NAb pueden requerir un vector indicador (p. ej., una versión del vector AAV que codifica luciferasa).

Todas las presentaciones de patentes, sitios web, otras publicaciones, números de acceso y lo similar citados anteriores o a continuación se incorporan por referencia en su totalidad para todos los propósitos en la misma medida que si cada elemento individual se indicara específica e individualmente para ser incorporado por referencia. Si diferentes versiones de una secuencia se asocian con un número de acceso en diferentes momentos, se entiende la versión asociada con el número de acceso en la fecha de presentación efectiva de esta solicitud. La fecha de

presentación efectiva significa la fecha anterior de la fecha de presentación real o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad con referencia al número de acceso, si corresponde. De la misma manera, si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio web o lo similar en diferentes momentos, se entenderá la versión publicada más recientemente a la fecha efectiva de presentación de la solicitud, a menos que se indique lo contrario. Cualquier característica, etapa, elemento, modalidad o aspecto de la invención puede usarse en combinación con cualquier otro a menos que se indique específicamente lo contrario. Aunque la presente invención se ha descrito con cierto detalle a manera de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad y comprensión, será evidente que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de letras estándar para las bases de nucleótidos y un código de tres letras para los 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 se encuentra incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. Cuando se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos, se entiende que también se proporcionan variantes degeneradas de codón de esta 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 9. Descripción de las secuencias.

Sec. con núm. de ident.	**Tipo**	**Descripción**
1	ARN	ARNm Cas9
2	ARN	CDS de ARNm de Cas9
3	ADN	CDS de Cas9
4	ADN	Intrón 1 *ALB* humano
5	ADN	Secuencia diana del ARN guía más PAM v1
6	ADN	Secuencia diana del ARN guía más PAM v2
7	ADN	Secuencia diana del ARN guía más PAM v3
8	Proteína	Proteína SpCas9 V1
9	ADN	ADN de SpCas9 V1
10	ADN	ARNm de SpCas9 (ADNc)
11	Proteína	Proteína SpCas9 V2
12	ARN	ARNm de SpCas9 V2
13	Proteína	NLS SV40 v1
14	Proteína	NLS SV40 v2
15	Proteína	NLS de nucleoplasmina
16	ARN	ARNcr cola v1

Sec. con núm. de ident.	Tipo	Descripción
17	ARN	ARNcr cola v2
18	ARN	ARNtracr v1
19	ARN	ARNtracr v2
20	ARN	ARNtracr v3
21	ARN	Andamiaje de ARNg v1
22	ARN	Andamiaje de ARNg v2
23	ARN	Andamiaje de ARNg v3
24	ARN	Andamiaje de ARNg v4
25	ARN	Andamiaje de ARNg v5
26	ARN	Andamiaje de ARNg v6
27	ARN	Andamiaje de ARNg v7
28	ARN	Andamiaje de ARNg v8
29	ARN	Andamiaje de ARNg modificado
30-61	ARN	Secuencias de guía del intrón 1 *ALB* humano
62-125	ARN	Secuencias de ARNsg del intrón 1 *ALB* humano
126-157	ADN	Secuencias diana del ARN guía del intrón 1 *ALB* humano
158	ADN	ITR 145
159	ADN	ITR 141
160	ADN	ITR 130
161	ADN	SV40 poliA
162	ADN	bGH poliA
163	ADN	Aceptador de empalme del exón 2 *Alb* de ratón
164	ARN	Secuencia de guía del intrón 1 *Alb* de ratón g666
165	ADN	Secuencia diana del ARN guía del intrón 1 *Alb* de ratón g666
166-167	ARN	Secuencia de ARNsg del intrón 1 *Alb* de ratón g666
168	ADN	Complemento inverso ITR 145
169	ADN	SV40 poliA v2
170	Proteína	Proteína GAA humana (NP_000143.2)
171	ADN	ADNc/ARNm de GAA humana (NM_000152.5)
172	ADN	CDS de GAA humana (CCDS32760.1)
173	Proteína	Proteína humana GAA (70-952)
174	ADN	GAA humana (70-952) CDS
175	ADN	GAA humana (70-952) CDS – DC-0
176	ADN	GAA humana (70-952) CDS – GA-0
177	ADN	CDS – GS-0 de GAA humana (70-952)
178	ADN	GAA humana (70-952) CDS – GS-0v2
179	ADN	GAA humana (70-952) CDS – GS-1
180	ADN	GAA humana (70-952) CDS – GS-44

Sec. con núm. de ident.	Tipo	Descripción
181	ADN	GAA humana (70-952) CDS – GS-50
182	ADN	GAA humana (70-952) CDS – RE-8
183	Proteína	scFv anti-CD63 12450
184	ADN	scFv CDS anti-CD63 12450
185	ADN	12450 CDS – DC-0 de scFv anti-CD63
186	ADN	12450 CDS – GA-0 de scFv anti-CD63
187	ADN	12450 CDS – GS-0 de scFv anti-CD63
188	ADN	scFv CDS – GS-0v2 anti-CD63 12450
189	ADN	scFv CDS – GS-1 anti-CD63 12450
190	ADN	scFv CDS – GS-44 anti-CD63 12450
191	ADN	scFv CDS – GS-50 anti-CD63 12450
192	ADN	scFv CDS – RE-8 anti-CD63 12450
193	Proteína	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión
194	ADN	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión CDS
195	ADN	12450 CDS – DC-0 Proteína de fusión scFv:GAA (70-952) anti-CD63
196	ADN	12450 CDS – GA-0 Proteína de fusión scFv:GAA (70-952) anti-CD63
197	ADN	12450 CDS – GS-0 Proteína de fusión scFv:GAA (70-952) anti-CD63
198	ADN	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión CDS – GS-0v2
199	ADN	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión CDS – GS-1
200	ADN	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión CDS – GS-44
201	ADN	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión CDS – GS-50
202	ADN	scFv:GAA anti-CD63 12450 (70-952) proteína de fusión CDS – RE-8
203	ADN	Secuencia de codificación de glicina v1
204	ADN	Secuencia de codificación de glicina v2
205	ADN	CDS – 1 – DC de GAA humana (70-952)
206	ADN	CDS – 1 – GS de GAA humana (70-952)
207	ADN	GAA humana (70-952) CDS – 2 – DC
208	ADN	GAA humana (70-952) CDS – 2 – GS
209	ADN	GAA humana (70-952) CDS – 3 – DC
210	ADN	GAA humana (70-952) CDS – 3 – GS
211	ADN	GAA humana (70-952) CDS – 4 – DC
212	ADN	GAA humana (70-952) CDS – 4 – GS
213	Proteína	GAA_1 77
214	Proteína	GAA_2 22

Sec. con núm. de ident.	Tipo	Descripción
215	Proteína	GAA_3 61
216-537	ADN y proteína	Dominios en anticuerpos anti-hTfR, fragmentos de unión al antígeno o moléculas scFv
538-569	Proteína	scFv anti-hTfR
570	Proteína	12799B-2xG4S-GAA
571	Proteína	12839B-2xG4S-GAA
572	Proteína	12843B-2xG4S-GAA
573	Proteína	12847B-2xG4S-GAA
574	ADN	12799B-2xG4S-GAA
575	ADN	12839B-2xG4S-GAA
576	ADN	12843B-2xG4S-GAA
577	ADN	12847B-2xG4S-GAA
578-580	ADN	12799B-2xG4S-GAA optimizado
581-583	ADN	12843B-2xG4S-GAA optimizado
584-586	ADN	12847B-2xG4S-GAA optimizado
587	ADN	12799 GA 0 scFv anti-TfR
588	ADN	12799 GS 0 scFv anti-TfR
589	ADN	12799 GS 0v2 scFv anti-TfR
590	ADN	scFv anti-TfR 12843 GA 0
591	ADN	scFv anti-TfR 12843 GS 0
592	ADN	scFv anti-TfR 12843 GS 0v2
593	ADN	scFv anti-TfR 12847 GA 0
594	ADN	scFv anti-TfR 12847 GS 0
595	ADN	scFv anti-TfR 12847 GS 0v2
596	ADN	12799 scFv anti-TfR
597	ADN	scFv anti-TfR 12839
598	ADN	scFv anti-TfR 12843
599	ADN	scFv anti-TfR 12847
600	Proteína	Enlazador
601	Proteína	Dominio de luz constante Kappa
602	Proteína	Dominio pesado IgG1 CH1
603-672	Proteína	Cadenas ligeras y pesadas Fab
673	Proteína	Señal de péptido Ror1 *Mus musculus*
674	Proteína	Dominio pesado IgG4 CH1
675-706	Proteína	Secuencias adicionales anti-TfR scFv:GAA
707	ADN	12837scfv-GAA-1 0CpG 27
708	ADN	12837scfv-GAA-2 5CpG 27
709	Proteína	Secuencia N-terminal opcional
710	ADN	ITR 141 Complemento inverso
711	ADN	Complemento inverso ITR 130

Sec. con núm. de ident.	Tipo	Descripción
712	ADN	poliA SV40 V3
713	Proteína	Enlazador G4S 3X
714	Proteína	Enlazador G4S 2X
715-719	ADN	Secuencias de codificación del enlazador G4S 3X
720-726	ADN	Secuencias de codificación del enlazador G4S 2X
727	ADN	Secuencia de codificación del enlazador G4S 1X
728	ADN	pINT ITR130 12843 GAA nativa SV40pA
729	ADN	pINT ITR130 12843scFv:GAA 0CpG v0 (GA 0)
730	ADN	pINT ITR130 12843scFv:GAA 0CpG v1 (GS 0 v1)
731	ADN	pINT ITR130 12843scFv:GAA 0CpG v2 (GS 0 v2)
732	ADN	pINT ITR130 12847scFv:GAA nativa
733	ADN	pINT ITR130 12847scFv:GAA 0CpG v0 (GA 0)
734	ADN	pINT ITR130 12847scFv:GAA 0CpG v1 (GS 0 v1)
735	ADN	pINT ITR130 12847scFv:GAA 0CpG v2 (GS 0 v2)
736	ADN	pINT-ITR130-Anti-CD63:GAA GA 0

Ejemplos

Ejemplo 1. Desarrollo del sistema de inserción neonatal en el locus *Albúmina* en el hígado

Un sistema para la inserción mediada por nucleasas (p. ej., el CRISPR/Cas) de un transgén en un locus específico (p. ej., el intrón 1 *albúmina*) se desarrolló para producir una expresión duradera del transgén, incluso cuando se administra a neonatos. Los componentes ilustrativos del sistema, incluidos los usados en los ejemplos posteriores, se describen con más detalle a continuación.

Diseño y selección de ARN guía único

El locus *ALB* fue seleccionado como el sitio de inserción para las plantillas de ADN. Se generó una lista de ARN guía único (ARNsg) que se dirigen al intrón 1 *ALB* humano diana. *Ver* **Tabla 10**. Los ARNsg candidatos se sintetizaron y formularon en nanopartículas lipídicas (LNP) con ARNm de Cas9 para su evaluación *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 10. Guías de ARN del intrón 1 *ALB* humano

Guía de ARN	**Sec. con núm. de ident. (segmento dirigido al ADN)**	**Sec. con núm. de ident. (ARNsg no modificado)**	**Sec. con núm. de ident. (ARNsg modificado)**	**Sec. con núm. de ident. (Secuencia diana del ARN guía)**
G009844	30	62	94	126
G009851	31	63	95	127
G009852	32	64	96	128
G009857	33	65	97	129
G009858	34	66	98	130
G009859	35	67	99	131
G009860	36	68	100	132
G009861	37	69	101	133
G009866	38	70	102	134
G009867	39	71	103	135
G009868	40	72	104	136
G009874	41	73	105	137
G012747	42	74	106	138
G012748	43	75	107	139
G012749	44	76	108	140
G012750	45	77	109	141
G012751	46	78	110	142
G012752	47	79	111	143
G012753	48	80	112	144
G012754	49	81	113	145
G012755	50	82	114	146
G012756	51	83	115	147
G012757	52	84	116	148
G012758	53	85	117	149

G012759	54	86	118	150
G012760	55	87	119	151
G012761	56	88	120	152
G012762	57	89	121	153
G012763	58	90	122	154
G012764	59	91	123	155
G012765	60	92	124	156
G012766	61	93	125	157

Las LNP se cribaron por primera vez en hepatocitos humanos primarios (PHH, por sus siglas en inglés) usando un *nanoluc* bidireccional que codifica la plantilla de inserción de AAV como reportero. Las LNP que apoyaron la inserción dirigida de *nanoluc* se identificaron midiendo la proteína nanoluc secretada en el sobrenadante de los cultivos de PHH. A los candidatos que pasaron el cribado inicial de PHH se les evaluó su capacidad para respaldar *in vivo* la inserción de genes. Los mejores candidatos de los estudios *in vivo* fueron evaluados funcionalmente para el corte no deseado.

La LNP-g9860, que se formula con ARNsg 9860 dirigido a *ALB*, descrita con más detalle a continuación, se seleccionó basado en respaldar niveles sólidos de expresión transgénica en múltiples plataformas (hepatocitos primarios humanos y de primates no humanos, ratones humanizados *ALB* y primates no humanos), falta de sitios no deseados confirmados, traducción entre especies, falta de SNP humanos comunes en el sitio diana, baja variabilidad de la expresión transgénica dentro de los grupos y rendimiento en un rango de dosis. El sitio diana de ARNsg

9860 se conserva en monos cynomolgus. La LNP-g9860 no tenía sitios detectables no deseados en el genoma humano (la secuenciación de amplicón diana realizada en dos lotes de hepatocitos humanos primarios a niveles de edición de saturación no pudo validar ningún locus que no fuera la diana en *ALB*) y apoyó la expresión transgénica a través de la inserción en hepatocitos primarios humanos y de primates no humanos, ratones humanizados *ALB* y primates no humanos.

LNP-g9860

La LNP-g9860 fue desarrollada para su uso en el intrón 1 *ALB* humano. La LNP-g9860 es una nanopartícula lipídica que incluye un ARNsg de 100 nucleótidos de longitud (g9860) y ARNm que codifica Cas9, cada uno de los cuales se describe a continuación, encapsulada en una LNP compuesta por cuatro lípidos diferentes. La proteína Cas9, expresada a partir del ARNm de Cas9, se dirige a escindir el ADN cuando el ARNsg 9860 se une a la secuencia de ADN complementaria específica asociada con un PAM. La composición de la LNP se resume en **Tabla 11**. La LNP-g9860 comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: 50 mol % de lípido A, 9 mol % de DSPC, 38 mol % de colesterol y 3 mol % de PEG2k-DMG y se formula en un regulador acuoso compuesto por 50 mM de Tris-HCl, 45 mM NaCl, 5 % de sacarosa (p/v), a pH 7,4. La proporción N:P es de aproximadamente 6, y la proporción de ARNg:ARNm de Cas9 es de aproximadamente 1:2 en peso.

Tabla 11. Composición de nanopartículas lipídicas (LNP-g9860).

Componente	**Descripción**
Componentes farmacéuticos activos	ARNm Cas9 ARNsg (ARNg9860)
Excipientes lipídicos	Lípido A: (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato Colesterol DSPC PEG2K-DMG
Otros excipientes	Tris, NaCl, Sacarosa WFI

ARN guía único El ARN guía único (ARNsg 9860) usado en LNP-g9860 es un oligonucleótido de 100 unidades que contiene una secuencia de 20 nucleótidos que es complementaria a la región diana en el intrón 1 del gen *ALB* humano. La secuencia diana reconocida por g9860 se conserva en el mono cynomolgus en el intrón 1 del gen *mfAlb*. La secuencia para g9860 se expone en las sec. con núm. de ident.: 68 y 100. Las modificaciones químicas se incorporan al 100-mer durante la síntesis, que incluyen enlaces de fosforotioato (PS) en los extremos 5′ y 3′ del ARNsg y modificaciones 2′-O-metil a algunos de los azúcares del ARN.

ARNm de Cas9 El ARN mensajero de *Cas9* (ARNm) usado en LNP-g9860 se basa en la secuencia de la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. El ARNm que codifica Cas9 (sec. con núm. de ident.: 1, con una secuencia codificante (CDS) expuesta en la sec. con núm. de ident.: 2), tiene

una longitud de aproximadamente 4400 nucleótidos. La secuencia contiene una caperuza en 5', una región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) en 5', un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la proteína Cas9, una UTR en 3' y una cola poliA. La caperuza en 5' se genera cotranscripcionalmente mediante el uso de una estructura análoga a la caperuza sintética, conocida como análogo de caperuza antirreverso (ARCA). Los uracilos en la secuencia de ARNm han sido completamente reemplazados por una N^1metilpseudouridina modificada durante la transcripción *in vitro*. El extremo 5' del ARNm tiene una estructura análoga a la caperuza sintética. La cola poli-A tiene aproximadamente 100 nucleótidos.

LNP-g666

La LNP-g666 fue desarrollada para dirigirse al intrón 1 *Alb* de ratones. La LNP-g666 es la misma que LNP-g9860, excepto que la g9860 dirigida a la albúmina humana se reemplaza por g666, un ARN guía dirigido al intrón 1 *albúmina* del ratón. La secuencia para g666 se establece en las sec. con núms. de ident.: 166 y 167.

Vector rAAV8

Se desarrolló un vector AAV8 recombinante (rAAV8) para llevar las plantillas de inserción de ADN. El vector rAAV8 que lleva las plantillas de inserción de ADN es un

vector no replicante que es un vector basado en AAV derivado del serotipo 8 de AAV. El genoma es un ácido desoxirribonucleico (ADN) monocatenario, que comprende repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo. Las ITR flanquean la plantilla de inserción sin promotor. Las ITR de AAV que flanquean el casete se derivaron de AAV2. Las plantillas de inserción de ADN proporcionadas por el vector rAAV8 pueden diseñarse como plantillas sin promotor, confiando así en el promotor de expresión del locus *ALB* diana.

Ejemplo 2. Expresión duradera de la proteína FIX humana después de la inserción en ratones neonatales

Para comparar la expresión mediada por episomas con la expresión mediada por inserción en ratones adultos y neonatos, y para comparar diferentes vías de reparación del ADN en ratones adultos y neonatos, se compararon los niveles séricos de hFIX después de la administración de un episoma hFIX (expresión impulsada por el promotor hAAT), un plantilla de inserción bidireccional hFIX NHEJ, una plantilla de inserción hFIX HDR con brazos de homología de 500 pb y una plantilla de inserción hFIX HDR con brazos de homología de 800 pb. *Ver* Figura 1. Los ratones C57BL/6 neonatales se dosificaron en P0 o P1 con lo siguiente: (1) 4 mg/kg de LNP-g666 y 3e9 vg/ratón de rAAV8 con la plantilla hFIX-HDR-500; (2) 4 mg/kg de LNP-g666 y 3e9 vg/ratón de rAAV8 con la plantilla hFIX-HDR-800; (3) 4 mg/kg de LNP-g666

y 3e9 vg/ratón de rAAV8 con la plantilla hFIX-NHEJ; o (4) 3e9 vg/ratón de plantilla episomal rAAV8. Se usaron ratones inyectados con solución salina como control negativo. La secuencia de codificación de hFIX en el AAV episomal era una secuencia optimizada de codones que codificaba *F9* humanos de tipo salvaje. La secuencia de codificación hFIX en los dos constructos HDR era la secuencia codificante *F9* humana nativa con la mutación Padua (R338L). Se recogió sangre y se preparó plasma 1 semana, 2 semanas y 5 semanas después de la dosificación. Los niveles de hFIX se midieron mediante FIX ELISA humano. El experimento después se repitió en ratones adultos C57BL/6, y los ratones adultos se dosificaron con lo siguiente: (1) 0,8 mg/kg de LNP-g666 y 2e10 vg/ratón de rAAV8 con la plantilla hFIX-HDR-500; (2) 0,8 mg/kg de LNP-g666 y 2e10 vg/ratón de rAAV8 con la plantilla hFIX-HDR-800; (3) 0,8 mg/kg de LNP-g666 y 2e10 vg/ratón de rAAV8 con la plantilla hFIX-NHEJ; o (4) 2e10 vg/ratón de plantilla episomal rAAV8. Se usaron ratones inyectados con solución salina como control negativo. Se recogió sangre y se preparó plasma 1 semana, 2 semanas y 4 semanas después de la dosificación. Los resultados se muestran en **FIGURAS. 2A-2B** y **Tablas 12-14**. La expresión mediada por episomas fue baja incluso en el primer momento en comparación con la expresión mediada por inserción en neonatos y se perdió con el tiempo en neonatos. Se observó lo contrario en ratones adultos: la expresión mediada por

episomas fue mayor en el primer punto de tiempo y en puntos de tiempo posteriores en comparación con la expresión mediada por inserción en ratones adultos. Estos resultados confirmaron lo observado en un experimento similar anterior (datos no mostrados). En contraste con los resultados en los ratones neonatales, los niveles de hFIX se mantuvieron estables en ratones adultos con constructos episomales y de inserción, y el constructo episomal proporcionó la expresión más alta. *Ver las* **Figuras. 2A-2B** y **Tablas 12-14.**

Tabla 12. Niveles séricos de FIX humano (µg/ml) en ratones neonatales.

	Episoma								
W1	0,9	0,56	0,48	0,52	0,96	0,67	0,93	0,98	0,77
W2	0,2	0,11	0,12	0,14	0,15	0,17	0,22	0,21	0,15
W5	0,06	0,03	0,03	0,07	0,07	0,03	0,04	0,04	0,04
	NHEJ								
W1	14,22	19,28	14,12	18,67	21,69				
W2	16,08	17,25	16,07	17,66	21,39				
W5	12,29	12,41	14,18	16,61	13,71				
	HDR500								
W1	11,03	8,02	7,86	10,11					
W2	8,29	6,74	8,63	8,61					
W5	6,27	4,09	5,24	5,49					
	HDR800								
W1	3,86	6,44	6,52	4,43		1,41	2	3,58	2,71	2,07
W2	3,54	6,9	7,46	4,44	4,64	1,65	2,45	3,55	2,83	2,5
W5	2,4	3,49	3,48	3,33	3,77	0,77	2,19	2,7	2,5	1,68

Tabla 13. Niveles séricos de FIX humano (µg/ml) en ratones adultos.

	Episoma				
W1	16,69	15,57	18,97	14,17	9,82
W2	25,39	23,07	41,53	27,53	12,07
W4	39,97	26,61	39,63	28,5	14,28
	NHEJ				
W1	8,1	9,52	13,09	6,55	9,2
W2	9,15	8,12	8,18	6,46	7,27
W4	14,86	10,86	13,85	8,42	13
	HDR500				
W1	2,23	2,5	1,89	3,14	1,85
W2	1,2	2,62	1,55	2,41	1,34
W4	3,83	5,39	4,89	4,62	2,75
	HDR800				
W1	1,65	0,94	0,26	0,54	0,14
W2	0,69	1,52	0,24	0,67	0,46
W4	2,13	1,87	0,49	0,94	0,43

Tabla 14. Niveles séricos de FIX humano (µg/ml) en ratones neonatales.

Ratones núm.	**Grupo núm.**	**Semana 1 hF9 ug/ml**	**Semana 2 hF9 ug/ml**	**Semana 5 hF9 ug/ml**	**Mes 3 hF9 ug/ml**	**Mes 4 hF9 ug/ml**	**Mes 7 hF9 ug/ml**	**Mes 9 hF9 ug/ml**	**Mes 10 hF9 ug/ml**	**Mes 12 hF9 ug/ml**	**Mes 15 hF9 ug/ml**
1	**Control 1**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	**Control 2**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	**Control 3**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	**Control 4**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	**Control 5**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	**Control 6**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

7	**Control 7**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	**Control 8**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	**HDR500-1**	11,03	8,29	6,27	3,04	3,12	3,13	3,32	3,35	2,91	1,60
10	**HDR500-3**	8,02	6,74	4,09	3,05	2,51	2,59	2,80	2,98	2,95	1,54
11	**HDR500-4**	7,86	8,63	5,24	6,61	5,11	5,44	5,62	7,64	4,76	5,97
12	**HDR500-5**	10,11	8,61	5,49	5,68	6,60	5,43	5,33	7,89	5,00	7,00
13	**Episomal 1**	0,90	0,20	0,06	0,16	0,14	0,12	0,04	0,05	0,04	0,04
14	**Episomal 2**	0,56	0,11	0,03	0,09	0,09	0,08	0,03	0,03	0,04	0,06
15	**Episomal 3**	0,48	0,12	0,03	0,11	0,09	0,09	0,02	0,04	0,02	0,03
16	**Episomal 4**	0,52	0,14	0,07	0,14	0,11	0,09	0,03	0,02	0,02	0,05
17	**Episomal 5**	0,96	0,15	0,07	NA (el ratón murió)			NA (el ratón murió)			
18	**Episomal 6**	0,67	0,17	0,03	0,13	0,11	0,11	0,03	0,04	0,00	0,04
19	**Episomal 7**	0,93	0,22	0,04	0,13	0,09	0,09	0,09	0,05	0,04	0,03
20	**Episomal 8**	0,98	0,21	0,04	0,14	0,10	0,11	0,06	0,03	0,04	0,05
21	**Episomal 9**	0,77	0,15	0,04	0,14	0,15	0,12	0,05	0,03	0,05	0,07
22	**HDR800-1**	3,86	3,54	2,40	2,08	2,26	2,91	1,66	2,09	1,98	1,77
23	**HDR800-2**	6,44	6,90	3,49	3,47	3,36	3,49	ND	2,92	2,24	2,31
24	**HDR800-3**	6,52	7,46	3,48	2,80	3,62	3,45	2,71	2,70	1,95	2,54
25	**HDR800-4**	4,43	4,44	3,33	3,59	4,55	4,14	3,22	3,75	2,51	3,28
26	**HDR800-5**	NA	4,64	3,77	3,47	3,82	4,26	4,57	4,56	3,65	3,95
27	**HDR800-6**	1,41	1,65	0,77	1,54	1,48	1,19	3,35	1,50	1,47	1,60
28	**HDR800-7**	2,00	2,45	2,19	3,32	3,11	2,26	2,37	2,75	2,63	2,29
29	**HDR800-8**	3,58	3,55	2,70	2,16	2,09	2,36	1,58	2,04	1,59	2,08
30	**HDR800-9**	0,09	0,10	0,03	NA (el ratón murió)			NA (el ratón murió)			
31	**HDR800-10**	2,71	2,83	2,50	3,87	3,36	3,12	2,52	3,58	2,45	2,80
32	**HDR800-11**	2,07	2,50	1,68	1,35	1,66	1,28	1,15	1,45	1,01	1,50
33	**NHEJ 1**	6,45	5,75	NA (el ratón murió)				NA (el ratón murió)			
34	**NHEJ 2**	14,22	16,08	12,29	10,58	8,44	9,27	9,45	11,67	7,24	8,95
35	**NHEJ 3**	19,28	17,25	12,41	15,67	18,44	15,77	14,70	18,38	14,58	14,80
36	**NHEJ 4**	15,19	NA (el ratón murió)					NA (el ratón murió)			

37	**NHEJ 5**	14,12	16,07	14,18	17,28	15,39	14,79	16,99	18,47	14,32	14,68
38	**NHEJ 6**	18,67	17,66	16,61	19,46	21,53	22,32	18,93	23,21	19,53	21,90
39	**NHEJ 7**	18,23	NA (el ratón murió)					NA (el ratón murió)			
40	**NHEJ 8**	21,69	21,39	13,71	11,15	11,88	12,72	12,36	18,53	11,19	18,07

Estos experimentos demostraron que la expresión del *F9* insertado es duradera en hígados neonatales, lo que indica que la inserción de plantillas *F9* en el locus *albúmina* puede dar como resultado una expresión duradera en sujetos neonatales. Estos genomas de integración proporcionaron una expresión duradera que se mantuvo durante todo el experimento en ratones neonatales.

Ejemplo 3. Desarrollo de sistema de inserción neonatal y reactivos para el tratamiento de la enfermedad de Pompe

Un sistema para la inserción mediada por nucleasas (p. ej., el CRISPR/Cas) de un transgén anti-CD63:GAA o un transgén anti-TfR:GAA en un locus específico (p. Ej., el intrón 1 *albúmina*) se desarrolló para producir una expresión duradera de anti-CD63:GAA o anti-TfR:GAA, incluso cuando se administra a neonatos.

Los componentes ilustrativos del sistema para la inserción de anti-CD63:GAA, incluidos los usados en los ejemplos posteriores, se describen con más detalle a continuación. *Ver* **FIGURAS 3-5**. La plantilla de ADN anti-CD63:GAA en los ejemplos de trabajo que se describen a

continuación se lleva al hígado mediante un vector AAV8 recombinante, y los componentes de ARN CRISPR/Cas9 (ARNm de Cas9 y ARNsg) se suministran al hígado mediante el suministro mediado por LNP (**FIGURAS 3** y **5**). La proteína anti-CD63:GAA producida por el hígado se dirige a los lisosomas en el músculo al dirigirse a CD63, que es una proteína de rápida internalización altamente expresada en el músculo. *Ver la* **Figura 4.** El diseño y la selección de ARN guía único, LNP-g9860, ARNm de Cas9 y LNP-g666 fueron como se describe en el Ejemplo 1.

Los componentes ilustrativos del sistema para anti-TfR:GAA, incluidos los usados en los ejemplos posteriores, se describen con más detalle a continuación. *Ver las* **Figuras 15-17.** La plantilla de ADN anti-TfR:GAA en los ejemplos de trabajo que se describen a continuación se lleva al hígado mediante un vector AAV8 recombinante, y los componentes de ARN CRISPR/Cas9 (ARNm de Cas9 y ARNsg) se suministran al hígado mediante el suministro mediado por LNP (**FIGURAS 15** y **17**). La proteína anti-TfR:GAA producida por el hígado se dirige al músculo y al SNC al dirigirse a TfR, que se expresa en el músculo y en las células endoteliales del cerebro. La transcitosis de TfR en estas células permite el cruce de la barrera hematoencefálica. *Ver la* **Figura 16.** El diseño y la selección de ARN guía único, LNP-g9860, ARNm de Cas9 y LNP-g666 fueron como se describe en el Ejemplo 1.

Diseño y selección de plantillas de ADN

Se diseñó una plantilla de ADN para la inserción de un ácido nucleico que codifica fusiones anti-CD63:GAA en las que el extremo C de un fragmento variable de cadena única (scFv) se fusiona con el extremo N de los aminoácidos 70–952 de GAA con un enlazador de glicina-serina. La secuencia GAA (70-952) se expone en la sec. con núm. de ident.: 173 y está codificada por la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. La plantilla de ADN se expone en la sec. con núm. de ident.: 194 y codifica la proteína de fusión expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193. Un sitio aceptor de empalme se codifica corriente arriba del transgén anti-CD63:GAA, y una secuencia de poliadenilación se codifica corriente abajo del transgén anti-CD63:GAA. La secuencia aceptora de empalme en el extremo 5′ del transgén se derivó del aceptor de empalme del exón 2 *Alb* de ratón. La secuencia de poliadenilación en el extremo 3′ del transgén se derivó del virus de simio 40 (SV40).

Se diseñó una plantilla de ADN para la inserción de un ácido nucleico que codifica fusiones anti-TfR:GAA en las que el extremo C de un fragmento variable de cadena única (scFv) se fusiona con el extremo N de los aminoácidos 70–952 de GAA con un enlazador de glicina-serina. La secuencia GAA (70-952) se expone en la sec. con núm. de ident.: 173 y está codificada por la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 174. Un sitio aceptor de empalme se codifica

corriente arriba del transgén anti-TfR:GAA, y una secuencia de poliadenilación se codifica corriente abajo del transgén anti-TfR:GAA. La secuencia aceptora de empalme en el extremo 5’ del transgén se derivó del aceptor de empalme del exón 2 *Alb* de ratón. La secuencia de poliadenilación en el extremo 3’ del transgén se derivó del virus de simio 40 (SV40).

Vector rAAV8

Se desarrolló un vector AAV8 recombinante (rAAV8) para llevar las plantillas de inserción de ADN. El vector rAAV8 que lleva la plantilla de ADN anti-CD63:GAA (REGV044) es un vector no replicante que es un vector basado en AAV derivado del serotipo 8 de AAV. El genoma es un ácido desoxirribonucleico (ADN) monocatenario, que comprende repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo. Las ITR flanquean la plantilla de inserción sin promotor anti-CD63:GAA. Las ITR de AAV que flanquean el casete se derivaron de AAV2. La plantilla de ADN anti-CD63:GAA suministrada por el vector rAAV8 se diseñó como una plantilla sin promotor, por lo que se basa en el promotor de expresión del locus *ALB* diana.

El vector rAAV8 que lleva la plantilla de ADN anti-TfR:GAA es un vector no replicante que es un vector basado en AAV derivado del serotipo 8 de AAV. El genoma es un ácido desoxirribonucleico (ADN) monocatenario, que comprende repeticiones terminales inversas (ITR) en cada

extremo. Las ITR flanquean la plantilla de inserción sin promotor anti-TfR:GAA. Las ITR de AAV que flanquean el casete se derivaron de AAV2. La plantilla de ADN anti-TfR:GAA suministrada por el vector rAAV8 se diseñó como una plantilla sin promotor, por lo que se basa en el promotor de expresión del locus *ALB* diana.

Ejemplo 4. Expresión duradera de glucosidasa alfa (GAA) después de la inserción de una plantilla de ADN anti-CD63:GAA en ratones neonatales

A continuación, se diseñó una plantilla de ADN para la inserción de un ácido nucleico que codifica fusiones anti-CD63:GAA en las que el extremo C de un fragmento variable de cadena única anti-CD63 (scFv) se fusiona con el extremo N de GAA con una glicina- enlazador de serina (descrito anteriormente). Se probó la plantilla de inserción anti-CD63:GAA en un modelo de ratón con enfermedad de Pompe (PD), $Gaa^{-/-}$;$Cd63^{hu/hu}$, dónde *Gaa* fue reemplazada por LacZ y la región codificante de proteínas del locus *Cd63* fue reemplazado por su contraparte humana. Adulto (2 meses de edad) macho y hembra $Gaa^{-/-}$;$Cd63^{hu/hu}$ de ratones (62,5 % C57BL/6, 37,5 % 129Sv) se les dosificó por vía intravenosa lo siguiente: (1) 4e12 vg/kg de AAV8 recombinante que codifica anti-CD63:GAA (REGV042); o (2) 1 mg/kg de LNP-g666 y 1,2e13 vg/kg de plantilla de inserción anti-CD63:GAA de AAV8 recombinante (REGV044). El REGV042 es un AAV episomal

que usa un potenciador *hSerpina1* y un promotor *mTTR* para dar una expresión específica de hepatocitos de anti-CD63:GAA, que además incluye una señal de péptido de albúmina humana. Las secuencias codificantes de anti-CD63:GAA eran idénticas en REGV042 y REGV044 y se exponen en la sec. con núm. de ident.: 194. $Gaa^{-/-}$ sin tratar; Se usaron $Cd63^{hu/hu}$ de ratones y silvestres como controles. Se recogió sangre y se preparó suero a los 7 días, 30 días, 2 meses, 3 meses, 6 meses y 10 meses después de la administración, y se recogieron tejidos a los 10 meses después de la administración. Los niveles séricos de anti-CD63:GAA se cuantificaron mediante un ELISA de tipo sándwich basado en placa que detecta la porción scFv de la molécula. Se usó proteína purificada anti-CD63:GAA como estándar de proteína para la cuantificación. Los datos se muestran en la **FIGURA 6** y las **Tablas 15-16**. 10 meses después de la administración, se sacrificaron los animales y se cuantificaron los niveles de glucógeno en lisados de tejido muscular de los animales sacrificados. Los tejidos se diseccionaron de los ratones inmediatamente después del sacrificio por asfixia con CO_2, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C. Los tejidos se lisaron en un homogeneizador de sobremesa con bolillas de acero inoxidable en agua destilada para las mediciones de glucógeno o regulador RIPA para el análisis de proteínas. Los lisados del análisis de glucógeno se hirvieron y se centrifugaron para eliminar los residuos. Las

mediciones de glucógeno se realizaron fluorométricamente con un equipo comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (K646, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.). Como se muestra en la **FIGURA 7** y las **Tablas 17-19**, el glucógeno se redujo significativamente a niveles casi de tipo salvaje tanto en el grupo episomal como en el grupo de inserción en el corazón, cuádriceps y diafragma en ratones adultos.

Tabla 15. Niveles séricos de anti-CD63:GAA en µg/ml en el grupo de inserción de adultos.

Meses	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**
0,25	21,06	2,6	14,93	24,37	24,39	16,08	11,21	18,35	28,54	20,94		
1	16,43	1,85	17,92	13,45	3,7	18,88	19,37	26,6	19,8	28,72	26,63	19,97
2	13,15	2,95	13,82	6,06	11,51	6,45	9,5	8,05	11,61	19,2	12,07	14,09
3	14,49	2,53	7,22	6,04	5,75	4,62	10,19	5,75	14,8	12,93	6,61	10,26
6	12,92	3,13	12,08	8,18	5,54	2,48	9,08	8	18,66	2,78	5,03	15,15
10	16,5	2	7,5	10,6	2,3		2,4					

*Las celdas sin datos se debieron a muestras perdidas después de la recolección.

Tabla 16. Niveles séricos de anti-CD63:GAA en µg/ml en el grupo de adultos episomal.

Meses	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**M7**	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**
0,25	62,13	52,18	47,7	53,55	4,9	4,85	2,92	11,55	0	0	8,37	0,6
1	43,85	48,12	40,68	49,22	14,41	15,74	2,21	19,18	0	1,09	4,57	2,25
2	43,68	30,59	29,79	35,37	7,88	6,71	1,67	11,27	0	0,51	0,54	0
3	51,86	47,18	38,41	50,98	5,05	10,89	1,54	3,26	0	0	0,19	0,6
6	42,49	40,95	44,62	44,2	4,42	4,03	1,93	0,35	0	0	0,17	0,17
10	20,9	17,9	18	13,1	5,2	4,9	1,2	0,1	0	0	0	0

Tabla 17. Niveles de glucógeno en el grupo de adultos de inserción.

	M1	M2	M3	M4	M5	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Corazón	0,02	0,02	0,02	0,01	0,22	0,02	0,02	0,19	0,04	0,02	0,04	0,02
Cuádriceps	0,43	3,24	0,47	0,79	2,12	0,5	2,32	0,82	1,06	3,45	0,83	0,89
Diafragma	2,85	1,51	0,34	2,24	4,75	0,37	4,06	0,9	4,47	4,56	2,86	0,04
Médula espinal	4,28	8,11	5,82	1,38	3,41	5,46	6,68	5,63	4	4,62	5,57	7,02

Tabla 18. Niveles de glucógeno en el grupo de adultos episomal.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	F1	F2	F3	F4	F5
Corazón	0,18	0,13	0,22	0,02	0,18	0,02	0	1,04	15,39	4,99	5,74	0,13
Cuádriceps	0,87	0,54	0,72	0,27	0,71	0,85	2,78	6,09	12,05	10,46	11,31	2,89
Diafragma	2,39	1,62	3,41	1,22	2,13	0,32	0,75	6,41	9,94	9,7	8,58	2,89
Médula espinal	0,3	2,63	3,37	3,19	2,96	5,99	6,1	4,66	6,46	7,9	8,15	7,67

Tabla 19. Niveles de glucógeno en grupos de control de adultos.

	Ratones no tratados por Pompe (GAA-/-; CD63 hu/hu)				**Silvestre (GAA+/+ CD63hu/hu)**			
	M1	**M2**	**F1**	**F2**	**M1**	**M2**	**F1**	**F2**
Corazón	51,59	44,11	46,31	38,79	0,12	0,85	1,57	0,02
Cuádriceps	21,63				0	0,74	0	0
Diafragma	20,55	19,89	19,29	22,63	0	0,7	0,42	0,02
Médula espinal	9,05	3,5	7,17	7,78	0	0,77	0,96	0,05

*Las celdas sin datos se debieron a un error experimental.

Después se realizaron experimentos similares en los que $Gaa^{-/-}$ neonatal;$Cd63^{hu/hu}$ de ratones (62,5 % C57BL/6, 37,5 % 129Sv) se les dosificó por vía intravenosa en P1 lo

siguiente: (1) 8,2e12 vg/kg de AAV8 recombinante que codifica anti-CD63:GAA (REGV042); o (2) 4 mg/kg de LNP-g666 y 8,2e12 vg/kg de plantilla de inserción anti-CD63:GAA de AAV8 recombinante (REGV044). $Gaa^{-/-}$ sin tratar; Sé usaron $Cd63^{hu/hu}$ de ratones y silvestres como controles. Se recolectó sangre y se preparó suero a los 7 días, 30 días, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 12 meses, 13 meses y 15 meses, y se recolectaron tejidos a los 3 meses y 15 meses después de la administración. Como se muestra en las **Figuras 8A-8B** y las **Tablas 20-21**, por el contrario a lo que se observó cuando se administró a ratones adultos, los niveles séricos de anti-CD63:GAA se mantuvieron estables durante el transcurso de 15 meses en el grupo de inserción, pero el grupo episomal comenzó con niveles más bajos y disminuyeron por debajo del límite inferior de cuantificación mediante el uso del ensayo ELISA en suero dentro de 1 mes cuando se administró la dosis a los ratones neonatos. Similarmente, como se muestra en la **Figura 9A** y **Tabla 22**, el almacenamiento de glucógeno a los 3 meses se normalizó a niveles silvestres en corazón, cuádriceps, gastrocnemio, y diafragma en el grupo de inserción, pero no en el grupo episomal. De la misma manera, como se muestra en la **Figura 9B** y la **Tabla 23**, el almacenamiento de glucógeno a los 15 meses se normalizó a niveles silvestres en corazón, cuádriceps, gastrocnemio y diafragma en el grupo de

inserción, y el almacenamiento de glucógeno se corrigió parcialmente en los tejidos del CNS en el grupo de inserción, pero no en el grupo episomal.

Tabla 20. Niveles séricos de anti-CD63:GAA (µg/ml) en ratones neonatales con grupo de inserción.

	Inserción (AAV+LNP)																		
Meses	*	*	**	**	**								**				*	*	*
0,23	18,3	14,4	15,9	12,2	12,8	8,7	5,9	15,1	9,5	14,6	8,2	11,6	5,7	8,4	14	13,7	8,8	8,6	3,4
1	13,2	14,8	13,9	9	10,3	5,4	3,9	11,1	6,1	11,2	8	9,9	4,7	9,4	11,5	8,7	10,2	11,1	0
3	10,2	10,9				3,5	2,3	10,3	5,8	7,2	6,9	8,2	2,7	7,9	14,7	5,5	7,2	6,2	2,8
4						5,2	2,8	8,7	7,2	8,7	6,8	8,4		7,4	14,5	6,8			
5						7,1	4,1	12,1	6,6	10,2	8,1	9		8,5	16,6	8,8			
6						6,9	4,2	14,8	7	10,2	7	7,9		9,2	13,1	8			
7						8,9	4,9	17,5	11,2	10,4	9,9	10		9,1	13,4	9,6			
8						8,5	4,4	17	6	8,9	8,4	8,5		8,1	12,5	9,3			
9						5,9	3,1	10,7	5,2	25,4	7,5	5,9		6,5	9,4	6,2			
12						6,7	3,6	10,3	6,8	17,8	6,8	7,3		6,7	9,7	5,9			
13						4,6	3,7	17,4	4,2	17,0	N/A	6,1		5,3	10,3	5,6			
15						5,1	3,8	18,4	4,0	18,3	7,6	3,9		5,5	18,0	6,6			

*Ratón sacrificado a los 3 meses para un ensayo de glucógeno de 3 meses
**El ratón murió

Tabla 21. Niveles séricos de anti-CD63:GAA (µg/ml) en ratones neonatales con grupo episomal.

	AAV episomal										
Meses	*	*	*	**			**				
0,23	0	0	1,9	0	2,2	4,1	2,5	2,7	3,7	3,4	3,6
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0,4	0,5	0
4				0	0	0	0	0	0	0	0
5					0	0	0	0	0	0,6	0
6					0	0	0	0	0,5	0,6	0
7					0	0	0	0	0	0	0

8					0	0,5	0	0	0,5	1	0
9					0	0	0	0	0	0	0
12					0	0	0	0	0	0	0
13					0	0	0	0	0	0	0
15					0	0		0	0	0	0

*Ratón sacrificado

Tabla 22. Niveles de glucógeno (µg/mg de tejido) en ratones neonatales.

	KO no tratados				AAV episomal			Inserción de genes				
Corazón	20,16	18,52	20,14	21,92	0,16	0,1	0,1	0,08	0,06	0,08	0,04	0,02
Cuádriceps	8,96	10,83	9,89	9,63	4,18	2,13	4,21	0,89	0,77	0,82	0,1	0,58
Gastrocnemio	10,39	10,65	9,31	9,77	5,58	3,66	3,75	1,04	0,83	1,12	0,38	0,73
Diafragma	10,05	7,73	11,33	9,6	0,5	0,59	1,7	0,57	0,7	0,85	0,34	0,9

Tabla 23. Niveles de glucógeno (µg/mg de tejido) en ratones neonatales.

	Peso									
Corazón	0,18	0,03	0,09	0,12	0,04	0,04				
Cuádriceps	0,95	0,77	0,86	1,01	1,35	0,85				
Gastrocnemio	0,8	0,68	0,61	1,02	1,06	0,53				
Diafragma	0,6	0,12	2,24	1,25	0,22	0,03				
Cerebro	0,02664	0	0	0,04436	0	0,00255				
Médula espinal	0,01999	0	0	0	0,026	0				
	Sin tratar									
Corazón	40,73	42,15	45,87	46,84	39,15					
Cuádriceps	12,42	11,02	14,71	15,05	13,43					
Gastrocnemio	*	10,99	11,6	14,56	12,86					
Diafragma	16,49	10,57	18,33	17,3	11,87					
Cerebro	7,28	6,26	7,02	6,98	8,23					
Médula espinal	8,46	10,34	9,37	9,94	9,49					
	P1 episomal									
Corazón	0,42	0,17	0,69	0,21	0,09	0,09				

Cuádriceps	11,27	8,47	1,85	2,72	1,43	0,96				
Gastrocnemio	7,73	5,36	2,02	2,18	2,03	1,84				
Diafragma	3,09	0,8	0,74	0,76	0,33	0,42				
Cerebro	8,26	5,63	7,25	7,48	5,87	6,33				
Médula espinal	6,42	4,93	7,46	7,13	7,61	7,55				
	Inserción P1									
Corazón	0,04	0,12	0,13	0,06	0,25	2,1	0	0,05	0,04	0,07
Cuádriceps	0,6	0,64	0,68	0,54	0,58	0,61	0,27	0,85	0,35	0,5
Gastrocnemio	0,43	0,65	0,51	0,51	0,46	0,9	0,27	1,06	0,24	0,43
Diafragma	0,16	0,29	0,08	0,12	0,39	0,77	0	0	0,59	0,12
Cerebro	3,09	4,59	1,18	3,06	1,87	2,42	3,33	2,2	2,39	3,29
Médula espinal	3,61	4,89	1,88	3,55	1,03	3,79	3,39	3,72	2,23	3,42

Para evaluar si la reducción de glucógeno mejorada observada con la plantilla de inserción en ratones neonatales se tradujo en una función muscular mejorada, los ratones se probaron en aparatos de fuerza de agarre 15 meses después de la administración. La fuerza de agarre de las extremidades se midió con un medidor de fuerza (Columbus Instruments, Columbus, OH, EE. UU.). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Los ratones tratados con la plantilla de inserción mostraron un rendimiento significativamente mejorado en comparación con los ratones tratados con el constructo episomal en la prueba de fuerza de agarre. De hecho, la fuerza de agarre en el grupo de inserción siguió de cerca a la de los silvestres 15 meses después del tratamiento, mientras que no hubo diferencia en la fuerza de agarre en el grupo episomal seguido en comparación con el grupo no tratado. *Ver* **FIGURA 10** y **Tabla 24**. Estos resultados muestran que, en ratones neonatales,

el enfoque de inserción muestra una durabilidad de expresión muy mejorada en comparación con el enfoque episomal y una mejor reducción de sustrato, lo que indica que la inserción es el enfoque superior para las indicaciones pediátricas.

Tabla 24. Fuerza de agarre (Newtons) en ratones neonatales.

Silvestre	**KO no tratados**	**P1 inserción AAV+LNP**	**P1 AAV episomal P1**
2,21	1,39	2,44	1,83
2,21	1,63	2,34	1,47
2,52	1,48	2,51	0,94
2,55	1,66	2,68	1,81
2,81	1,37	3,13	2,2
2,69	2,27	0,95	2,61
3,29	1,5	2,99	
2,79		2,42	
		2,66	
		3,13	

Se realizó un experimento en $Gaa^{-/-}$ de 4 meses de edad; El $Alba^{hu/hu}$ de los ratones (n=3) se les dosificó por vía intravenosa 7,5e10 vg/ratón AAV8 recombinante anti-CD63:plantilla de inserción GAA (REGV044) y 1 mg/kg de LNP-g9860 para validar que anti-CD63:GAA puede insertarse en ratones humanizados para albúmina usando ARNg de albúmina humana. Se recolectó sangre y se preparó suero a los 7 días, 14 días, 35 días y 60 días después de la administración. Se observaron niveles séricos de GAA de hasta ~3 µg/ml y se mantuvieron a lo largo del tiempo (datos no mostrados), lo

que confirma que el anti-CD63:GAA puede insertarse en ratones humanizados para albúmina usando ARNg de albúmina humana.

En breve, la combinación de la tecnología CRISPR/Cas9 de alta precisión y dirigida suministrada mediante LNP y la plantilla de ADN anti-CD63:GAA suministrada mediante el vector rAAV8 seleccionado permite la expresión a largo plazo de la proteína anti-CD63:GAA de los hepatocitos y el suministro a las células musculares afectadas en PD, lo que podría proporcionar un tratamiento efectivo de por vida a los pacientes con PD, lo que incluye los pacientes neonatos.

Estos resultados muestran que, en ratones neonatos, el enfoque de inserción muestra una durabilidad de expresión muy mejorada en comparación con el enfoque episomal, lo que indica que la inserción es el enfoque superior en sujetos neonatales.

Ejemplo 5. Plantillas de ADN Anti-CD63:GAA optimizadas

Se generaron plantillas anti-CD63:GAA optimizadas para desarrollar una pista para los estudios de primates no humanos (NHP). Para seleccionar un candidato de desarrollo, se generaron varias versiones del casete de inserción en las que se modificó la secuencia de nucleótidos que codifica el anti-CD63:GAA (p. ej., mediante el agotamiento de CpG). La **Tabla 25** enumera las diferentes versiones de insertos diseñados anti-CD63:GAA. Además, el constructo GS 50 se optimizó aún más para eliminar los seis

motivos CpG activadores pero dejando los 44 motivos CpG no activadores (GS 44; sec. con núm de ident.: 200). El constructo GS 0 se optimizó aún más (GS 0v2; sec. con núm. de ident.: 198) eliminando un poliA AATAA, eliminando un aceptor de empalme críptico y reemplazando una glicina que codifica GGGGGGGGGGG (sec. con núm. de ident.: 203) con GGAGGAGGTGG (sec. con núm. de ident.: 204).

Tabla 25. Insertos anti-CD63:GAA para casetes de inserción.

Inserto anti-CD63:GAA	**Contenido de CpG del transgén**	**Sec. con núm. de ident.**
Primera generación	181	194
GS 0	0	197
GS 0v2	0	198
DC 0	0	195
GS 1	1	199
RE 8	8	202
GS 50	50	201
GS 44	44	200
GA 0	0	196

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de sangre humana. Se enriquecieron células dendríticas plasmocitoides (pDC, por sus siglas en inglés) y se combinaron con pBMC (1e4 pDC + 1e5 PBMC por pocillo). Las células se incubaron durante 16-18 horas con AAV6 o oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) de control. Se recogieron los sobrenadantes y se realizó un ELISA de IFNα. Este ensayo evaluó si las secuencias anti-

CD63:GAA sin CpG exhibieron respuestas reducidas de IFN-I en un ensayo basado en DC plasmocitoide humano primario en comparación con secuencias no carentes de CpG. Las muestras analizadas, incluido un control positivo AAV6-GFP y un control negativo sin CpG (0 CpG *F9* transgén), se muestran en la **Tabla 26.** Los resultados se muestran en la **FIGURA 11.**

Tabla 26. Plantillas AAV6 Anti-CD63:GAA probadas para la respuesta de IFNα en el ensayo pDC/AAV.

Genoma	**Contenido de CpG del transgén**	**Contenido TOTAL de CpG con ITR**
AAV6 GFP (SFFV_eGFP_WPRE)	99	175
Primera generación	181	213
GS 50	50	82
GS 44	44	75
GA 0	0	32
GS 0 v2	0	32
F9 0 plantilla CpG	0	33

La actividad de las plantillas optimizadas se probó en un ensayo primario de hepatocitos humanos. Las plantillas de AAV se empaquetaron en virus AAV2. Los hepatocitos humanos primarios se cultivaron en placas de 96 pocillos y se les administró el AAV (AAV2, AAV6 o AAV8) que contenía el ADN de plantilla y LNP-g9860 a una MOI fija con titulación de dosis de LNP o una concentración de LNP fija con titulación de dosis de AAV. Los sobrenadantes se recogieron 7 días después de la dosificación y se

almacenaron a -80 grados Celsius. Los sobrenadantes se descongelaron y la actividad de GAA en los sobrenadantes se midió usando un ensayo fluorométrico basado en 4-metilumbeliferona (K690, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.) como medida de la cantidad de GAA enzimáticamente activa producida y secretada por las células. Se probó un primer lote de plantillas anti-CD63:GAA y anti-TfR:GAA optimizadas usando AAV2 como se muestra en la **Tabla 27** y la **FIGURA 12**. La plantilla anti-CD63:GAA de 50 CpG se expresó similarmente a la plantilla nativa, pero las plantillas iniciales con menos CpG no se expresaron bien. Se sometieron a prueba plantillas anti-CD63:GAA optimizadas adicionales mediante el uso de AAV6 como se muestra en la **Tabla 28** y la **Figura 13**. La plantilla GA 0 CpG anti-CD63:GAA mantuvo la expresión en comparación con la plantilla CpG alta nativa en el ensayo primario de inserción de hepatocitos humanos *in vitro*. Se observaron resultados similares usando AAV8 en lugar de AAV6 (datos no mostrados). La plantilla GA 0 CpG anti-CD63:GAA produjo GAA funcional en el ensayo primario de hepatocitos humanos a niveles similares a los nativos mientras que también produjo respuestas reducidas de IFNα en el ensayo pDC/AAV.

Tabla 27. Plantillas AAV2 Anti-CD63:GAA y Anti-TfR:GAA probadas para la actividad de GAA en sobrenadante de PHH.

Genoma	**Contenido de CpG del transgén**
Primera generación	181
GS 50	50
RE 8	8
GS 0	0
12837scfv-GAA-1 0CpG 27	0
12837scfv-GAA-2 5CpG 27	5

Tabla 28. Plantillas AAV6 Anti-CD63:GAA probadas para actividad GAA en sobrenadante de PHH.

Genoma	**Contenido de CpG del transgén**
Primera generación	181
GS 50	50
GS 44	8
GA 0	0
GS 0v2	0

La expresión de las plantillas optimizadas se validó después de la inserción en ratones $Gaa^{-/-}$ como se describe en el Ejemplo 4. A los ratones adultos se les administraron por vía intravenosa 1,97e12 vg/kg de la plantilla de inserción anti-CD63:GAA de AAV8 recombinante (REGV044) y 1 mg/kg de LNP-g666. Las plantillas de AAV8 recombinantes probadas incluyeron la plantilla de inserción de 181 CpG anti-CD63:GAA nativa (REGV044), la plantilla de GA 0 CpG, la plantilla de GSa50 CpG y la plantilla de GS 44 CpG. Se usaron ratones $Gaa^{-/-}$ sin tratar y silvestres como controles. Se recogió sangre y se preparó suero a los 13 días, 34 días y 92 días después de la administración. Como se muestra en la **FIGURA 14A**, la plantilla GA 0 CpG mostró

una expresión sérica similar *in vivo* en ratones adulto Gaa$^{-/-}$ en comparación con la plantilla CpG alta nativa. Como se muestra en la **FIGURA 14B,** los niveles de expresión séricas fueron consistentes en tres puntos de tiempo.

Expresión de la plantilla GA 0 CpG anti-CD63:GAA (sec. con núm. de ident.: 196 y 736) se evaluó tras la inserción en primates no humanos. A macacos cynomolgus de dos años se les administró AAV8 recombinante que contenía la plantilla anti-CD63:GAA agotada en CpG y un LNP-g9860 dirigido al intrón 1 de albúmina de cynomolgus. Se usaron tres dosis diferentes de AAV8 recombinante (0,3e13vg/kg, 1,5e13vg/kg y 5,6e13vg/kg) con una dosis de LNP de 3 mg/kg. N=1 en el grupo de control de vehículo y N=3 en los grupos administrados. La actividad sérica de GAA se midió mediante el uso de un ensayo de sustrato fluorométrico en los monos a lo largo del estudio. Se observó un aumento dependiente de la dosis de AAV en los niveles de actividad de GAA en suero a lo largo del tiempo en los grupos (**Figura 27A**). Esto indicó la inserción satisfactoria del transgén anti-CD63:GAA en el locus de la albúmina y la expresión y secreción resultantes del transgén en los animales. Los tejidos se recolectaron en el sacrificio (día 89) y se sondearon mediante inmunoelectrotransferencia para determinar la presencia de una forma lisosomal de 76 kDa de GAA. Se observó un aumento dependiente de la dosis de GAA lisosomal en los tejidos en el corazón y el diafragma

(**Figura 27B**), lo que indicaba el suministro de la proteína anti-CD63:GAA derivada del hígado a los tejidos distales.

La actividad de las plantillas optimizadas se valida en el modelo de ratón PD, $Gaa^{-/-}$;$Cd63^{hu/hu}$, como se describe en el Ejemplo 4.

La expresión de las plantillas optimizadas se evalúa en primates no humanos. Se prueban dos dosis de LNP y dos gRNA. Específicamente, la expresión se evalúa mediante la administración de 1 o 3 mg/kg de LNP-g9860 como se describe en el Ejemplo 1 y 1,5e13 vg/kg de rAAV8 que comprende cada plantilla optimizada. También se usa una LNP con ARNg9844. La expresión se analiza durante un estudio de 12 semanas. Los tejidos también se recolectan para el análisis de la biodistribución de GAA, y la actividad de GAA se evalúa en los tejidos recolectados.

Ejemplo 6. Expresión duradera de glucosidasa alfa (GAA) después de la inserción de una plantilla de ADN anti-TfR:GAA en ratones neonatales

Se generaron anticuerpos antirreceptor de transferrina humana (hTfR) y se cribaron por la capacidad de unirse a hTfR y la falta de bloqueo fuerte de la unión de transferrina humana-hTfR. Se eligieron 32 secuencias variables basadas en este análisis inicial. *Ver* **Tabla 29**.

Tabla 29. Dominios en anticuerpos anti-hTfR, fragmentos de unión al antígeno (*p. ej.*, Fabs) o moléculas scFv en proteínas de fusión.

Núm.	anti-hTfR Molécula	HC-VR NT	HC-VR AA	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LC-VR NT	LC-VR AA	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	**31874B**	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
2	**31863B**	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235
3	**69348**	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
4	**69340**	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
5	**69331**	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265
6	**69332**	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275
7	**69326**	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
8	**69329**	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295
9	**69323**	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305
10	**69305**	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
11	**69307**	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325
12	**12795B**	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335
13	**12798B**	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
14	**12799B**	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355
15	**12801B**	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365
16	**12802B**	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
17	**12808B**	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385
18	**12812B**	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395
19	**12816B**	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
20	**12833B**	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415
21	**12834B**	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425
22	**12835B**	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
23	**12847B**	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445
24	**12848B**	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455
25	**12843B**	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
26	**12844B**	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475
27	**12845B**	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485
28	**12839B**	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495
29	**12841B**	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505
30	**12850B**	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515
31	**69261**	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525

32	**69263**	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535

31874B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCCTTTAGCAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGA
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATCAGTGGTACTGGTGGTAGT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC
TGTGCGAAAGGGGGAGCAGCTCGTAGAATGGAATACTTCCAGTACTGGGGCCAGGGC
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 216)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGS
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQG
TLVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 217)

HCDR1: GFAFSSYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 218)

HCDR2: ISGTGGST (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 219)

HCDR3: AKGGAARRMEYFQY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 220)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGTTCCTAACCTCCTTATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCA
TCTCGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGCCCCTCTCACTTTCG
GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 221)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 222)

LCDR1: QGISNY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 223)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 224)

LCDR3: QKYNSAPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 225)

31863B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAACAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGC

CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTTATTGGTGGTAGTACTGGTAAC

ACATACTACGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGCGACAATTCCAAG

AAGACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC

TGTGCGAAAGGGGGAGCAGCTCGTAGAATGGAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGC

ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 226)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGN

TYYAGSVKGRFTISSDNSKKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQG

TLVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 227)

HCDR1: GFTFNSYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 228)

HCDR2: IGGSTNT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 229)

HCDR3: AKGGAARRMEYFQH (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 230)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAACAGAAAC

CAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCA

TCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAACCATAACAGTGTCCCTCTCACTTTCG
GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 231)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKVEIK (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 232)

LCDR1: QGISNY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 233)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 234)

LCDR3: QNHNSVPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 235)

69348

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCACTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCTGTTATATGGTATGATGGAAGTAAT
AAATATTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCTGTTTATTAC
TGTACGAGAACCCATGGCTATACCAGGTCGTCGGACGGTTTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA(SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 236)

HCVR (V_H) Secuencia de aminoácidos
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN
KYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQ
GTLVTVSS (SEC. CON NÚM DE IDENT.: 237)

HCDR1: GFTFTTYG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 238)

HCDR2: IWYDGSNK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 239)

HCDR3: TRTHGYTRSSDGFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 240)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGAAATGTTTTAGGCTGGTTTCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTCAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTACA

GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATTTTTACCCGCTCACTTTCG

GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 241)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKVEIK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 242)

LCDR1: QSIRNV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 243)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 244)

LCDR3: LQHNFYPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 245)

69340

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATAAAGCCATGCACTGGGTCCGG

CAAGTTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGATCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTACT

ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAG

AACTCCCTGTATCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTAC

TGCGCAAAAGATGGAGATACCAGTGGCTGGTACTGGTACGGTTTGGACGTCTGGGGC

CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 246)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGT

IGYADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWYGLDVWG

QGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 247)

HCDR1: GFTFDDKA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 248)

HCDR2: ISWNSGTI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 249)

HCDR3: AKDGDTSGWYWYGLDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 250)

LCVR (V_L) Secuencia de nucleótidos

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC

CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC

CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCCATGATGTATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA

GCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTAGA

GCCTGAAGATTTTGTAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCGACTGGCCCATCACCTTCG

GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 251)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRATG

IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 252)

LCDR1: QSVSSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 253)

LCDR2: DVS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 254)

LCDR3: QQRSDWPIT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 255)

69331

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTATAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGTCTATGGCATTCACTGGGTCCGC

CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGATGGCAGTAATATCACATGATGGAAATATT

AAACACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG

AACACGCTGTATCTTCAAATTAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGTGTATTAC

TGTGCGAAAGATACCTGGAACTCCCTTGATACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA

ATGGTCACCGTCTCTTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 256)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNI

KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGT

MVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 257)

HCDR1: GFTFSVYG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 258)

HCDR2: ISHDGNIK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 259)

HCDR3: AKDTWNSLDTFDI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 260)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCG

GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 261)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 262)

LCDR1: QGISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 263)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 264)

LCDR3: QQLNSYPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 265)

69332

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCCGCGCTGGTGAAACCCTCACAGACCCTCACA

CTGACCTGCACCTTCTCTGGATTCTCACTCAACACTTATGGGATGTTTGTGAGCTGG

ATCCGTCAGCCTCCAGGGAAGGCCCTAGAGTGGCTTGCACACATTCATTGGGATGAT

GATAAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCC

AAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTAT

TATTGTGCACGGGGGCACAATAATTTGAACTACATCATCCACTGGGGCCAGGGAACC

CTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 266)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDD

DKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGT

LVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 267)

HCDR1: GFSLNTYGMF (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 268)

HCDR2: IHWDDDK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 269)

HCDR3: ARGHNNLNNYIIH (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 270)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTACAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAAGATTACAATTACCCATTCACTTTCG

GCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 271)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 272)

LCDR1: QGIRND (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 273)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 274)

LCDR3: LQDYNYPFT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 275)

69326

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCATCTTCAGTAGTTATGAAATGAACTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACC
ATATTCTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTAC
TGTGTGTCTGGAGTGGTCCTTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC
TCTTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 276)

HCVR (V_H) Secuencia de aminoácidos

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGST
IFYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTV
SS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 277)

HCDR1: GFIFSSYE (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 278)

HCDR2: ISSSGSTI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 279)

HCDR3: VSGVVLFDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 280)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCGGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTTGCCTGGTACCAACAGAAAC
CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATAGTGCATCCTCCAGGGCCACTGGTATCCCA
GTCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATATCTGGCCTCGGACGTTCG
GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 281)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRATG

IPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 282)

LCDR1: QSVSSN (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 283)

LCDR2: SAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 284)

LCDR3: QQYNIWPRT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 285)

69329

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC

TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCA

GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGATGGAAGTGAGAAA

GACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACT

CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC

GAGAGATGGGGAGCAGCTCGTCGATTACTACTACTACGTTATGGACGTCTGGGGC

CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 286)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSE

KDYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDV

WGQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 287)

HCDR1: GFTFSNYW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 288)

HCDR2: IKEDGSEK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 289)

HCDR3: ARDGEQLVDYYYYYVMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 290)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAAAGGCTAACAGTTTCCCGTACACTTTTG
GCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 291)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIK (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 292)

LCDR1: QGISSW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 293)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 294)

LCDR3: QKANSFPYT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 295)

69323 (REGN16816 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGACTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG
CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGC
TATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCGAGAACTCCCT
ACATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAG
GGGGATCTACTCTGGTTCGGGGAGTTAAGGGAGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 296)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGY
IGYADSVKGRFTISRDNAENSLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGM
DVWGQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 297)

HCDR1: GFTFDDYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 298)

HCDR2: ISWNSGYI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 299)

HCDR3: ARGGSTLVRGVKGGYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 300)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATAAGTAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGTAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATTCCGCTCACTTTCG

GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 301)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 302)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 303)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 304)

LCDR3: QQSYSIPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 305)

69305

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGC

CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAT

AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACATTTCCAAG

AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC

TGTGCGGGTCAACTGGATCTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC

GTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 306)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN

KYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVT

VSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 307)

HCDR1: GFTFSSYG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 308)

HCDR2: IWYDGSNK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 309)

HCDR3: AGQLDLFFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 310)

LCVR (V_L) Secuencia de nucleótidos

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTGACAGGTATTTAAATTGGTATCGGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATACTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCCTCAGCAGTCTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGAGTTACAGTCCCCCGCTCACTTTCG

GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 311)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTSSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 312)

LCDR1: QSIDRY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 313)

LCDR2: TTS (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 314)

LCDR3: QQSYSPPLT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 315)

<u>69307 (REGN16817 anti-hTfR scFv:hGAA)</u>

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC

TCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCA

GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGATGGAAGTGAGAAA

GAGTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATT

CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGC

GAGAGATGGGGAGCAGCTCGTCGATTACTATTACTACTACGTTATGGACGTCTGGGGC

CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 316)

HCVR (V_H) Secuencia de aminoácidos

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEK

EYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVW

GQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM DE IDENT.: 317)

HCDR1: GFTFSNYW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 318)

HCDR2: IKEDGSEK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 319)

HCDR3: ARDGEQLVDYYYYYVMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 320)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAAAGGCTGACAGTCTCCCGTACGCTTTTG

GCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 321)

LCVR (V_L) Secuencia de aminoácidos

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTKLEIK (SEC.

CON NÚM DE IDENT.: 322)

LCDR1: QGISSW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 323)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 324)

LCDR3: QKADSLPYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 325)

12795B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACCTTTACCAGCTATGACATGAAGTGGGTCCGC

CAGGCTCCAGGGCTGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAAC

ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGG

AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC

TGTACGAGGTCCCATGACTTCGGTGCCTTCGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA

ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 326)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGN

TYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQG

TLVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 327)

HCDR1: GTFTSYD (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 328)

HCDR2: ISGSGGNT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 329)

HCDR3: TRSHDFGAFDYFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 330)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAGATCATTTTGGCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCACAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCTTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAACCTATTACTGTCTACAGTATGATACTTACCCGCTCACTTTCG

GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 331)

LCVR (V_L) Secuencia de aminoácidos

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLHSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIK (SEC.

CON NÚM DE IDENT.: 332)

LCDR1: QGIRDH (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 333)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 334)

LCDR3: LQYDTYPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 335)

12798B (REGN17078 Fab; REGN17072 scFv; REGN16818 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGCTACC
AGAGTCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AATTTCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCTTGTATCAC
TGTGCAAAAGATATGGATATCTCGCTAGGGTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 336)

HCVR (V_H) Secuencia de aminoácidos

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSAT
RVYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQ
GTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 337)

HCDR1: GFTFDDYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 338)

HCDR2: ISWNSATR (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 339)

HCDR3: AKDMDISLGYYGLDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 340)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTTCATCCTCCAGGGCCACTGGTATCCCA
GCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCCTACACTT
TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 341)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATG IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 342)

LCDR1: QTVSSN (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 343)

LCDR2: GSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 344)

LCDR3: QQYNNWPPYT (SEC. CON NUM. DE IDENT.:345)

12799B (REGN17079 Fab; REGN17073 scFv; REGN16819 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGC TGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTGTGGTCTGGAT CCGTCAGCCCCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATTTATTGGAATGATCAT AAGCGGTACAGCCCATCTCTGGGGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAA ACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTG TGCACACTACAGTGGGAGCTATTCCTACTACTACTATGGTTTGGACGTCTGGGGCCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 346)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWND HKRYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVW GQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 347)

HCDR1: GFSLSTSGVG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 348)

HCDR2: IYWNDHK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 349)

HCDR3: AHYSGSYSYYYYGLDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 350)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTGCCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAGGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAATTTACTATTGTCAACAGGCTAACTATTTCCCGTGGACGTTCG

GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 351)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQGG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 352)

LCDR1: QGIASW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 353)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 354)

LCDR3: QQANYFPWT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 355)

12801B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTACCTCCTATGCCATGCACTGGGTCCGC

CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGAGGTAGTGGTGGTGGC

ACATACTCCGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGG

GACACTCTATATCTGCAAATGAACAGTGTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTAC

TGTGCGAGGTCCCATGACTACGGTGCCTTCGACTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGA

ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 356)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGG

TYSADSVKGRFTISRDNSRDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQG

TLVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 357)

HCDR1: GFTFTSYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 358)

HCDR2: IRGSGGGT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 359)

HCDR3: ARSHDYGAFDFFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 360)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAACTGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAAC CAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCG GCCTGAAGATTTTGCAACTTTTTACTGTCTACAGTATAATAGTTACCCGCTCACTTTCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 361)

LCVR (V_L) Secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVEIK (SEC. CON NÚM DE IDENT.: 362)

LCDR1: QGIRTD (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 363)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 364)

LCDR3: LQYNSYPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 365)

12802B (REGN16820 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTTCATGAGCTGGATCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTACTGGTAGTACC ATAAATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAATGTCAAG AATTCACTGTATCTGCAAATGACCAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTGTATTAC TGTACGAGAGATAACTGGAACTATGAATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 366)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGST

INYADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYWGQGTLVTV

SS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 367)

HCDR1: GFTFSDYF (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 368)

HCDR2: ISSTGSTI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 369)

HCDR3: TRDNWNYEY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 370)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC

CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC

CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTTTGTTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCA

GCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA

GTCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATGATATCTGGCCGTACACTTTTG

GCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 371)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVASTRATG

IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 372)

LCDR1: QSVSIN (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 373)

LCDR2: VAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 374)

LCDR3: QQYDIWPYT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 375)

12808B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC

CTCACCTGCACTGTGTCTGGTGAATCCATCAGCAGTAATACTTACTACTGGGGCTGG

ATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATTGGGAGTATCGATTATAGTGGG

ACCACCAATTATAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCC
AGGAATCACTTCTCCCTGAGGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGAGTGGGGAAACTACGGCTACTATTACGGTATGGACGTTTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 376)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSG
TTNYNPSLKSRVTISVDTSRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWG
QGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 377)

HCDR1: GESISSNTYY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 378)

HCDR2: IDYSGTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 379)

HCDR3: AREWGNYGYYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 380)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCAATTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TTAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAACAACCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTATCGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCG
GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 381)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG
VPLRFSGSGSGTEFTLTINNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKVEIK (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 382)

LCDR1: QGIRND (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 383)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 384)

LCDR3: LSHNSYPWT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 385)

12812B (REGN16821 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAGG

GTCTCCTGCAAGGCTTCTAGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGA

CAGGCCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCCATCTTTGGTACA

GCAAACTACGCACAGAAGTTCCTGGCCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACG

AGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTAC

TGTGCGAGAGAGAAGGGGTGGAACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC

ACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 386)

HCVR (V_H) Secuencia de aminoácidos

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGT

ANYAQKFLARVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGTLV

TVSS (SEC. CON NÚM DE IDENT.: 387)

HCDR1: RGTFSSYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 388)

HCDR2: IIPIFGTA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 389)

HCDR3: AREKGWNYFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 390)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCACCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA

TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA

GCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCTCGGACGTTCG

GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 391)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 392)

LCDR1: QGISSW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 393)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 394)

LCDR3: QQANSFPRT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 395)

12816B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAACTGGATCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTGGGACTACC
ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAG
AAATCACTGTATCTGGAGATGAACAGCCTCAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTACTAC
TGTGCGAGAGAGGGGTACGGTAATGACTACTATTACTACGGTATAGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 396)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTT
IYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWG
QGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 397)

HCDR1: GFTFSDYY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 398)

HCDR2: ISSSGTTI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 399)

HCDR3: AREGYGNDYYYYGIDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 400)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATGGTAATGGATACAACTATTTG
ACTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCT
AATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
ACACTGAAAATAAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAA

GCTCTACAAACTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 401)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYLGS NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 402)

LCDR1: QSLLHGNGYNY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 403)

LCDR2: LGS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 404)

LCDR3: MQALQTPYT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 405)

12833B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTTTGGCATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGATATTTATATCATATGATGGAAGTGAT AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCGCCATCTCCAGAGACAGTTCCAAG AACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTAC TGTGCGAAAGAAAACGGTATTTTGACTGATTCCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 406)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSD KYYADSVKGRFAISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQ GTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 407)

HCDR1: GFTFSSFG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 408)

HCDR2: ISYDGSDK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 409)

HCDR3: AKENGILTDSYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 410)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT

TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 411)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 412)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 413)

LCDR2: AAS (sec. con núm. de ident.: 414)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 415)

12834B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGG

TCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACA

GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGTGTTTACCATGGTAACACA

AACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCA

CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGC

GAGAGAGGGGTATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTACCCTTTTGACTACTGGGGCCAG

GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 416)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGN

TNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYW

GQGTLVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 417)

HCDR1: GYTFTSYG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 418)

HCDR2: ISVYHGNT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 419)

HCDR3: AREGYYDFWSGYYPFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 420)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG
TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA
ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT
TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 421)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 422)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 423)

LCDR2: AAS (sec. con núm. de ident.: 424)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 425)

12835B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAACCTGGAGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTCACCTTCAGAAATTATGAAATGAATTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATATATTAGTAGTAGTGGTAATATG
AAAGACTACGCAGAGTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGTCAAG
AATTCACTGCAGCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTAC
TGTGCGAGAGACGAGTTTCCTTACGGAATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 426)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGNM

KDYAESVKGRFTISRDNVKNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMDVWGQGTTV

TVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 427)

HCDR1: GFTFRNYE (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 428)

HCDR2: ISSSGNMK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 429)

HCDR3: ARDEFPYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 430)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT

TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 431)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 432)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 433)

LCDR2: AAS (sec. con núm. de ident.: 434)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 435)

12847B (REGN17083 anti-hTfR Fab; REGN17077 anti-hTfR scFv; REGN16826 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCAGCCTGGCAGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGAACTGGGTCCGG

CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAGTAGTGGTAGC

ATGGACTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAA

AACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACGGCCTTATATTAC

TGTGCAAAAGCTAGGGAAGTTGGAGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG

ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 436)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGS

MDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQG

TTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 437)

HCDR1: GFTFDDYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 438)

HCDR2: ISWSSGSM (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 439)

HCDR3: AKAREVGDYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 440)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT

TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 441)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 442)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 443)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 444)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 445)

12848B (REGN16827 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGACA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATAATTTTGGCATGCACTGGGTCCGG
CAAGGTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGGTCTTACTTGGAATAGTGGTGTC
ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGACCTGAGGACACGGCCTTATATTAC
TGTGCAAAAGATATACGGAATTACGGCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 446)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPGKGLEWVSGLTWNSGV
IGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFDYWGQGTL
VTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 447)

HCDR1: GFTFDNFG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 448)

HCDR2: LTWNSGVI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 449)

HCDR3: AKDIRNYGPFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 450)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC
CCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT
GGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 451)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 452)

LCDR1: QSVSSSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 453)

LCDR2: GAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 454)

LCDR3: QQYGSSPWT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 455)

12843B (REGN17075 anti-hTfR scFv; REGN16824 anti-hTfR scFv:hGAA; REGN17081 anti-hTfR Fab)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTACAGCCTGGAGGGTCCCTAAGA

CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATATTTTTGAAATGAACTGGGTCCGC

CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCCTACATTAGTAGTCGTGGAACTACC

ACATACTACGCAGACTCTGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG

AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTAC

TGTGCGAGAGATTATGAAGCAACAATCCCTTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTG

GTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 456)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTT

TYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTL

VTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 457)

HCDR1: GFTFNIFE (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 458)

HCDR2: ISSRGTTT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 459)

HCDR3: ARDYEATIPFDF (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 460)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT

TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 461)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 462)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 463)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 464)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 465)

12844B

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGC

CAAGATCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGATAGA

ACAAATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATTTCCAGAGACAACGCCAAG

AACTCTGTGTATCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCGGAGGACTCGGCCTTGTATCAC

TGTGCGAGAGATCAGGGACTCGGAGTGGCAGCTACCCTTGACTACTGGGGCCAGGGA

ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 466)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDR

TNYADSVKGRFIISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQG

TLVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 467)

HCDR1: GFTFDDYG (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 468)

HCDR2: INWNGDRT (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 469)

HCDR3: ARDQGLGVAATLDY (SEC. CON NUM. DE IDENT.: 470)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG
TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA
ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT
TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 471)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 472)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 473)

LCDR2: AAS (sec. con núm. de ident.: 474)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 475)

12845B (REGN17082 Fab; REGN17076 scFv; REGN16825 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTAATTATGAAATGAACTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTACCAGTAACATATAC
TACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCGAGAACTCACT
GTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGAGAG
ATGGGATTGTAGTAGTTCCAGTTGGTCGTGGATACTACTATTACGGTTTGGACGTCTGG
GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 476)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSN

IYYADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYG

LDVWGQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 477)

HCDR1: GFTVSNYE (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 478)

HCDR2: ISSSTSNI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 479)

HCDR3: VRDGIVVVPVGRGYYYYGLDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 480)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT

TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 481)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 482)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 483)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 484)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 485)

12839B (REGN17080 Fab; REGN17074 scFv; REGN16822 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGAAGGTCCCTGAGACT

CTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCCCCTTTAGTAATTATGTCATGTATTGGGTCCGCCAGG

CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCTCTTATTTTTTTTGACGGAAAGAAAAACTAT

CATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATAACCAGAGACAATTCCAAAAATATGTT
ATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACGCGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAA
TCCATTGTCCTAATGGTGTATGTTACAAGGGGTATTACGGAATGGACGTCTGGGGCCAA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 486)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKK
NYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMD
VWGQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 487)

HCDR1: GFPFSNYV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 488)

HCDR2: IFFDGKKN (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 489)

HCDR3: AKIHCPNGVCYKGYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 490)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG
TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA
ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT
TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 491)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 492)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 493)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 494)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 495)

12841B (REGN16823 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTAAGAC

TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCA

GGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAATATAAAAGAAGATGGAGGTAAGAAA

TTGTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACT

CACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGC

GAGAGAAGATACAACTTTGGTTGTGGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC

CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 496)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGK

KLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDV

WGQGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 497)

HCDR1: GFTFSNYW (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 498)

HCDR2: IKEDGGKK (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 499)

HCDR3: AREDTTLVVDYYYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 500)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCG

TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA

ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCT

TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 501)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 502)

LCDR1: QSISSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 503)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 504)

LCDR3: QQSYSTPPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 505)

12850B (REGN16828 anti-hTfR scFv:hGAA)

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAG
GTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAACACCTATGCTATCACCTGGGTGCGA
CAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGGGGAATCATCCCTATCTCTGGCATA
GCAGAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATCACCACGGATGACTCCTCG
ACCACAGCCTACATGGAACTGAACAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTAC
TGTGCGAGCTGGAACTACGCACTCTACTACTTCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCGA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 506)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGI
AEYAQKFQGRVTITTDDSSTTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMDVWGR
GTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 507)

HCDR1: GGTFNTYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 508)

HCDR2: IIPISGIA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 509)

HCDR3: ASWNYALYYFYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 510)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC
CCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT
GGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 511)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 512)

LCDR1: QSVSSSY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 513)

LCDR2: GAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 514)

LCDR3: QQYGSSPWT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 515)

69261

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGA

CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGTCTATTACATGAACTGGATCCGC

CAGGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACC

ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAG

AACTCACTGTATCTCCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC

TGTGGGAGAGAAGGGTATAGTGGGACTTATTCTTATTACGGTATGGACGTCTGGGGC

CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 516)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGST

IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWG

QGTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 517)

HCDR1: GFTFSVYY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 518)

HCDR2: ISSSGSTI (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 519)

HCDR3: GREGYSGTYSYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 520)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC

TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTG

GATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGTTCCTGATCTATTTGGGTTCT
AATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
ACACTGAAAATCAACAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAA
GCTCTACAAACTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC.
CON NÚM. DE IDENT.: 521)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGS
NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK
(SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 522)

LCDR1: QSLLHSNGYNY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 523)

LCDR2: LGS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 524)

LCDR3: MQALQTPYT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 525)

69263

Secuencia de nucleótidos HCVR (V_H)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTACC
AGAGGATATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGGTGAGGACACGGCCTTGTATTAC
TGTGTAAAAGATATTACGATATCCCCCAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 526)

Secuencia de aminoácidos HCVR (V_H)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGT
RGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGQ
GTTVTVSS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 527)

HCDR1: GFTFDDYA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 528)

HCDR2: ISWNSGTR (sec. con núm. de ident.: 529)

HCDR3: VKDITISPNYYGMDV (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 530)

Secuencia de nucleótidos LCVR (V_L)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC

CATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCCATTATTCAGCCTGGTATCAGCAGAAAC

CAGGGAAACTTCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCA

TCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTCACCACCAGCAGCCTGCA

GCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGTCCCTCTCACTTTCG

GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 531)

Secuencia de aminoácidos LCVR (V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFSLTTSSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTKVEIK (SEC.

CON NÚM. DE IDENT.: 532)

LCDR1: QDISHY (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 533)

LCDR2: AAS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 534)

LCDR3: QKYNSVPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 535)

Tabla 30. Moléculas anti-hTfR scFv en proteínas de fusión.

Clon de anticuerpo	**Sec. con núm. de ident.**	**Secuencia de aminoácidos (Vk-3xG4S-Vh)**
12795B	538	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLH SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGL GLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR SHDFGAFDYFDYWGQGTLVTVSS
12798B	539	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRSEDTALYHCA KDMDISLGYYGLDVWGQGTTVTVSS

Clon de anticuerpo	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos (Vk-3xG4S-Vh)
12799B	540	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQ GGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPP GKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCA HYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSS
12801B	541	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGK GLEWVSSIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNSRDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCAR SHDYGAFDFFDYWGQGTLVTVSS
12802B	542	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGK GLEWVSYISSTGSTINYADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTR DNWNYEYWGQGTLVTVSS
12808B	543	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQ SGVPLRFSGSGSGTEFTLTINNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPP GKGLEWIGSIDYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCA REWGNYGYYYGMDVWGQGTTVTVSS
12812B	544	DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFLARVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR EKGWNYFDYWGQGTLVTVSS
12816B	545	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYL GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLE IKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIR QAPGKGLEWVSYISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLEMNSLRAEDTAV YYCAREGYGNDYYYYGIDVWGQGTTVTVSS
12833B	546	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPG KGLEWVIFISYDGSDKYYADSVKGRFAISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KENGILTDSYGMDVWGQGTTVTVSS
12834B	547	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPG QGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCA REGYYDFWSGYYPFDYWGQGTLVTVSS
12835B	548	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPG KGLEWVSYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNVKNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCA RDEFPYGMDVWGQGTTVTVSS
12839B	549	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPG KGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCA KIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSS
12841B	550	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPG KGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCA REDTTLVVDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

Clon de anticuerpo	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos (Vk-3xG4S-Vh)
12843B	551	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPG KGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDYEATIPFDFWGQGTLVTVSS
12844B	552	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPG KGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDSALYHCA RDQGLGVAATLDYWGQGTLVTVSS
12845B	553	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPG KGLEWVSYISSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCV RDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWGQGTTVTVSS
12847B	554	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPG KGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSS
12848B	555	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPG KGLEWVSGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCA KDIRNYGPFDYWGQGTLVTVSS
12850B	556	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPG QGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTDDSSTTAYMELNSLRSEDTAVYYCA SWNYALYYFYGMDVWGRGTTVTVSS
31863B	557	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGK GLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNSKKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GGAARRMEYFQHWGQGTLVTVSS
31874B	558	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGK GLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GGAARRMEYFQYWGQGTLVTVSS
69261	559	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYL GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLE IKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCGREGYSGTYSYYGMDVWGQGTTVTVSS
69263	560	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFSLTTSSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGISWNSGTRGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVK DITISPNYYGMDVWGQGTTVTVSS
69305	561	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG QLDLFFDYWGQGTLVTVSS

Clon de anticuerpo	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos (Vk-3xG4S-Vh)
69307	562	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQAPGK GLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCAR DGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS
69323	563	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAENSLHLQMNSLRAEDTALYYCAR GGSTLVRGVKGGYYGMDVWGQGTTVTVSS
69326	564	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRA TGIPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVS GVVLFDVWGQGTMVTVSS
69329	565	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGK GLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCAR DGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS
69331	566	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGK GLEWMAVISHDGNIKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAK DTWNSLDTFDIWGQGTMVTVSS
69332	567	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIKGGG GSGGGGSGGGGSQVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPP GKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCA RGHNNLNYIIHWGQGTLVTVSS
69340	568	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIKGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGK GLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DGDTSGWYWYGLDVWGQGTTVTVSS
69348	569	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTR THGYTRSSDGFDYWGQGTLVTVSS

Cadenas pesadas y ligeras de Fabs anti-hTfR en proteínas de fusión anti-hTfR:GAA:

(1) 31874B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 603)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGS

TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQG

TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 604)

(2) 31863B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 605)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGN

TYYAGSVKGRFTISSDNSKKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQG

TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 606)

(3) 69348

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 607)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN

KYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQ

GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

H (sec. con núm. de ident.: 608)

(4) 69340

Cadena ligera Fab

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRATG

IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 609)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGT

IGYADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWYGLDVWG

QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK

TH (sec. con núm. de ident.: 610)

(5) 69331

Cadena ligera Fab

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 611)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNI

KHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGT

MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 612)

(6) 69332

Cadena ligera Fab

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 613)

Cadena pesada Fab

QVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDD

DKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGT

LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 614)

(7) 69326

Cadena ligera Fab

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRATG

IPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 615)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGST

IFYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTV

SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 616)

(8) 69329

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 617)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSE

KDYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDV

WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

DKTH (sec. con núm. de ident.: 618)

(9) 69323

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 619)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGY

IGYADSVKGRFTISRDNAENSLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGM

DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG

ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

SCDKTH (sec. con núm. de ident.: 620)

(10) 69305

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTSSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 621)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN

KYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVT

VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 622)

(11) 69307

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con
núm. de ident.: 623)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSE
KEYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTH (sec. con núm. de ident.: 624)

(12) 12795B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLHSG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con
núm. de ident.: 625)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGN
TYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
(sec. con núm. de ident.: 626)

(13) 12798B (REGN17078)

Cadena ligera Fab

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATG
IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 627)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSAT

RVYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQ

GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

H (sec. con núm. de ident.: 628) o

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSAT

RVYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQ

GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPL

LQGSG (sec. con núm. de ident.: 667)

(14) 12799B (REGN17079)

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQGG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 629)

Cadena pesada Fab

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWND

HKRYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVW

GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

KTH (sec. con núm. de ident.: 630) o

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHK

RYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGT

TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPLLQGSG

(sec. con núm de ident.: 668).

(15) 12801B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 631)

Cadena pesada Fab

EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGG

TYSADSVKGRFTISRDNSRDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQG

TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 632)

(16) 12802B

Cadena ligera Fab

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVASTRATG

IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 633)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGST INYADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 634)

(17) 12808B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG VPLRFSGSGSGTEFTLTINNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 635)

Cadena pesada Fab

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSG TTNYNPSLKSRVTISVDTSRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK TH (sec. con núm. de ident.: 636)

(18) 12812B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 637)

Cadena pesada Fab

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGT ANYAQKFLARVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 638)

(19) 12816B

Cadena ligera Fab

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYLGS NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 639)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTT IYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK TH (sec. con núm. de ident.: 640)

(20) 12833B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 641)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSD KYYADSVKGRFAISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT H (sec. con núm. de ident.: 642)

(21) 12834B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 643)

Cadena pesada Fab

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGN TNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTH (sec. con núm. de ident.: 644)

(22) 12835B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 645)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGNM KDYAESVKGRFTISRDNVKNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (sec. con núm. de ident.: 646)

(23) 12847B (REGN17083)

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 647)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGS MDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (sec. con núm. de ident.: 648); o

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSM DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPLLQGSG (sec. con núm de ident.: 669).

(24) 12848B

Cadena ligera Fab

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 649)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPGKGLEWVSGLTWNSGV

IGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFDYWGQGTL

VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 650)

(25) 12843B (REGN17081)

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 651)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTT

TYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTL

VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(sec. con núm. de ident.: 652); o

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTT
YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPLLQGSG
(sec. con núm de ident.: 670).

(26) 12844B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con
núm. de ident.: 653)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDR
TNYADSVKGRFIISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
(sec. con núm. de ident.: 654)

(27) 12845B (REGN17082)

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con
núm. de ident.: 655)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSN
IYYADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYG
LDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTH (sec. con núm. de ident.: 656); o
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSN
IYYADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYG
LDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
KYGPPLLQGSG
(sec. con núm de ident.: 671).

(28) 12839B (REGN17080)

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con
núm. de ident.: 657)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKK
NYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMD
VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTH (sec. con núm. de ident.: 658); o
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKK
NYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMD

VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA

LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY

GPPLLQGSG

(sec. con núm de ident.: 672).

(29) H1H12841B

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 659)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGK

KLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDV

WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

DKTH (sec. con núm. de ident.: 660)

(30) 12850B

Cadena ligera Fab

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con

núm. de ident.: 661)

Cadena pesada Fab

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGI
AEYAQKFQGRVTITTDDSSTTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMDVWGR
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
H (sec. con núm. de ident.: 662)

(31) 69261

Cadena ligera Fab

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGS
NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec.
con núm. de ident.: 663)

Cadena pesada Fab

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGST
IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
TH (sec. con núm. de ident.: 664)

(32) 69263

Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQSG
VPSRFSGSGSGTDFSLTTSSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con
núm. de ident.: 665)

Cadena pesada Fab

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGT

RGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGQ

GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

H (sec. con núm. de ident.: 666)

Secuencias anti-TfR scFV:GAA:

(1) 12795B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLHSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVS

AISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFD

YFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQE

QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT

FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE

EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTS

WTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALS

WRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQ

VVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVD

PAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWE

DMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATI

CASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWT

GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFM

RNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLF

LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGS

LPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMA

LAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGL

QLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 675).

(2) 12798B (REGN16818)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATG

IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIKGGGGSG

GGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV

SGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLG

YYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT

QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTT

PTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF

SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLS

TSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPA

LSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIT

RQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMI

VDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAW

WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAA

TICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH

WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP

FMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARP

LFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEAL

GSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP

MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA

GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 676).

(3) 12799B (REGN16819)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQGG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEW

LALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSY

YYYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAI

TQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRT

TPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVE

FSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLML

STSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSP

ALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAI

TRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMM

IVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALA

WWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQA

ATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAG

HWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFY

PFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVAR

PLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEA

LGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQ

PMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEG

AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 570).

(4) 12801B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVS

SIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNSRDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFD

FFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQE

QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT

FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE

EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTS

WTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALS

WRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQ

VVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVD

PAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWE

DMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATI

CASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWT

GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFM

RNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLF

LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGS

LPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMA

LAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGL

QLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 677).

(5) 12802B (REGN16820)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVASTRATG

IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKLEIKGGGGSGG

GGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGKGLEWVS

YISSTGSTINYADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYW

GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEAR

GCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKD

ILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGV

IVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRIT

LWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTG

GILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENM

TRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS

SGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAE

FHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSH

QFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWS

SWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNS

LLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPK

DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPP

AAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVAL

TKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKV

TVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 678).

(6) 12808B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSG

VPLRFSGSGSGTEFTLTINNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEW

IGSIDYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGY

YYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT

QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTT

PTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF

SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLS

TSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPA

LSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIT

RQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMI

VDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAW

WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAA
TICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH
WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP
FMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARP
LFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEAL
GSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP
MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA
GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
(sec. con núm de ident.: 679).

(7) 12812B (REGN16821)

DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIKGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIIPIFGTANYAQKFLARVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFD
YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCE
ARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFP
KDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPF
GVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTR
ITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRS
TGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVE
NMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAI
SSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMV
AEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICAS
SHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDV
WSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNH
NSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEF

PKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPP

PPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAV

ALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQ

KVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 680).

(8) 12816B

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYLGSN

RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKGGGG

SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEW

VSYISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDY

YYYGIDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT

QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP

TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE

EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSW

TRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWR

STGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVE

NMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAIS

SSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAE

FHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQ

FLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSW

EQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLS

LPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSST

WTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPRE

PAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEA

RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVAT

APQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 681).

(9) 12833B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWV
IFISYDGSDKYYADSVKGRFAISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTD
SYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT
QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTT
PTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF
SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLS
TSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPA
LSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIT
RQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMI
VDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAW
WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAA
TICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH
WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP
FMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARP
LFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEAL
GSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP
MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA
GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 682).

(10) 12834B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSG

GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWM

GWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFW

SGYYPFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKA

ITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTR

TTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSV

EFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLM

LSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPS

PALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTA

ITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYM

MIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL

AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQ

AATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYA

GHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAF

YPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVA

RPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVE

ALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQ

QPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSE

GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 683).

(11) 12835B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSG

GGGSGGGGSEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPGKGLEWV

SYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNVKNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGM

DVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQC

EARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFF

PKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEP

FGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWT

RITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWR

STGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVV

ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPA

ISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDM

VAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICA

SSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGD

VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRN

HNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLE

FPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLP

PPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALA

VALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQL

QKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 684).

(12) 12839B (REGN16822)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV

PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGG

GSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALI

FFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKG

YYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQ

EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT

FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE

PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWT

RITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRS

TGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVEN

MTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS
SGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEF
HDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQF
LSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWE
QLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSL
PQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTW
TVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREP
AIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEAR
GELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATA
PQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 571).

(13) 12841B (REGN16823)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANI
KEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYY
YGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQE
QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTF
FPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEP
FGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTR
ITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENM
TRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSS
GPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFH
DQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFL
STHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQ

LASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLP

QEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWT

VDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPA

IHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARG

ELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAP

QQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 685).

(14) 12843B (REGN16824)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSG

GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWI

SYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIP

FDFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQ

CEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTF

FPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE

PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSW

TRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSW

RSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQV

VENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDP

AISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWED

MVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATIC

ASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTG

DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMR

NHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFL

EFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSL

PPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMAL

AVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ

LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 572).

(15) 12844B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSG

GGGSGGGGSEVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWV

SGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVA

ATLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQ

EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP

TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS

EEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLST

SWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPAL

SWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITR

QVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIV

DPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWW

EDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAAT

ICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHW

TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPF

MRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPL

FLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALG

SLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPM

ALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAG

LQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 686).

(16) 12845B (REGN16825)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV

PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGG

GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYI

SSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRG

YYYYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAI

TQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTT

PTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS

EEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTS

WTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSW

RSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVV

ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAI

SSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVA

EFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSH

QFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSS

WEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLL

SLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSS

TWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPR

EPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGE

ARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVA

TAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 687).

(17) 12847B (REGN16826)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSG

GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWV

SGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDY

YGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQ

EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP

TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS

EEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLST

SWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPAL

SWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITR

QVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIV

DPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWW

EDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAAT

ICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHW

TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPF

MRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPL

FLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALG

SLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPM

ALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAG

LQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 573).

(18) 12848B (REGN16827)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSG

GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPGKGLEWV

SGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGP

FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQ

CEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTF

FPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE

PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSW

TRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSW

RSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQV

VENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDP

AISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWED

MVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATIC

ASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTG

DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMR

NHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFL

EFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSL

PPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMAL

AVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ

LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 688).

(19) 12850B (REGN16828)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT

GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSG

GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPGQGLEWM

GGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTDDSSTTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYY

FYGMDVWGRGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT

QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTT

PTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF

SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLS

TSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPA

LSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIT

RQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMI

VDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAW

WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAA
TICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH
WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP
FMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARP
LFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEAL
GSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP
MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA
GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
(sec. con núm de ident.: 689).

(20) 31863B

DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVS
FIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNSKKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRME
YFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQE
QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT
FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE
EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTS
WTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALS
WRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQ
VVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVD
PAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWE
DMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATI
CASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWT
GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFM
RNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLF

LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGS

LPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMA

LAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGL

QLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 690).

(21) 31874B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVS

VISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRME

YFQYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQE

QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT

FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE

EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTS

WTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALS

WRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQ

VVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVD

PAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWE

DMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATI

CASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWT

GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFM

RNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLF

LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGS

LPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMA

LAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGL

QLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 691).

(22) 69261

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSN
RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKGGGG
SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEW
VSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTY
SYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT
QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP
TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE
EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSW
TRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWR
STGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVE
NMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAIS
SSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAE
FHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQ
FLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSW
EQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLS
LPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSST
WTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPRE
PAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEA
RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVAT
APQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 692).

(23) 69263

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQSG
VPSRFSGSGSGTDFSLTTSSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVS

GISWNSGTRGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNY

YGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQ

EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP

TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS

EEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLST

SWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPAL

SWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITR

QVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIV

DPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWW

EDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAAT

ICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHW

TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPF

MRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPL

FLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALG

SLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPM

ALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAG

LQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 693).

(24) 69305

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTSSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA

VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDY

WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEA

RGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPK

DILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFG
VIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRI
TLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVEN
MTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAIS
SSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVA
EFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASS
HQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVW
SSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHN
SLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFP
KDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPP
PAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVA
LTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQK
VTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
(sec. con núm de ident.: 694).

(25) 69307 (REGN16817)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTKLEIKGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVA
NIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY
YYYYVMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKA
ITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTR
TTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSV
EFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLM
LSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPS
PALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTA

ITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYM

MIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL

AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQ

AATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYA

GHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAF

YPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVA

RPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVE

ALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQ

QPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSE

GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 695).

(26) 69323 (REGN16816)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQSGV

PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGG

SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS

WNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAENSLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGG

YYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQ

EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT

FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE

PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWT

RITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRS

TGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVEN

MTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS

SGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEF

HDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQF

LSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWE

QLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSL

PQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTW

TVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREP

AIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEAR

GELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATA

PQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 696).

(27) 69326

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRATG

IPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVS

YISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVW

GQGTMVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEAR

GCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKD

ILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGV

IVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRIT

LWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTG

GILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENM

TRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS

SGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAE

FHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSH

QFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWS

SWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNS

LLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPK

DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPP

AAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVAL

TKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKV

TVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 697).

(28) 69329

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVA

NIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY

YYYYVMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKA

ITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTR

TTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSV

EFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLM

LSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPS

PALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTA

ITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYM

MIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL

AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQ

AATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYA

GHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAF

YPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVA

RPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVE

ALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQ

QPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSE

GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 698).

(29) 69331

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGKGLEWMA

VISHDGNIKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDT

FDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQ

CEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTF

FPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE

PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSW

TRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSW

RSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQV

VENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDP

AISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWED

MVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATIC

ASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTG

DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMR

NHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFL

EFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSL

PPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMAL

AVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ

LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 699).

(30) 69332

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIKGGGGSGG

GGSGGGGSQVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEW

LAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNY

IIHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQ

CEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTF

FPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE

PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSW

TRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSW

RSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQV

VENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDP

AISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWED

MVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATIC

ASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTG

DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMR

NHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFL

EFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSL

PPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMAL

AVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ

LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 700).

(31) 69340

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRATG

IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIKGGGGSGG

GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGKGLEWIS

GISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWY

WYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT

QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTT

PTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF

SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLS

TSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPA

LSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIT

RQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMI

VDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAW

WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAA

TICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH

WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP

FMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARP

LFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEAL

GSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP

MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA

GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 701)

(32) 69348

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAASSLQSG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGG

GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVA

VIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSS

DGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQ

EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP

TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS

EEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLST

SWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPAL

SWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITR

QVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIV

DPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWW

EDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAAT

ICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHW

TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPF

MRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPL

FLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALG

SLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPM

ALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAG

LQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 702);

(1)

MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADADIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIA

SWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQ

QANYFPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSG

FSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMT

NMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVP

TQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKL

ENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLET

PHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQY

ITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNS

NAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLC

RWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQ

GGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTN

PTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGT

LQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYA

GHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP

FMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLF

LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLP

PPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVA

LTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVT

VLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 703; opcionalmente carente de la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 709));

(2)

MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIS

SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

QSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS

GFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMN

SLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPR

AVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPS

YKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVP

LETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLP

SQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFL

LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGF

HLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQE

LHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPD

FTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVV

GGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG

RYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGA

FYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVAR

PLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALG

SLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMAL

AVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQ

KVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 704; opcionalmente carente de la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 709));

(3)

MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIS

SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

QSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

GFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN

SLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCD

VPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLS

SSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVH

SRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGL

AEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMD

VVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGY

SSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRR

YMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL

AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAA

TICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWT

GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRN

HNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFP

KDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPA

APREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKG

GEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGV

ATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 705; opcionalmente carente de la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 709));

(4)

MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIS
SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS
GFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN
SLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQ
CDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLEN
LSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPH
VHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYIT
GLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNA
MDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRW
GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGG
RRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPT
ALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQ
AATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGH
WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFM
RNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLE
FPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPP
PAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT
KGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVL
GVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(sec. con núm de ident.: 706; opcionalmente carente de la secuencia N-terminal MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (sec. con núm. de ident.: 709))

Con el fin de validar los anticuerpos anti-TfR humanos que se cribaron para la unión *in vitro,* se realizaron estudios con ratones *in vivo* en ratones *Tfrc*$^{hum\ hum}$ knock-in para evaluar el cruce de la barrera hematoencefálica (BBB). Se seleccionaron once clones que tenían proteína hGAA madura en el homogeneizado de cerebro detectado por transferencia western a partir de esta primera selección de 31 anticuerpos.

Fusiones GAA por suministro hidrodinámico (HDD). Se inyectaron ratones con inserción de *TFRC* humano de tres meses de edad con plásmidos de ADN que expresaban los diversos anticuerpos anti-hTfR en el formato scfv:2xG4S:hGAAanti-hTfR bajo el promotor *TTR* de ratón específico de hígado. Los ratones recibieron 50 µg de ADN en 0,9 % de solución salina estéril diluida al 10 % del peso corporal del ratón (0,1 ml/g de peso corporal). 48 horas después de la inyección, se diseccionaron los tejidos de los ratones inmediatamente después del sacrificio por asfixia con CO_2, se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C.

Los lisados de tejidos se prepararon mediante lisis en el regulador RIPA con inhibidores de proteasa (1861282, Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.). Los lisados de tejidos se homogeneizaron con un homogeneizador de bolillas (FastPrep5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE. UU.). Los

lisados de células o tejidos se ejecutaron en geles SDS-PAGE usando el sistema Novex (LifeTech Thermo, XPO4200BOX, LC2675, LC3675, LC2676). Los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de baja fluorescencia (IPFL07810, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.) y se tiñeron con Revert 700 Total Protein Stain (TPS; 926-11010 LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.), seguido del bloqueo con regulador de bloqueo Odyssey (927-500000, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.) en solución salina regulador Tris con 0,1 % de Tween 20 y tinción con anticuerpos contra GAA (ab137068, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.) o anti-GAPDH (ab9484, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.) y el secundario apropiado (926-32213 o 925-68070, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.). Se tomaron imágenes de las transferencias con un LI-COR Odyssey CLx.

La intensidad de la banda de proteína se cuantificó en el software LI-COR Image Studio. La cuantificación de la banda madura de GAA de 77 kDa para cada muestra se determinó primero normalizando la señal TPS del carril y después normalizando los niveles de GAA en el suero (control de carga y control de expresión hepática, respectivamente). Después se compararon los valores con el grupo de control positivo anti-ratón TfRscfv:hGAA en *peso* de ratones y grupo de control negativo anti-mTfRscfv:hGAA en *Tfrc*$^{Hum\ hum}$ de ratones (**FIGURAS 18A-18C, Tabla 31**). El scFv 8D3 (anti-ratón TfR scFv) tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGNSLTLSCVASGFTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIYYDSSK MNYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAMYYCAVPTSHYVVDVWGQGVSV TVSS (sec. con núm. de ident.: 536), y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera: DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLAWYQQKPGKSPQLLIYGATSLADG VPSRFSGSRSGTQFSLKISRVQVEDIGIYYCLQAYNTPWTFGGGTKLELK (sec. con núm. de ident.: 537).

Tabla 31. Cuantificación de la proteína hGAA madura en el homogeneizado de cerebro de ratones tratados con HDD con plásmidos anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Genotipo**	**Proteína hGAA madura en cerebro (normalizada a control positivo)**
anti-mTfRscfv:hGAA (control positivo)	*Silvestre*	1,00±0,43*
anti-mTfRscfv:hGAA (control negativo)	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,02±0,03
69261scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,67±0,50
69307scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	1,08±0,19
69323scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,91±0,46
69329scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,65±0,13
69340scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,55±0,58
69348scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,50±0,05
12795scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,27±0,20
12798scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,72±0,42
12799scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	1,05±0,51*
12801scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,49±0,18
12802scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,29±0,27
12839scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	1,29±0,27**
12841scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	1,72±0,06***
12843scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	1,79±0,85***
12845scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	3,08±0,92***

12847scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,24±0,30
12848scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,59±0,16
12850scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,47±0,05

Los datos se cuantificaron a partir de la transferencia western como unidades arbitrarias (**FIGURAS 18A-18C**). Todos los valores son media ± SD, *n*=3-6 por grupo. ANOVA de una vía en comparación con el control negativo anti-mTfRscfv:hGAA en *Tfrc*$^{Hum\ hum}$ de ratones; **p*<0,05; ***p*<0,005; ****p*<0,0001;

Agotamiento capilar de muestras de cerebro después de HDD de plásmidos anti-hTfRscfv:hGAA. Los anti-hTfRscfv:hGAA seleccionados de la **Tabla 31** fueron probados en un cribado secundario en *Tfrc*^{hum} de ratones para determinar si hGAA estaba presente en el parénquima cerebral y no atrapado en las células endoteliales BBB. Se seleccionaron cuatro scFv (12799, 12839, 12843 y 12847) de este cribado basados en la hGAA madura en la fracción de parénquima en la transferencia western, así como una alta afinidad por TfR de cynomolgus.

Los animales de tres meses de edad se trataron por HDD como se detalló anteriormente. 48 horas después de la inyección, los ratones se perfundieron con 30 ml de solución salina al 0,9 % inmediatamente después del sacrificio por asfixia con CO_2. Se tomó un corte coronal de 2 mm de cerebro entre bregma y -2 mm bregma y se colocó en 700 µl de regulador fisiológico (10 mM HEPES, 4 mM KCl,

2,8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM NaH_2PO_4, 10 mM D-glucosa en 0,9 % de solución salina pH 7,4) en hielo. Los cortes de cerebro se homogeneizaron suavemente en hielo con un homogeneizador de vidrio. Se añadió un volumen equivalente a 26 % de dextrano (MW 70,000 Da) en regulador fisiológico (13 % de dextrano final) y se homogeneizó 10 golpes más. Las fracciones de parénquima (sobrenadante) y endotelial (gránulo) se separaron por centrifugación a 5400 *g* por 15 min a 4 °C. La transferencia western anti-hGAA se realizó en fracciones como se detalla más arriba (**FIGURA 19, Tabla 32**). Las transferencias también se probaron con un marcador endotelial anti-CD31 (Abcam ab182982).

Tabla 32. Cuantificación de proteína hGAA madura en fracciones de parénquima cerebral y fracciones endoteliales BBB de ratones tratados con HDD con plásmidos anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Genotipo**	**Proteína hGAA madura en parénquima cerebral (normalizada por control positivo)**	**Proteína hGAA madura en endotelio cerebral (normalizada por control positivo)**	**Afinidad por mfTfR (% de unión a hTfR)**
anti-mTfRscfv:hGAA (control positivo)	*Silvestre*	1,00	5,82	ND
anti-mTfRscfv:hGAA (control negativo)	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,00	0,01	ND
69307scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	1,24	10,73	0 %
69323scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,62	4,18	7 %
12798scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,91	8,37	34 %
12799scfv:hGAA	*Tfrc$^{hum/hum}$*	0,44	3,99	126 %

12839scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,05	0,84	78 %
12841scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,78	4,23	8 %
12843scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,13	12,99	75 %
12845scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	2,04	13,06	25 %
12847scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,60	4,96	102 %
12848scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,17	1,24	29 %
12850scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,22	2,25	13 %

La proteína hGAA se cuantificó a partir de la transferencia western como unidades arbitrarias (**FIGURA 19**). *n*=1 por grupo. Los datos de TfR Luminex de afinidad con el macaco cynomolgus, calculados como porcentaje de unión a hTfR: $(unión\ mfTfR \div unión\ hTfR) \times 100$.

Tabla 33. Cuantificación de proteína hGAA en cuádriceps de ratones tratados con HDD con plásmidos anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Genotipo**	**Proteína hGAA en cuádriceps (normalizado por control positivo)**
Solución salina (vehículo)	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,38±0,25
anti-mTfRscfv:hGAA (control positivo)	*Silvestre*	1,07±0,27
anti-mTfRscfv:hGAA (control negativo)	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,56±0,17
69307scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,58±0,18
69323scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,10±0,19
12798scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,33±0,56
12799scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,67±0,18
12839scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,80±0,18
12841scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,15±0,12
12843scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,78±0,43
12845scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,70±1,33
12847scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	7,74±9,42
12848scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,82±0,18
12850scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,76±0,34

Los datos se cuantificaron a partir de la transferencia western como unidades arbitrarias (**FIGURA 19**). Todos los valores son medios ± DS, *n*=2-4 por grupo.

Agotamiento capilar de muestras de cerebro de ratón después del tratamiento con depósito hepático AAV8 anti-hTfRscfv:hGAA. Para confirmar nuestros hallazgos del cribado de HDD en un modelo de tratamiento a más largo plazo, se trató *Tfrc*^{hum} de ratones con anti-hTfRscfv:GAA seleccionados suministrados como depósito hepático episomal AAV8 anti-hTfRscfv:GAA bajo el promotor *TTR*. Se encontró que los 4 anti-hTfRscfv:GAA suministraron hGAA madura al parénquima cerebral cuando se suministraron como AAV8.

Producción de AAV y transducción in vivo. Se produjo AAV8 recombinante (AAV2/8) en células HEK293. Las células se transfectaron con tres plásmidos que codifican genes auxiliares de adenovirus, genes rep y cap de AAV8 y genomas de AAV recombinantes que contienen transgenes flanqueados por repeticiones terminales inversas (ITR) de AAV2. En el día 5, las células y el medio se recogieron, centrifugaron y procesaron para la purificación de AAV. Los sedimentos celulares se lisaron mediante congelación-descongelación y se aclararon mediante centrifugación. Los lisados de células procesadas y el medio se superpusieron en columnas de gradientes de iodixanol y se centrifugaron en una ultracentrifugadora. Las fracciones de virus se eliminaron de la interfaz entre las soluciones de 40 % y

60 % de iodixanol y se intercambiaron en 1xPBS con columnas de desalinización. Los AAV vg se cuantificaron por ddPCR. Los AAV se diluyeron en PBS + 0,001 % de F-68 Pluronic inmediatamente antes de la inyección. A ratones *Tfrc*^{hum} de tres meses de edad se les administró 3e12 vg/kg de peso corporal en un volumen de ~100 µl. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después de la inyección y se realizaron el agotamiento capilar y la transferencia Western como se describió anteriormente (**Figura 20, Tabla 34**).

Tabla 34. Cuantificación de la proteína hGAA madura en fracciones de parénquima cerebral y fracciones endoteliales BBB de ratones tratados con depósito hepático AAV8 anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Genotipo**	**Proteína hGAA madura en parénquima cerebral (normalizada por control positivo)**	**Proteína hGAA madura en endotelio cerebral (normalizada por control positivo)**
anti-mTfRscfv:hGAA (control positivo)	*Silvestre*	1,00	1,00
anti-mTfRscfv:hGAA (control negativo)	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,02	0,01
12799scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,94	0,94
12839scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,49	0,62
12843scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	0,61	0,63
12847scfv:hGAA	*Tfrc*$^{hum/hum}$	1,90	1,33

Los datos se cuantificaron a partir de la transferencia western como unidades arbitrarias (**FIGURS 20**) *n*=1 por grupo.

Rescate del fenotipo de depósito de glucógeno en *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de ratones con depósito hepático episomal AAV8 anti-hTfRscfv:GAA. Sometimos a prueba cuatro de los scfv:GAAanti-hTfR del experimento anterior en ratones de modelo de enfermedad de Pompe para determinar si scfv:GAAhTfR rescató el fenotipo por almacenamiento de glucógeno. Encontramos que los cuatro (12839, 12843, 12847, 12799) normalizaron el glucógeno a los niveles *Wt*.

La producción de AAV y la transducción *in vivo* se realizaron como antes. Los ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de tres meses de edad recibieron dosis de 2e12 vg/kg de AAV8. Los tejidos se cosecharon 4 semanas después de la inyección y se congelaron instantáneamente como anteriormente. La transferencia Western de hGAA se realizó como anteriormente (**Figura 21, Tabla 35**).

Cuantificación de glucógeno (**Tabla 36, Figuras 22A-22C**). Los tejidos se diseccionaron de los ratones inmediatamente después del sacrificio por asfixia con CO_2, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Los tejidos se lisaron en un homogeneizador de sobremesa con bolillas de acero inoxidable en agua destilada para las mediciones de glucógeno o regulador RIPA para el análisis de proteínas. Los lisados del análisis de glucógeno se hirvieron y se centrifugaron para eliminar los residuos. Las mediciones de glucógeno se realizaron fluorométricamente con un

equipo comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (K646, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.). Todos los grupos tenían una homeostasis del hierro normal a las 4 semanas después de la inyección (hierro sérico, TIBC, hepcidina, hierro tisular, transferrina tisular).

Tabla 35. Cuantificación de la proteína hGAA en tejidos de *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de ratones tratados con depósito de hígado AAV8 anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	***n***	**Suero ***	**Hígado ***	**Cerebro ****	**Cerebelo ****	**Médula espinal ****	**Corazón ****	**Cuádriceps ****
***Gaa*$^{-/-}$ sin tratar**	1	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01
***Gaa*$^{-/-}$ 12839scfv:hGO**	3	2,42± 2,41	1,63± 0,96	0,14± 0,12	0,13± 0,12	0,19± 0,19	0,53± 0,52	0,14± 0,16
***Gaa*$^{-/-}$ 12843scfv:hGAA**	3	2,07± 1,35	2,23± 0,08	0,17± 0,07	0,11± 0,05	0,17± 0,09	0,49± 0,31	0,18± 0,06
***Gaa*$^{-/-}$ 12847scfv:hGAA**	3	1,56± 0,71	1,40± 0,13	0,25± 0,04	0,21± 0,09	0,42± 0,19	0,58± 0,17	0,19± 0,08

Los datos se cuantificaron a partir de la transferencia Western como unidades arbitrarias (**Figura 21**). Todos los valores son medios ± DS, *n*=1-3 por grupo. *Proteína hGAA total; **Proteína hGAA madura.

Tabla 36. Cuantificación del glucógeno en tejidos de Gaa-/-/Tfrchum de ratones tratados con depósito de hígado AAV8 anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Cerebro**	**Cerebelo**	**Médula espinal**	**Corazón**	**Cuádriceps**	**GRD**
***Peso* sin tratar**	0,06±0,04*	0,01±0,04*	0,05±0,05*	0,08±0,02*	0,34±0,19*	0,018
***Gaa*-/- sin tratar**	2,34±0,58	2,51±0,38	3,08±0,23	25,30±6,06	13,05±0,98	2,58
***Gaa*-/- 12839scfv:hGO**	0,11±0,03*	0,46±0,08*	0,08±0,10*	0,68±0,68*	2,15±2,52*	
***Gaa*-/- 12843scfv:hGAA**	0,09±0,02*	0,09±0,08*	0,13±0,13*	0,09±0,01*	1,22±1,39*	
***Gaa*-/- 12847scfv:hGAA**	0,05±0,01*	0,02±0,03*	0,20±0,33*	0,11±0,11*	0,80±0,79*	0,066
Grupo de tratamiento	**Cerebro**	**Cerebelo**	**Médula espinal**	**Corazón**	**Cuádriceps**	
***Peso* sin tratar**	0,043± 0,016*	0,023± 0,008*	0,105± 0,093*	0,083± 0,022*	0,247± 0,045*	
***Gaa*-/- sin tratar**	3,16±0,837	3,043± 0,932	3,22±0,414	34,48± 5,580	11,05± 2,192	
***Gaa*-/- 12799scfv: hGAA**	0,063± 0,023*	0,107± 0,078*	0,084± 0,019*	0,123± 0,113*	0,725± 0,599*	

Todos los valores son µg glucógeno/mg tejido, media ± SD, *n*=3-4 por grupo. ANOVA de una vía *p<0,0001 en comparación con el grupo $Gaa^{-/-}$ no tratado. Para los GRD, se generó un único valor a partir de los GRD lumbares agrupados de 5 ratones por grupo.

Rescate del depósito de glucógeno en cerebro y músculo en $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ de ratones con depósito hepático episomal AAV8 anti-hTfRscfv:GAA. Se probaron tres anti-hTfRscfv:GAA seleccionados (12799, 12843 y 12847) en ratones modelo de la enfermedad de Pompe para determinar si hTfRscfv:GAA rescató el fenotipo de depósito de glucógeno. En este experimento, se realizó histología en secciones de cerebro y músculo para visualizar el glucógeno en los tejidos. Se encontró que los tres anti-hTfRscfv:GAA seleccionados redujeron la tinción de glucógeno en el

cerebro y el músculo. Se seleccionó 12847scfv:GAA para un análisis más detallado basado en estos datos.

La producción de AAV y la transducción *in vivo* se realizaron como antes. Los ratones con *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de tres meses de edad recibieron dosis de 4e11 vg/kg de AAV8. 4 semanas después de la inyección, los tejidos se congelaron para el análisis de glucógeno como se indicó anteriormente (**Tabla 37**). Para la histología, los animales se perfundieron con solución salina (0,9 % de NaCl) y los tejidos se fijaron con gota durante la noche en 10 % de formalina regulada normal. Los tejidos se lavaron 3 veces en PBS y se almacenaron en 0,01 % de PBS/azida sódica hasta la inserción. Los tejidos se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 5 um de cerebro (coronal, bregma de -2 mm) y cuádriceps (sección transversal de fibra). Las secciones se tiñeron con ácido peryódico de Schiff y hematoxilina usando protocolos estándar (**FIGURAS 23A-23D**).

Tabla 37. Cuantificación del glucógeno en tejidos de *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de ratones tratados con depósito de hígado AAV8 anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Cerebelo**	**Cuádriceps**
***Peso* sin tratar**	0,02±0,03*	0,55±0,10*
***Gaa*-/- sin tratar**	1,91±0,26	12,19±3,02
***Gaa*-/- 12799scfv: hGAA**	0,10±0,06*	1,34±0,9*
***Gaa*-/- 12843scfv:hGAA**	0,09±0,06*	1,09±1,27*

***Gaa*-/- 12847scfv:hGAA**	0,07±0,06*	0,72±0,64*

Todos los valores son glucógeno µg/mg tejido, media ± SD, *n*=5-8 por grupo. ANOVA de una vía *p<0,0001 en comparación con el grupo *Gaa*$^{-/-}$ no tratado.

Inserción de anti-hTfR 12847scfv:GAA en *Gaa*$^{-/-}$ */Tfrc*^{hum} de ratones. Se probó el anti-hTfR 12847scfv:GAA seleccionado en ratones modelo de la enfermedad de Pompe mediante la inserción de albúmina para determinar si se podía replicar los resultados que se vieron con la expresión episomal del depósito hepático de AAV8. La inserción de albúmina de 12847scfv:GAA suministró proteína hGAA madura al cerebro y al músculo, y rescató el fenotipo de depósito de glucógeno en *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de ratones. Estos datos se generaron con la secuencia nativa 12847scfv:GAA que no se encuentra optimizada.

Se comparó 12847scfv:GAA con el anti-hCD63scfv:GAA dirigido al músculo en *Gaa*$^{-/-}$*/Cd63*^{hum} de ratones. En este experimento en particular, la expresión de anti-hCD63scfv:GAA fue más baja de lo habitual y no suministra tanta proteína GAA al músculo ni normaliza el glucógeno como suele hacerlo. Esto puede hacer que parezca que anti-hCD63scfv:GAA es menos efectivo que 12847scfv:GAA en el músculo, pero en la mayoría de los experimentos se encontró que son comparables en el músculo.

Producción de AAV. Se creó un plásmido genómico de AAV sin promotor con la secuencia 12847scfv:GAA y el sitio aceptor de empalme del exón 1 de albúmina de ratón en el extremo 3'. Se produjo AAV8 recombinante (AAV2/8) en células HEK293. Las células se transfectaron con tres plásmidos que codifican genes auxiliares de adenovirus, genes rep y cap de AAV8 y genomas de AAV recombinantes que contienen transgenes flanqueados por repeticiones terminales inversas (ITR) de AAV2. En el día 5, las células y el medio se recogieron, centrifugaron y procesaron para la purificación de AAV. Los sedimentos celulares se lisaron mediante congelación-descongelación y se aclararon mediante centrifugación. Los lisados de células procesadas y el medio se superpusieron en columnas de gradientes de iodixanol y se centrifugaron en una ultracentrifugadora. Las fracciones de virus se eliminaron de la interfaz entre las soluciones de 40 % y 60 % de iodixanol y se intercambiaron en 1xPBS con columnas de desalinización. Los AAV vg se cuantificaron por ddPCR.

Inserción de CRISPR/Cas9 *in vivo* en el locus de la albúmina. Los ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} de 3 meses de edad recibieron la dosis mediante una inyección en la vena de la cola d 3e12 vg/kg de AAV8 12847scfv:GAA y 3 mg/kg de ARNm de LNP G666/Cas9 diluido en PBS + 0,001 % F-68 Pluronic. Los ratones se sacrificaron 3 semanas después de la inyección. Los ratones de control negativo recibieron AAV8 de inserción sin LNP. Los ratones de control positivo recibieron la dosis

de 4e11 vg/kg de depósito hepático episomal AAV8 12847scfv:GAA bajo el promotor *TTR* (datos de rescate de fenotipo mostrados anteriormente). Los tejidos se diseccionaron de los ratones inmediatamente después del sacrificio por asfixia con CO_2, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se recolectó sangre de ratones mediante punción cardíaca inmediatamente después de la asfixia con CO_2 y el suero se separó usando tubos separadores de suero (BD Biosciences, 365967).

Tabla 38. Grupos de tratamiento y controles.

Grupo de tratamiento	**Genotipo**	**Función**
***Peso* sin tratar**	*Tfrc^{hum}*	Control de ratón normal sin tratar
***Gaa*$^{-/-}$ sin tratar**	*Gaa$^{-/-}$/ Tfrc^{hum}*	Ratón con enfermedad de Pompe no tratado
***Gaa*$^{-/-}$ inserción solo de AAV**	*Gaa$^{-/-}$/ Tfrc^{hum}*	Control negativo para la inserción (no se suministró Cas9/gRNA)
***Gaa*$^{-/-}$ episomal AAV8 TTR 12847scfv:hGAA**	*Gaa$^{-/-}$/ Tfrc^{hum}*	Control positivo, rescate previamente mostrado del fenotipo de depósito de glucógeno
***Gaa*$^{-/-}$ inserción 12847scfv:hGAA**	*Gaa$^{-/-}$/ Tfrc^{hum}*	Grupo de inserción experimental
***Gaa*$^{-/-}$ sin tratar**	*Gaa$^{-/-}$/ Cd63^{hum}*	Ratón con enfermedad de Pompe no tratado (CD63 humanizado)
***Gaa*$^{-/-}$ inserción anti-CD63scfv:hGAA**	*Gaa$^{-/-}$/ Cd63^{hum}*	Control negativo para cruce de BBB (dirigido al músculo)

*Transferencia Western (**Tabla 39, Figura 24A**).* Los lisados de tejidos se prepararon mediante lisis en el regulador RIPA con inhibidores de proteasa (1861282, Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.). Los lisados de tejidos se

homogeneizaron con un homogeneizador de bolillas (FastPrep5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE. UU.). Los lisados de células o tejidos se ejecutaron en geles SDS-PAGE usando el sistema Novex (LifeTech Thermo, XPO4200BOX, LC2675, LC3675, LC2676). Los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de baja fluorescencia (IPFL07810, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.) y se tiñeron con Revert 700 Total Protein Stain (TPS; 926-11010 LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.), seguido del bloqueo con regulador de bloqueo Odyssey (927-500000, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.) en solución salina regulador Tris con 0,1 % de Tween 20 y tinción con anticuerpos contra GAA (ab137068, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.) o anti-GAPDH (ab9484, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.) y el secundario apropiado (926-32213 o 925-68070, LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.). Se tomaron imágenes de las transferencias con un LI-COR Odyssey CLx.

La intensidad de la banda de proteína se cuantificó en el software LI-COR Image Studio. La cuantificación de la banda GAA madura de 77 kDa para cada muestra se determinó mediante la normalización a la señal TPS del carril (control de carga).

*Cuantificación de glucógeno (**Tabla 40, Figura 24B**).* Los tejidos se diseccionaron de los ratones inmediatamente después del sacrificio por asfixia con CO_2, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Los tejidos se lisaron en un

homogeneizador de sobremesa con bolillas de acero inoxidable en agua destilada para las mediciones de glucógeno o regulador RIPA para el análisis de proteínas. Los lisados del análisis de glucógeno se hirvieron y se centrifugaron para eliminar los residuos. Las mediciones de glucógeno se realizaron fluorométricamente con un equipo comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (K646, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.).

Tabla 39. Cuantificación de la proteína hGAA en tejidos de *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} de ratones tratados con inserción anti-hTfR 12847scfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Hígado hGAA totales**	**Suero hGAA totales**	**HGAA cerebral temprano**	**hGAA maduro de cuádriceps**
***Gaa*$^{-/-}$ inserción de solo AAV control negativo**	0,02±0,003	0,03± 0,02	0,002± 0,001	0,006± 0,002
***Gaa*$^{-/-}$ episomal AAV8 TTR 12847scfv:hGAA**	2,35±0,72	3,65± 2,09	0,49± 0,20§§	0,148± 0,043§§
***Gaa*$^{-/-}$ inserción 12847scfv:hGAA**	4,31±0,87*	3,47± 2,37	0,57± 0,26§§	0,141± 0,062§§
***Gaa*$^{-/-}$ inserción anti-CD63scfv:hGAA**	2,67±1,04*	0,93± 0,55*	0,01± 0,003	0,060± 0,037

Todos los valores son unidades arbitrarias, media ± SD, n=3-8 por grupo. ANOVA de una vía *p<0,05 en comparación con el grupo GAA *Gaa*$^{-/-}$ episomal AAV8 TTR 12847scfv; $^{§§}p$<0,001 en comparación con el grupo de control negativo de solo AAV.

Tabla 40. Cuantificación de glucógeno en tejidos de *Gaa*$^{-/-}$ */Tfrc*^{hum} de ratones tratados con inserción anti-hTfR 12847scfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	**Cerebro**	**Cuádriceps**
***Peso* sin tratar**	0,10±0,07	0,37±0,13
***Gaa*$^{-/-}$*/ Tfrc*^{hum} sin tratar (*Tfrc*^{hum})**	2,76±0,41	12,75±1,88
***Gaa*$^{-/-}$*/ Tfrc*^{hum} inserción solo de AAV**	2,17±0,40*	10,64±2,56
***Gaa*$^{-/-}$*/ Tfrc*^{hum} episomal AAV8 TTR 12847scfv:hGAA**	0,13±0,03***§	2,44±2,21***§
***Gaa*$^{-/-}$*/ Tfrc*^{hum} inserción 12847scfv:hGAA**	0,16±0,05***§	1,67±0,76***§
***Gaa*$^{-/-}$*/ Cd63*^{hum} sin tratar**	2,34±0,30	11,91±1,01
***Gaa*$^{-/-}$*/ Cd63*^{hum} inserción anti-CD63scfv:hGAA**	1,71±0,20*	4,06±0,13**

Todos los valores son glucógeno µg/mg tejido, media ± SD, *n*=3-8 por grupo. ANOVA de una vía *p<0,01 en comparación con el grupo *Gaa*$^{-/-}$*/Cd63*^{hum} no tratado; **p<0,001 en comparación con el grupo *Gaa*$^{-/-}$*/Cd63*^{hum} no tratado; ***p<0,0001 en comparación con el grupo *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} no tratado; §no significativo en comparación con el *peso* del grupo no tratado.

Después se realizan experimentos similares en los que Gaa$^{-/-}$ neonatal;Tfrc$^{hu/hu}$ de los ratones se dosifican por vía intravenosa en P1 con lo siguiente: (1) AAV8 recombinante que codifica anti-TfR:GAA; o (2) plantilla de inserción de LNP-g666 y AAV8 recombinante anti-TfR:GAA. Gaa$^{-/-}$ sin tratar;Tfrc$^{hu/hu}$ ratones y silvestres se usan como controles. La sangre se recolecta y el suero se prepara en diversos puntos de tiempo después de las administraciones,

y los tejidos se recogen en diversos puntos de tiempo después de la administración. Se miden los niveles séricos de anti-TfR:GAA y los niveles de glucógeno en diversos músculos y tejidos del SNC a lo largo del tiempo.

Para evaluar si la reducción de glucógeno se traduce en una función muscular mejorada, los ratones se prueban en aparatos de fuerza de agarre en un momento posterior a la administración. La fuerza de agarre se midió con un medidor de fuerza (Columbus Instruments, Columbus, OH, EE. UU.). Todas las pruebas se realizan por triplicado.

En breve, la combinación de la tecnología CRISPR/Cas9 de alta precisión y dirigida suministrada mediante LNP y la plantilla de ADN anti-TfR:GAA suministrada por el vector rAAV8 seleccionado permite la expresión a largo plazo de la proteína anti-TfR:GAA de los hepatocitos y el suministro a las células musculares y las células del SNC afectadas en la PD, lo que podría proporcionar un tratamiento efectivo de por vida a los pacientes con PD, lo que incluye los pacientes neonatales.

Ejemplo 7. Plantillas de ADN Anti-TfR:GAA optimizadas

Se diseñaron y generaron plantillas anti-TfR:GAA optimizadas para desarrollar una pista para estudios de primates no humanos (NHP). Para seleccionar un candidato de desarrollo, se generaron varias versiones de las cuatro plantillas de inserción anti-TfR:GAA candidatas en las que

se modifica la secuencia de nucleótidos que codifica el anti-TfR:GAA (p. ej., mediante el agotamiento de CpG). Las **Tablas 41** y **42** enumeran las diferentes versiones de insertos diseñados anti-TfR:GAA. Cada uno de los insertos anti-TfR:GAA en la **Tabla 42** usa la secuencia GAA optimizada expuesta en la sec. con núm. de ident.: 176.

Tabla 41. Insertos anti-TfR:GAA para los casetes de inserción.

Inserto anti-TfR:GAA	**CpG**	**Sec. con núm. de ident. (GAA optimizada)**
12799 – DC	0	205
12799 – GS	0	206
12799 – 1ª generación	160	174
12839 – DC	0	207
12839 – GS	0	208
12839 – 1ª generación	163	174
12843 – DC	0	209
12843 – GS	0	210
12843 – 1ª generación	160	174
12847 – DC	0	211
12847 – GS	0	212
12847 – 1ª generación	160	174

Tabla 42. Insertos anti-TfR:GAA para los casetes de inserción.

Inserto anti-TfR:GAA	**CpG en transgén**	**Sec. con núm. de ident.**
12799 1ª generación	160	574
12799 GA 0	0	578
12799 GS 0	0	579
12799 GS 0v2	0	580

12843 1ª generación	160	576
12843 GA 0	0	581
12843 GS 0	0	582
12843 GS 0v2	0	583
12847 1ª generación	160	577
12847 GA 0	0	584
12847 GS 0	0	585
12847 GS 0v2	0	586

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre humana. Se enriquecieron células dendríticas plasmocitoides (pDC) y se combinaron con pBMC (1e4 pDC + 1e5 PBMC por pocillo). Las células se incuban durante 16-18 horas con AAV o oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) de control. Se recogen los sobrenadantes y se realiza un ELISA de IFNα. Este ensayo evaluó si las secuencias anti-TfR:GAA sin CpG exhibieron respuestas reducidas de IFN-I en un ensayo basado en DC plasmocitoide humano primario en comparación con secuencias no carentes de CpG.

Actividad de las diversas plantillas anti-TfR:GAA optimizadas 12847 (sec. con núms. de ident.: 732-735 o 584-586 (secuencias codificantes)) y 12843 plantillas optimizadas anti-TFR:GAA (sec. con núm. de ident.: 729-731 o 581-583 (secuencias codificantes)) se analizaron en un ensayo primario de hepatocitos humanos. Las plantillas de AAV se empaquetaron en virus AAV2. Los hepatocitos humanos primarios se cultivaron en placas de 96 pocillos y se les administró el AAV que contiene la plantilla de ADN y LNP-g9860 a una MOI fija (6e4) con titulación de dosis de LNP.

Los sobrenadantes se recogieron 7 días después de la dosificación y se almacenaron a -80 grados Celsius. Los sobrenadantes se descongelaron y la actividad de GAA en los sobrenadantes se midió usando un ensayo fluorométrico basado en 4-metilumbeliferona (K690, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.) como medida de la cantidad de GAA enzimáticamente activa producida y secretada por las células. Como se muestra en **las Figuras 25A-25B**, todas las plantillas anti-TfR:GAA agotadas en CpG exhibieron una actividad GAA aumentada en el sobrenadante de hepatocito humano primario en comparación con las plantillas anti-TfR:GAA nativas.

La actividad de las plantillas optimizadas se probó en un ensayo primario de hepatocitos humanos. Las plantillas de AAV se empaquetan en los virus AAV2. Los hepatocitos humanos primarios se cultivaron en placas de 96 pocillos y se les administró el AAV que contiene la plantilla de ADN y LNP-g9860 a una concentración de LNP fija con titulación de dosis de AAV. Los sobrenadantes se recogieron 7 días después de la dosificación y se almacenaron a -80 grados Celsius. Los sobrenadantes se descongelaron y la actividad de GAA en los sobrenadantes se midió usando un ensayo fluorométrico basado en 4-metilumbeliferona (K690, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.) como medida de la cantidad de GAA enzimáticamente activa producida y secretada por las células.

La actividad de la plantilla optimizada 12847 scFv:GAA 0 CpG v0 (sec. con núm. de ident.: 733 o 584

(secuencia codificante)) después se validó en el modelo de ratón PD, $Gaa^{-/-}$;$Tfrc^{hu/hu}$, como se describe en el Ejemplo 6. Ratones de tres meses de edad ($Gaa^{-/-}$;Ratones $Tfrc^{hu/hu}$ y $Gaa^{-/-}$;ratones $CD63^{hu/hu}$) se les administró por vía intravenosa 3 mg/kg de LNP-g9860 y 3ev12 vg/kg de AAV8 anti-TfR:plantillas GAA (nativos o 12847 0 CpG v0) y anti-CD63 optimizado:plantilla GAA (GA 0 CpG anti-CD63:plantilla GAA; sec. con núm. de ident.: 736 o 196 (secuencia codificante)), respectivamente. Se realizaron inmunoelectrotransferencias para GAA (scFv:GAA y GAA madura) como en el Ejemplo 6 y se confirmó el suministro de GAA al encéfalo (cerebro) después de la inserción de albúmina de la plantilla anti-TfR:GAA nativa o la plantilla anti-TfR:GAA 0 CpG (**Figura 26A**). La cuantificación de glucógeno en el cerebro, cuádriceps, diafragma y corazón también se realizó como en el Ejemplo 6 y confirmó que la inserción de albúmina de las plantillas anti-TfR:GAA con 0 CpG retenía la unión de TfR y la actividad GAA *in vivo* y que la secuencia carente de CpG fue tan efectiva como la secuencia nativa para rescatar el fenotipo de almacenamiento de glucógeno en $Gaa^{-/-}$;Ratones $Tfrc^{hu/hu}$ (**Figura 26B y Tabla 43**).

Tabla 43. Cuantificación de glucógeno en tejidos de ratones *Gaa*$^{-/-}$*/Tfrc*^{hum} tratados con plantillas de inserción anti-hTfRscfv:hGAA.

Grupo de tratamiento	Cerebro	Diafragma	Corazón	Cuádriceps
hTFRC Wt	0,256± 0,175*	2,44± 1,97*	0,042± 0,022*	0,724± 0,611*
hTFRC Gaa-/- no tratada	2,56± 0,237	17,54± 1,72	34,56± 6,36	7,96± 1,38
hTFRC Gaa*$^{-/-}$ *12847:GAA nativa	0,076± 0,022*	1,30± 0,973*	0,405± 0,351*	1,48± 0,867*
hTFRC Gaa*$^{-/-}$ *12847:GAA 0CpG	0,114± 0,049*	1,55± 1,60*	0,35± .372*	1,21± 0,821*
hCD63 Gaa*$^{-/-}$ *no tratada	2,39± 0,432	18,30± 2,62	30,88± 2,451	7,37± 1,134
hCD63 Gaa*$^{-/-}$ *CD63:GAA 0CpG	1,68± 0,220*	0,544± 0,294*	0,0634± 0,045*	0,803± 0,297*

Todos los valores son glucógeno µg/mg tejido, media ± SD, *n*=5-8 por grupo. ANOVA de una vía *p<0,0001 vs. grupo *hTFRCGaa*$^{-/-}$no tratado.

La expresión de las plantillas optimizadas (12847 scFv:GAA 0 CpG v0 (sec. con núm. de ident.: 733 o 584 (secuencia codificante)), y 12843 scFv:GAA 0 CpG v0 (sec. con núm. de ident.: 729 o 581 (secuencia codificante))) se evalúa en primates no humanos. La expresión se evalúa mediante la administración de LNP-g9860 como se describe en el Ejemplo 1 y rAAV8 que comprende cada plantilla optimizada. La expresión se analiza en un estudio de varias semanas. Los tejidos también se recolectan para el análisis de la biodistribución de GAA, y la actividad de GAA se evalúa en los tejidos recolectados.

Tabla 44. Estudio para evaluar la expresión de plantillas de inserción anti-TfR:GAA carentes de CpG en primates no humanos.

Grupo	**Nombre**	**Vector AAV8**	**Dosis de AAV8**	**Dosis de LNP**	**Guía**	**n**
1	Control de vehículo	Solo vehículo	Solo vehículo	Solo vehículo	N/A	1
2	Anti-CD63:GAA Control solo AAV	Anti-CD63:GAA	1,5e13 vg/kg	Solo vehículo	N/A	1
3	Anti-CD63:GAA	Anti-CD63:GAA	1,5e13 vg/kg	LNP 3 mg/kg	G9860	4
4	Anti-CD63:GAA ARNg alt	Anti-CD63:GAA	1,5e13 vg/kg	LNP 3 mg/kg	G9844	4
5	12847 Anti-TfR:GAA Control solo AAV	Anti-TfR:GAA #1	1,5e13 vg/kg	Solo vehículo	N/A	1
6	12847 Anti-TfR:GAA	Anti-TfR:GAA #1	1,5e13 vg/kg	LNP 3 mg/kg	G9860	4
7	12847 Anti-TfR:GAA ARNg alt	Anti-TfR:GAA #1	1,5e13 vg/kg	LNP 3 mg/kg	G9844	4
8	12843 anti-TfR:GAA Control solo AAV	Anti-TfR:GAA núm. 2	1,5e13 vg/kg	Solo vehículo	N/A	1
9	12843 anti-TfR:GAA	Anti-TfR:GAA núm. 2	1,5e13 vg/kg	LNP 3 mg/kg	G9860	4
10	12843 anti-TfR:GAA ARNg alt	Anti-TfR:GAA núm. 2	1,5e13 vg/kg	LNP 3 mg/kg	G9844	4
					Total de animales:	28

Tabla 45. Secuencias GAA adicionales.

Nombre de secuencia	**Aminoácidos**
GAA_1 77 (sec. con núm de ident.: 213).	GHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNS RFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYT ATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYS VEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLST SWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRS TGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTR AHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGS YRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGM WIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYG LTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLL GVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKA LTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAG KAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRA GYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLAR NNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLL MGEQFLVSWC
GAA_2 22 (sec. con núm de ident.: 214).	LLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDK AITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP TFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPF GVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLW NRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVY IFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQ WNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGL RRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPS NFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASH RALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGAD VCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALL PHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYF PLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQG PGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNEL VRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVS WC
GAA_3 61 (sec. con núm de ident.: 215).	AHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFP PSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRY EVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSL PSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLL NSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLC RWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGG RRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATI CASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVW SSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLS LPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTV DHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSE GQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDG ESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPV SNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC