

PARTÍCULAS VIRALES MODIFICADAS Y USOS DE ESTAS

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

PRESENTADO COMO UN ARCHIVO DE TEXTO A TRAVÉS DE EFS WEB

- 5 El listado de secuencias escrito en el archivo 10364WO01_ST25.txt tiene 269 kilobytes, se creó el 19 de mayo de 2020, y se incorpora como referencia.

CAMPO TÉCNICO

- 10 La descripción en la presente descripción se refiere a los métodos para elaborar y usar partículas de AAV recombinantes que comprenden las proteínas de la cápside de un AAV de animal no primate y/o un AAV remoto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 El suministro de genes en células diana particulares se ha convertido en una de las tecnologías más importantes en medicina moderna para el tratamiento potencial de una variedad de enfermedades crónicas y genéticas. Hasta el momento, el progreso en la aplicación clínica de la terapia génica se ha limitado por la falta de vehículos de suministro génico ideales.

- 20 Idealmente, un vehículo de suministro de genes es capaz de (1) introducir material genético de manera estable en las células deseadas, (2) evitar la introducción de material genético en células que no son la diana y (3) escapar de la neutralización por parte del sistema inmunológico de un paciente, por ejemplo, los anticuerpos de un paciente. Aunque actualmente se encuentran disponibles varios vehículos no patogénicos, la capacidad de estos vehículos para transducir células específicas y permanecer invisibles para las respuestas inmunitarias del huésped sigue siendo menos que ideal.

- 25 Por ejemplo, las partículas virales basadas en virus adenoasociados (AAV) aisladas de primates, particularmente humanos, por ejemplo, los serotipos de AAV AAV2, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9, han sido foco de muchas investigaciones, ya que los AVV son capaces de transducir una amplia gama de especies y tejidos de primates *in vivo* sin evidencia de toxicidad o patogenicidad. (Muzyczka, y otros. (1992) *Current Topics in Microbiology and Immunology*,
30 158:97-129). Además, el AAV se transduce de manera segura en tejidos posmitóticos. Aunque el virus puede integrarse ocasionalmente en los cromosomas del huésped, lo hace con muy poca frecuencia en un locus de puerto seguro en el cromosoma humano 19, y solo cuando las proteínas

de replicación (Rep) se suministran en trans. Los genomas de AAV circulan rápidamente y se concatenan en las células infectadas, y existen en un estado episomal estable en las células infectadas para proporcionar la expresión estable a largo plazo de sus cargas sueltas.

Adicionalmente, en los últimos años se ha logrado manipular y redirigir la infección por AAV de primates a células específicas. Muchos de los avances en la terapia génica dirigida mediante el uso de partículas virales pueden resumirse como modificaciones no recombinantes (no genéticas) o recombinantes (genéticas) de la partícula viral, lo que da como resultado el pseudotipado, expansión y/o redireccionamiento del tropismo natural de la partícula viral. (Revisado en Nicklin y Baker (2002) *Curr. Gene Ther.* 2:273-93; Verheiji y Rottier (2012) *Advances Virol* 2012:1-15).

En un enfoque de direccionamiento recombinante directo, un ligando de direccionamiento se inserta directamente en, o se acopla a, una cápside viral, es decir, los genes de cápsides virales de proteínas se modifican para expresar proteínas de la cápside viral que comprenden un ligando de direccionamiento heterólogo. Luego, el ligando de direccionamiento se redirige, por ejemplo, se une a un receptor o marcador expresado preferentemente o exclusivamente en una célula diana.

(Stachler y otros. (2006) *Gene Ther.* 13:926–931; White y otros. (2004) *Circulation* 109:513–519; véase también Park y otros, (2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653–59; Girod y otros. (1999) *Nature Medicine* 5:1052–56; Grifman y otros. (2001) *Molecular Therapy* 3:964–75; Shi y otros. (2001) *Human Gene Therapy* 12:1697–1711; Shi y Bartlett (2003) *Molecular Therapy* 7:515–525).

En enfoques recombinantes indirectos, una cápside viral se modifica con un “andamio” heterólogo, que luego se une a un adaptador que incluye un ligando de direccionamiento. El adaptador se une al andamio y a la célula diana. (Arnold y otros. (2006) *Mol. Ther.* 5:125-132; Ponnazhagen y otros. (2002) *J. Virol.* 76:12900–907; véase también el documento WO 97/05266). Andamios tales como

(1) moléculas de unión a Fc (por ejemplo, receptores de Fc, proteína A, etc.), que se unen al Fc de adaptadores de anticuerpos, (2) (estrepto)avidina, que se une a adaptadores biotinilados, (3) biotina, que se une a adaptadores fusionados con (estrepto)avidina, (4) una etiqueta detectable, que es útil para la detección y/o aislamiento de partículas virales, unido por un adaptador biespecífico capaz de unir no covalentemente la etiqueta detectable y la molécula diana, y recientemente (5) se han descrito pares de unión de proteína: proteína que forman enlaces isopéptidos para una variedad de partículas virales. (Véase, por ejemplo, Gigout y otros. (2005) *Molecular Therapy* 11:856–865; Stachler y otros. (2008) *Molecular Therapy* 16:1467–1473; Quetglas y otros. (2010) *Virus Research* 153:179–196; Ohno y otros. (1997) *Nature Biotechnology* 15:763–767; Klimstra y otros. (2005) *Virology* 338:9–21).

A pesar de los avances que proporcionan la capacidad de dirigir la infección por AAV, el AAV reorientado como vehículo de suministro de genes sigue siendo menos que ideal debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes contra las cápsides de AAV (NAb). La presencia de NAb de AAV en niños sugiere que la infección con un AAV ocurre en la vida temprana (Calcedo y otros. (2011) *ASGCT*; Huser y otros. (2017) *J. Virol.* 91: e02137-16). Se ha demostrado que los anticuerpos generados por infección por AAV en la vida temprana pueden comprometer el uso posterior de un vector de terapia génica de AAV derivado de AAV que es reconocido y neutralizado por esos anticuerpos preexistentes. (Hurlbut y otros. (2010) *Mol. Ther.* 18:1983-94; Jiang y otros. (2006) *Blood* 108:3321-8; Manno y otros. (2006) *Nat. Med.* 12:342-7; Scallan y otros. (2006) *Blood* 107:1810-7; Wang y otros. (2010) *Mol. Ther.* 18:126-34). Además, la presencia de títulos de anticuerpos neutralizantes contra un serotipo de AAV es clínicamente significativa, ya que los pacientes con títulos altos se consideran inelegibles para cualquier tratamiento que implique ese serotipo. (Jeune y otros. (2013) *Hum Gene Ther Methods* 24:59-67). Por lo tanto, existe una necesidad de sistemas virales que sean no patogénicos, adaptables para la transferencia dirigida de ácidos nucleicos de interés a una variedad de células diana, y que superen el obstáculo que suponen los anticuerpos preexistentes en pacientes que necesitan tratamiento.

SUMARIO DE LA INVENCION

En la presente descripción se describe una estrategia que puede mitigar simultáneamente varios problemas asociados con enfoques de tratamiento previos y actuales con partículas de virus adenoasociados (AAV). Sin desear limitarse a la teoría, se espera que la mayoría de los seres humanos carezcan de NAb preexistentes contra un AAV, cuya exposición previa por parte de los seres humanos sea baja. Sin embargo, la capacidad de dichos serotipos de AAV de manipularse con éxito para su uso como un vector de terapia génica capaz de dirigirse a células específicas, e infectarlas, y/o de evitar la reactividad cruzada por cualquier anticuerpo preexistente en la población humana permaneció hasta ahora desconocida.

En la presente descripción se muestra que una proteína de la cápside de AAV de una especie animal no primate puede modificarse para permitir la introducción dirigida de un nucleótido de interés en células de mamífero de una especie animal diferente. Además, lo que se muestra en la presente descripción es una prueba de que una partícula de AAV de un animal no primate así modificada sigue siendo menos probable que las modalidades terapéuticas actuales de AAV, que se basan en serotipos de AAV humanos bien caracterizados, de ser reconocida y/o detectada por

anticuerpos preexistentes que son encontrados en la población humana. En consecuencia, en la presente descripción se describen las partículas virales de AAV que son capaces de infectar una célula de elección y muy capaces de evadir la neutralización por parte de anticuerpos preexistentes. En la presente descripción se describen las partículas virales de AAV recombinantes que comprenden (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetadas dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV,

en donde al menos uno de:

- a) la proteína de la cápside de AAV VP1,
- b) cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1,
- c) la proteína de la cápside de AAV VP2,
- d) cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2,
- e) la proteína de la cápside de AAV VP3, y
- f) cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3,

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate o una porción de este, o un AAV remoto o una porción de este,

en donde

I. al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,

(b) una etiqueta detectable,

(c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable,

(d) una secuencia de aminoácidos quimérica y

(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d), y/o

II. la secuencia de ITR, o porción de esta, comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de ITR de un segundo AAV o porción de este, en

donde el segundo AAV no es el mismo que el de AAV de animal no primate o el AAV remoto, y

en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate.

- 5 En algunas modalidades, una partícula viral de AAV recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV,

en donde al menos uno de:

- 10 a) la proteína de la cápside de AAV VP1,
b) la proteína de la cápside de AAV VP2, y
c) la proteína de la cápside de AAV VP3,

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la

- 15 cápside de un AAV de animal no primate o un AAV remoto,

en donde

I. al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

- 20 (a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,
(b) una etiqueta detectable,
(c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable,
25 (d) una secuencia de aminoácidos quimérica y
(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d), y/o

II. la secuencia de ITR, o porción de esta, comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de ITR de un segundo AAV o porción de este, en donde el
30 segundo AAV no es el mismo que el de AAV de animal no primate o el AAV remoto,
y

en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate.

En algunas modalidades, una partícula viral de AAV recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV,

en donde al menos uno de:

- a. cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1,
- b. cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, y
- c. cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3,

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate o una porción de este, o un AAV remoto o una porción de este,

en donde

I. al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,

(b) una etiqueta detectable,

(c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable,

(d) una secuencia de aminoácidos quimérica y

(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d), y/o

II. la secuencia de ITR, o porción de esta, comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de ITR de un segundo AAV o porción de este, en donde el segundo AAV no es el mismo que el de AAV de animal no primate o el AAV remoto,

y

en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate

En algunas modalidades de partículas virales de AAV recombinantes, la partícula viral recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate o una porción de esta, y en donde al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,

(b) una etiqueta detectable,

(c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable,

(d) una secuencia de aminoácidos quimérica y

(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d),

en donde la secuencia de ITR completa o una porción de la secuencia de ITR comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la ITR del AAV de animal no primate, opcionalmente en donde la secuencia de ITR comprende una secuencia de ácido nucleico quimérico, y en donde una porción de la secuencia de ácido nucleico quimérico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la ITR del AAV de no primates o porción de esta está operativamente unida a una porción de la secuencia de ácido nucleico quimérico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la ITR de un segundo AAV o porción de este, en donde el segundo AAV no es el mismo que el AAV de animal no primate, y en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate.

En algunas modalidades, una partícula viral de AAV recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada

dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde al menos una de la proteína de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la VP3 de AAV la proteína de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate o una porción de esta,

en donde la secuencia ITR, o porción de esta, comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia ITR de un segundo AAV o porción de esta, en donde el segundo AAV no es el mismo que AAV de animal no primate,

en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate, y

opcionalmente en donde al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,

(b) una etiqueta detectable,

(c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable, y

(e) cualquier combinación de (a)-(c).

En algunas modalidades, una partícula viral de AAV recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde al menos una de la proteína de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3 comprende una secuencia de aminoácidos quimérica que comprende (A) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV de un animal no primate, o una

- porción de esta, operativamente unida a (B) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una segunda proteína de la cápside de AAV, o una porción de esta, en donde el segundo AAV no es el mismo que AAV de animal no primate, en donde en la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate, y opcionalmente en donde al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3 que comprenda una secuencia de aminoácidos quimérica comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en
- (a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,
 - (b) una etiqueta detectable, y
 - (c) una combinación de (a) y (b).
- En algunas modalidades de partículas virales de AAV recombinantes, la partícula viral recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde al menos una de la proteína de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV remoto o porción de este, y en donde al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,
 - (b) una etiqueta detectable,
 - (c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable,
 - (d) una secuencia de aminoácidos quimérica y

(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d),

en donde la secuencia de ITR completa o una porción de la secuencia de ITR comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la ITR del AAV remoto, opcionalmente en donde la secuencia de ITR comprende una secuencia de ácido nucleico quimérica, y en donde una porción de la secuencia de ácido nucleico quimérico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la ITR del AAV remoto o una porción de este está enlazada operativamente a una porción de la secuencia de ácido nucleico quimérico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la ITR de un segundo AAV o porción de este, en donde el segundo AAV no es el mismo que el AAV remoto, y en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un primate huésped.

En algunas modalidades, una partícula viral de AAV recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde al menos una de la proteína de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside VP3 de AAV comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV remoto o una porción de este,

en donde la secuencia de ITR, o porción de esta, comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia ITR de un segundo AAV o porción de esta, en donde el segundo AAV no es el mismo que el AAV remoto,

en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate, y

opcionalmente en donde al menos una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína dirige el tropismo de la partícula viral de AAV,

(b) una etiqueta detectable,

(c) una mutación puntual, preferentemente en donde la mutación puntual reduce el tropismo natural de la partícula viral de AAV y/o crea una etiqueta detectable, y

(d) cualquier combinación de (a)-(c).

5 En algunas modalidades, una partícula viral de AAV recombinante comprende (i) una cápside de AAV que comprende las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3, y (ii) empaquetada dentro de la cápside de AAV, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde al menos una de la proteína de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside
10 de AAV VP2, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP2, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside VP3 de AAV comprende una secuencia de aminoácidos quimérica que comprende (A) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV remoto, o una porción de esta,
15 enlazada operativamente a (B) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una segunda proteína de la cápside de AAV, o una porción de esta, en donde el segundo AAV no es el mismo que el AAV remoto, en donde la partícula viral de AAV recombinante es capaz de infectar a un huésped mamífero, preferentemente un huésped primate, y opcionalmente en donde al menos
20 una de las proteínas de la cápside de AAV VP1, cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP1, la proteína de la cápside de AAV VP2, cualquier porción de AAV VP2 proteína de la cápside, la proteína de la cápside de AAV VP3 y cualquier porción de la proteína de la cápside de AAV VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos quimérica comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en

25 (a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,

(b) una etiqueta detectable, y

(c) una combinación de (a) y (b).

En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende una cápside de AAV, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, una proteína de la
30 cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3 de AVV) de dicha cápside de AAV comprende al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en una proteína de

la cápside de un AAV de animal no primate, una proteína de la cápside de un AAV remoto, y una de sus combinaciones, y en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV se modifica para comprender (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de aminoácidos quiméricos que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de otra proteína de la cápside de AAV enlazada operativamente a dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside de un AAV remoto o una de sus combinaciones, y (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d). En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende una cápside de AAV, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3 de AVV) de dicha cápside de AAV comprende al menos una porción de esta tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo al menos 95 % de identidad, con una proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, una porción de una proteína de la cápside del AAV de animal no primate, una proteína de la cápside de un AAV remoto, una porción de la proteína de la cápside de un AAV remoto, y una de sus combinaciones, y en donde la al menos una proteína de la cápside del VAA de dicha cápside del VAA se modifica para comprender (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de aminoácidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de otra, por ejemplo, una segunda proteína de la cápside de AAV que está enlazada operativamente a dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o la combinación de estas, y (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d). En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende una cápside de AAV, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3 de AVV) de dicha cápside de AAV comprende al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate (por ejemplo, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo. al menos 95 % de identidad de secuencia, con una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate) en donde al menos una proteína de la cápside de

dicha cápside de AAV se modifica para comprender (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de aminoácidos quiméricos que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de una otra, por ejemplo, una segunda, proteína de la cápside de AAV enlazada operativamente a dicha
5 secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV de animal no primate, y (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende una cápside de AAV, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3
10 de AVV) de dicha cápside de AAV comprende al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV remoto (por ejemplo, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con la proteína de la cápside de un AAV remoto), en donde al menos una proteína de la cápside de
15 AAV de dicha cápside de AAV se modifica para comprender (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de aminoácidos quiméricos que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de una otra, por ejemplo, una segunda, proteína de la cápside de AAV enlazada operativamente a dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV remoto y
20 (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende (A) al menos una proteína de la cápside de AAV, por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3 de AVV, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos
25 un 95 % de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, (ii) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de primate remoto, y (iii) una secuencia de aminoácidos de una de sus combinaciones, y (B) un genoma de AAV que comprende un nucleótido de interés y una ITR de AAV que comprende al menos una
30 porción de una secuencia de ITR de otro, por ejemplo, un segundo AAV, en donde el otro AAV no es idéntico al AAV de animal no primate y tampoco es idéntico al AAV de primate remoto.

- En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende (A) al menos una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3 de AVV) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, y (B) un genoma de AAV que comprende un nucleótido de interés y una ITR de AAV que comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otro AAV, por ejemplo, un segundo AAV, en donde el otro AAV no es idéntico al AAV de animal no primate.
- En algunas modalidades de la invención, una partícula viral de AAV comprende (A) al menos una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 de AVV, una proteína de la cápside VP2 de AVV y/o una proteína de la cápside VP3 de AVV) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV remoto, y (B) un genoma de AAV que comprende un nucleótido de interés y una ITR de AAV que comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otro AAV, por ejemplo, un segundo AAV, en donde el otro AAV no es idéntico al AAV de primate remoto.
- En algunas modalidades de la invención de partículas virales de AAV, la proteína de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, se modifica para comprender (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual.
- En algunas modalidades de la invención de partículas virales de AAV, la proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside, el AAV de un animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV de un animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV remoto. En algunas modalidades, la proteína de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que

tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV de un animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV remoto. En algunas modalidades, la proteína de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV de un animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV remoto.

En algunas modalidades de partículas virales de AAV de la invención, la cápside de dicha partícula comprende (i) una proteína de la cápside VP1 que es (a) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de un otro AAV, por ejemplo, segundo, AAV enlazada operativamente a una región común VP1/VP2 y una región VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto, o (b) una proteína de la cápside VP1 del AAV de no primate o el AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 que es (a) una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 de un otro, por ejemplo, segundo AAV enlazada operativamente a una región VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto, o (b) una proteína de la cápside VP2 del AAV de no primate o el AAV remoto, y (iii) la proteína de la cápside VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto. En algunas modalidades, la cápside de dicha partícula comprende (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de un otro, por ejemplo, segundo, AAV enlazada operativamente a una región común VP1/VP2 y una región de VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 de otro, por ejemplo, segundo, AAV enlazada operativamente a una región de VP3 del AAV de no primate o el

AAV remoto, y (iii) la proteína de la cápside VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto. En algunas modalidades, la cápside de dicha partícula comprende (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente a una región común VP1/VP2 y una región de VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 del AAV de no primate o el AAV remoto, y (iii) la proteína de la cápside VP3 del AAV de primate o el AAV remoto. En algunas modalidades, la cápside comprende (i) una proteína de la cápside VP1 del AAV de no primate o del AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 del AAV de no primate o del AAV remoto, y (iii) una proteína de la cápside VP3 del AAV de no primate o del AAV remoto, y opcionalmente en donde la partícula comprende un genoma de AAV que comprende una ITR de AAV que comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otro, por ejemplo, un segundo, AAV, dentro de la cápside. En algunas modalidades, el otro AAV no es idéntico al AAV de animal no primate.

En algunas modalidades de partículas virales de AAV recombinantes, (i) la proteína de la cápside VP1 comprende (a) una secuencia de aminoácidos quimérica, en donde opcionalmente la región única de VP1 (VP1-u) de la proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la VP1-u de un segundo AAV y en donde la región común VP1/VP2 y la región VP3 de la cápside VP1 de AAV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 y la región de VP3 de un AAV de animal no primate, o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la proteína de la cápside VP1 del AAV de animal no primate, (ii) la proteína de la cápside VP2 comprende (a) una secuencia de aminoácidos quimérica, en donde opcionalmente la región común VP1/VP2 de la proteína de la cápside VP2 de AAV quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de un segundo AAV y en donde la región VP3 de la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende al menos un 95 % de identidad con la región VP3 del AAV de animal no primate, o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate, y (iii) la proteína

de la cápside VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, (i) la proteína de la cápside VP1 comprende una secuencia de aminoácidos quimérica, en donde opcionalmente la región única de VP1 (VP1-u) de la proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, en al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la VP1-u de un segundo AAV y en donde la región común VP1/VP2 y la región VP3 de la cápside VP1 de AAV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, en al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 y la región VP3 de un AAV de animal no primate, (ii) la proteína de la cápside VP2 comprende una secuencia de aminoácidos quimérica, en donde opcionalmente la región común VP1/VP2 de la proteína de la cápside VP2 del AAV quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de un segundo AAV y en donde la región VP3 de la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende al menos un 95 % de identidad con la región VP3 del AAV de un animal no primate, y (iii) la proteína de la cápside VP3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, (i) la proteína de la cápside VP1 de AAV comprende una secuencia de aminoácidos quimérica, en donde opcionalmente la región única de VP1 (VP1-u) de la proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de VP1-u de un segundo AAV y en donde la región común VP1/VP2 y la región VP3 de la cápside VP1 de AAV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 y la región VP3 del AAV de un animal no primate, (ii) la proteína de la cápside VP2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate, y (iii) la proteína de la cápside VP3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de

secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV del animal no primate. En algunas modalidades, (i) la proteína de la cápside VP1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP1 del AAV de un animal no primate, (ii) la proteína de la cápside VP2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate, y (iii) la proteína de la cápside VP3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate, y opcionalmente en donde la partícula comprende un genoma de AAV que comprende una ITR de AAV que comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otra, por ejemplo, un segundo, AAV, dentro de la cápside. En algunas modalidades, el otro AAV no es idéntico al AAV de animal no primate.

15 En algunas modalidades de partículas virales de AAV de la invención, el otro AAV es un AAV de primate o una combinación de AAV de primate. En algunas modalidades, el otro AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 y una de sus combinaciones. En algunas modalidades, el otro AAV es AAV2.

20 En algunas modalidades de partículas virales de AAV de la invención, el AAV de animal no primate es un AAV de no primate enumerado en la Tabla 2. En algunas modalidades, el AAV de no primate es un AAV de ave (AAAV), un AAV de lobo marino o un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAAV y, opcionalmente, una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAAV comprende una modificación en la posición I444 o I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAAV. En algunas modalidades, el

25 AAV de animal no primate es un AAV de animal escamoso, por ejemplo, un AAV de dragón barbudo y, opcionalmente, una secuencia de aminoácidos de un AAV de dragón barbudo comprende una modificación en la posición I573 o I436 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de

30 mamífero, por ejemplo, un AAV de lobo marino y, opcionalmente, una secuencia de aminoácidos de un AAV de lobo marino comprende una modificación en una posición seleccionada del grupo

que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 y A565 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de lobo marino.

En algunas modalidades de partículas virales de AAV de la invención, el par de unión proteína: proteína se selecciona de SpyTag: SpyCatcher, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin C, SnoopTag: SnoopCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende c-myc que comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO:44. En algunas modalidades, la etiqueta detectable comprende el epítipo B1 que comprende una secuencia de aminoácidos de IGTRYLTR (SEQ ID NO: 45).

En algunas modalidades, una partícula de AAV de la invención comprende una proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate, el AAV remoto, o la combinación de estos, en donde la proteína de la cápside VP3 se modifica para comprender (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en SpyTag:SpyCatcher, SpyTag:KTag, Isopeptag:pilin C, SnoopTag:SnoopCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002, (b) una etiqueta detectable, opcionalmente, en donde la etiqueta detectable comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO:45, (c) una mutación puntual o (d) cualquier combinación de (a), (b) y (c). En algunas modalidades, la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate, el AAV remoto, o la combinación de estos se modifica para comprender (a) al menos SpyTag que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 43 y/o (b) una etiqueta detectable que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45.

En algunas modalidades, una partícula de AAV de la invención comprende un primer y/o segundo enlazador que enlaza operativamente un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable a una proteína de la cápside de dicha partícula de AAV. En algunas modalidades, el primer y el segundo enlazador no son idénticos. En algunas modalidades, el primer y el segundo enlazador son idénticos. En algunas modalidades, el primer y/o segundo enlazador tiene 10 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades de partículas virales de la invención, al menos una las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, opcionalmente, al menos la cápside VP3, se modifica para comprender (a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual o (d) cualquier combinación de (a), (b) y/o (c). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o la etiqueta detectable o la mutación

puntual se coloca dentro de una región variable de la proteína de la cápside. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína o la etiqueta detectable está flanqueado por un primer enlazador y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, el primer y/o segundo enlazador tiene 1-10 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el primer y el segundo enlazador no son idénticos. En algunas modalidades, el primer y el segundo enlazador son idénticos.

En algunas modalidades de partículas virales, una proteína de la cápside VP3 de AAV comprende una modificación, opcionalmente un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde opcionalmente la modificación está en una o más posiciones I444 (por ejemplo, G444) y/o I580 (por ejemplo, K580). En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de AAV comprende una modificación, opcionalmente, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde la modificación está en una o más posiciones de I444 (por ejemplo, G444) y/o I580 (por ejemplo, K580). En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de AAV de dragón barbudo comprende una modificación, opcionalmente, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde la modificación está en una o más posiciones de I573 (por ejemplo, T573) y/o I436 (por ejemplo, G436). En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de lobo marino comprende una modificación, opcionalmente, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde la modificación está en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429 (por ejemplo, N429), I430 (por ejemplo, P430), I431 (por ejemplo, T431), I432 (por ejemplo, G432), I433 (por ejemplo, S433), I434 (por ejemplo, T434), I436 (por ejemplo, R436), I437 (por ejemplo, D437) e I565 (A565).

En algunas modalidades de partículas virales de la invención, al menos una proteína de la cápside, opcionalmente, al menos la proteína de la cápside VP3, se modifica para comprender un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende un segundo miembro cognado del par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, el primer y el segundo miembro del par de unión proteína: proteína se unen mediante un enlace covalente, por ejemplo, un enlace isopeptídico. En algunas modalidades, el primer miembro del par de unión proteína: proteína es SpyTag y, opcionalmente, el segundo miembro del par de unión proteína: proteína es SpyCatcher o KTag. En algunas modalidades, el primer

miembro del par de unión proteína: proteína es KTag y, opcionalmente, el segundo miembro del par de unión proteína: proteína es SpyTag. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína es SnoopTag y el segundo miembro del par de unión proteína: proteína es SnoopCatcher. En algunas modalidades, el primer miembro del par de unión proteína: proteína es isopeptag y el segundo miembro del par de unión proteína: proteína es Pilin-C. En algunas modalidades, el primer miembro del par de unión proteína: proteína es SpyTag002 y el segundo miembro del par de unión proteína: proteína es SpyCatcher002. En algunas modalidades, el segundo miembro del par de unión proteína: proteína se une a un ligando de direccionamiento, por ejemplo, un resto de unión, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de este. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento puede fusionarse con un segundo miembro de un par de unión proteína: proteína, por ejemplo, SpyCatcher, opcionalmente, a través de un enlazador en el extremo C del segundo miembro, y el enlazador se fusiona con SpyCatcher en el extremo C del enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia GSGESG (SEQ ID NO: 49). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende la etiqueta detectable c-myc.

En algunas modalidades de partículas virales de la invención, al menos una proteína de la cápside, opcionalmente, al menos la proteína de la cápside VP3, se modifica para comprender una etiqueta detectable. En algunas modalidades, la etiqueta detectable comprende el epítipo B1 de AAV, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos IGTRYLTR (SEQ ID NO: 45).

En algunas modalidades de partículas virales de la invención, al menos una proteína de la cápside, opcionalmente, al menos la proteína de la cápside VP3, se modifica para comprender

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína que comprende al menos un miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en SpyTag: SpyCatcher, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin-C, SnoopTag: SnoopCatcher, SpyTag002:SpyCatcher002 y c-myc: anticuerpo anti-c-myc.

(b) la etiqueta detectable, opcionalmente, en donde la etiqueta detectable comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45,

(c) una mutación puntual o

(d) cualquier combinación de (a), (b) y (c).

En algunas modalidades de partículas virales de la invención, al menos una proteína de la cápside, opcionalmente, al menos la proteína de la cápside VP3, se modifica para comprender

(a) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína que comprende al menos SpyTag que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO:43 y/o

5 (b) una etiqueta detectable que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45.

En algunas modalidades, una partícula de AAV de la invención comprende una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 2, (b) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 4, (c) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 6, (d) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8, (e) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10, (f) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12, (g) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14, (h) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16, (i) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18, (j) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20, (k) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22, (l) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24, (m) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26, (n) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28, (o) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30, (p) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32, (q) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34, (r) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36, (s) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 53, (t) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 55, (u) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 57, (v) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 59, (w) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 61, (x) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 63, (y) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 65, (z) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 67, (aa) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 69, (bb) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 71, (cc) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26,

SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:71, y (dd) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las porciones de VP2 y/o VP3 de las secuencias de aminoácidos establecidas en cualquiera de (a)-(cc).

En algunas modalidades de partículas virales de la invención, en donde al menos una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de AAV comprende una modificación, por ejemplo, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, la partícula viral comprende además una proteína de la cápside de referencia, opcionalmente una proteína de la cápside correspondiente a la al menos una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de AAV excepto por la modificación, de manera que la cápside es una cápside de mosaico. En algunas modalidades, una cápside de mosaico comprende una proteína de la cápside VP1 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y una proteína de la cápside VP1 de referencia. En algunas modalidades, una cápside de mosaico comprende una proteína de la cápside VP2 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y una proteína de la cápside VP2 de referencia. En algunas modalidades, una cápside de mosaico comprende una proteína de la cápside VP3 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y una proteína de la cápside VP3 de referencia.

También se describen partículas virales de la invención que comprenden proteínas de la cápside de AAV de la invención. En algunas modalidades de la invención, una proteína de la cápside de AAV de la invención comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de un animal no primate o un AAV remoto, en donde la proteína de la cápside de AAV se selecciona del grupo que consiste en (a) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP1 de AAV de animal quimérico se modificó para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual, (b) una proteína de la cápside VP1 de AAV no quimérica modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable, (c) una proteína de la cápside VP2 quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP2 de AAV quimérico se modifica para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual, (d) una proteína de la cápside de VP2 de un AVV no

quimérico modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual, (e) una proteína de la cápside VP3 de AAV quimérico modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual, y (f) una proteína de la cápside VP3 de AAV no quimérico modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual.

En algunas modalidades de proteínas de la cápside de AAV de la invención, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o la etiqueta detectable está flanqueado en uno o ambos lados, respectivamente, por un primer y/o un segundo enlazador que enlaza el primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o la etiqueta detectable a la proteína de la cápside, en donde cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene, independientemente, al menos un aminoácido de longitud. En algunas modalidades, el primer y el segundo enlazador no son idénticos. En algunas modalidades, el primer y el segundo enlazador son idénticos y tienen 10 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de AAV de la invención comprende una etiqueta detectable, opcionalmente, en donde la etiqueta detectable comprende un epítipo B1 que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45. En algunas modalidades, una etiqueta detectable comprende c-myc.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de AAV de la invención comprende un primer miembro y un segundo miembro cognado del par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde el primer y el segundo miembro se unen mediante un enlace covalente, opcionalmente, un enlace isopeptídico. En algunas modalidades, el primer miembro del par de unión proteína: proteína es SpyTag y, opcionalmente, el segundo miembro cognado es SpyCatcher o KTag. En algunas modalidades, el primer miembro es KTag y el segundo miembro cognado es SpyTag. En algunas modalidades, el primer miembro es SnoopTag y el segundo miembro cognado es SnoopCatcher. En algunas modalidades, el primer miembro es isopeptag y el segundo miembro cognado es Pilin-C. En algunas modalidades, el primer miembro es SpyTag002 y el segundo miembro cognado es SpyCatcher002. En algunas modalidades, el primer miembro comprende una etiqueta detectable, tal como, de modo no taxativo, c-myc en donde su par de unión es un anticuerpo anti-c-myc o una porción de este. En algunas modalidades, el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, opcionalmente, en donde el ligando de direccionamiento es un resto de unión que, opcionalmente, se dirige a un marcador de células. En algunas modalidades, el resto de unión es un anticuerpo o una porción de este. En algunas

modalidades, el resto de unión se enlaza operativamente a un segundo miembro del par de unión proteína: proteína, opcionalmente, a través de un enlace covalente (tal como, pero que no se limita a, un enlace disulfuro y/o un enlace isopeptídico) o un enlazador. En algunas modalidades, el resto de unión se fusiona con un segundo miembro del par de unión proteína: proteína a través de un enlazador fusionado en el extremo C del resto de unión, en donde el enlazador se fusiona con el segundo miembro mediante el extremo C del enlazador, opcionalmente, en donde el enlazador comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO:49 (GSGESG). En algunas modalidades, el primer miembro del par de unión proteína: proteína se encuentra en una posición de aminoácido que se encuentra en VR I, VR II, VR III, VR IV, VR V, VR VI, VR VII, VR VIII VR IX o el bucle HI de la proteína de la cápside, opcionalmente, la VR VIII o VR IV de la proteína de la cápside

En algunas modalidades de proteínas de la cápside de AAV de la invención, el AAV de animal no primate es un AAV de no primate enumerado en la Tabla 2. En algunas modalidades, el AAV de no primate es un AAV de ave (AAAV), un AAV de lobo marino o un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAAV y, opcionalmente, una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAAV comprende una modificación en la posición I444 o I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAAV. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de animal escamoso, por ejemplo, un AAV de dragón barbudo y, opcionalmente, una secuencia de aminoácidos de un AAV de dragón barbudo comprende una modificación en la posición I573 o I436 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de mamífero, por ejemplo, un AAV de lobo marino y, opcionalmente, una secuencia de aminoácidos de un AAV de lobo marino comprende una modificación en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 y A565 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de lobo marino.

Las proteínas de la cápside VP3 de animal no primate de la invención incluyen las cápsides de VP3 de no primates (a) que encapsulan un genoma de un otro, por ejemplo, segundo, AAV y/o (b) poseen mutaciones. En algunas modalidades, la proteína de la cápside VP3 de AAV de animal no humano de la invención encapsula el genoma de un segundo AAV que no es del animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate de la invención puede enlazarse operativamente a un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador) y/o comprender una

mutación puntual, por ejemplo, de modo que el tropismo natural de la proteína de la cápside se reduzca hasta eliminarse y/o de modo que la proteína de la cápside comprenda una etiqueta detectable. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende la etiqueta detectable que comprende c-myc (SEQ ID NO: 44). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende el primer miembro y, opcionalmente, el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína que forma un enlace covalente. En algunas modalidades, el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en (a) SpyTag: SpyCatcher, (b) SpyTag: KTag, (c) Isopeptag: pilin C, (d) SnoopTag: SnoopCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate puede comprender (a) un epítipo B1 (SEQ ID NO: 45), (b) SpyTag, (c) SpyCatcher o cualquier combinación de (a)-(c).

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate de la invención comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente a ella, opcionalmente, a través de un primer o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP3 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en una región variable (VR) o una porción de esta de la proteína de la cápside VP3, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP3 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP3 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR I, VR II, VR III, VR IV, VR V, VR VI, VR VII, VR VIII VR IX o el bucle HI de la proteína de la cápside VP3, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP3 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP3 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR VIII o VR IV de la proteína de la cápside VP3, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP3 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate es una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate seleccionado de los AAV de animal no primate que se proporcionan en la Tabla 2. En algunas modalidades, una proteína de la cápside

VP3 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP3 de un AAV de aves (AAAV). En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de AAAV comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición 5 I444 o I580. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP3 de un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de dragón barbudo comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I573 o I436. En algunas 10 modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP3 de un AAV de lobo marino. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de lobo marino comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, 15 I433, I434, I436, I437 e I565 y, opcionalmente, en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I436 e I437; opcionalmente en I432.

Las proteínas de la cápside VP2 de animal no primate de la invención incluyen las cápsides de VP2 de no primates (a) que encapsulan un genoma de un otro, por ejemplo, segundo, AAV y/o (b) poseen mutaciones. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de AAV de animal no primate de la invención encapsula el genoma de otro AAV. En algunas modalidades, una proteína 20 de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate de la invención puede enlazarse operativamente a un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o comprender una mutación puntual, por ejemplo, de modo que el tropismo natural de la proteína de la cápside se reduzca hasta eliminarse y/o de modo que la proteína de la cápside comprenda una etiqueta detectable. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína 25 comprende una etiqueta detectable. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable que comprende c-myc (SEQ ID NO: 44). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende el primer miembro y, opcionalmente, el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína que 30 forma un enlace covalente. En algunas modalidades, el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en (a) SpyTag: SpyCatcher, (b) SpyTag: KTag, (c) Isopeptag: pilin C, (d) SnoopTag: SnoopCatcher y (e) SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades,

una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate puede comprender (a) un epítipo B1 (SEQ ID NO: 45), (b) SpyTag, (c) SpyCatcher o cualquier combinación de (a)-(c).

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate de la invención comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente a ella, opcionalmente, a través de un primer y un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP2 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en una región variable (VR) o una porción de esta de la proteína de la cápside VP2, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP2 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP2 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR I, VR II, VR III, VR IV, VR V, VR VI, VR VII, VR VIII VR IX o el bucle HI de la proteína de la cápside VP2, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP2 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP2 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR VIII o VR IV de la proteína de la cápside VP2, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP2 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate es una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate seleccionado de los AAV de animal no primate que se proporcionan en la Tabla 2. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP2 de un AAV de aves (AAAV). En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de AAAV comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I444 o I580. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP2 de un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de dragón barbudo comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I573 o I436. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate es la proteína de la

cápside VP2 de un AAV de lobo marino. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de un AAV de lobo marino comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente a través de un primer y/o segundo enlazador, en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 e I565; opcionalmente en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I436 e I437; opcionalmente en I431.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 de la invención puede ser una proteína de la cápside VP2 quimérica, que comprende un enlace operativo en una porción de una proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate y una porción de una proteína de la cápside VP2 de un otro, por ejemplo, segundo, AAV. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP2 de un otro, por ejemplo, segundo AAV enlazada operativamente a (b) una porción de la cápside VP2 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica puede comprender, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 del otro AAV enlazado operativamente a (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, el otro AAV es un AAV de animal no primate. En algunas otras modalidades, el otro AAV es un AAV de primate.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de la invención comprende (a) una porción de la proteína de la cápside VP2 de un AAV de primate enlazado operativamente a (b) una porción de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica puede comprender, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de un AAV de primate enlazado operativamente a (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV1. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV2. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV3. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV4. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV5. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV6. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV7. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV8. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV9. En algunas

modalidades, el AAV de animal no primate se selecciona del grupo de AAV de animal no primate que se proporciona en la Tabla 2. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de ave, un AAV de dragón barbudo o un AAV de lobo marino.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de la invención comprende (a) una porción de la proteína de la cápside VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una porción de la cápside VP2 de un AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica puede comprender, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAAV de la invención comprende (a) una porción de la proteína de la cápside VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una porción de la cápside VP2 de un AAV de ave (AAAV) que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAAV. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAAV puede comprender, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAAV.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino de la invención comprende (a) una porción de la proteína de la cápside VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una porción de la cápside VP2 de un AAV de lobo marino que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de lobo marino. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino puede comprender, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV de lobo marino.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo de la invención comprende (a) una porción de la proteína de la cápside VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una porción de la cápside VP2 de un AAV de dragón barbudo que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de

AAV2/AAV de dragón barbudo puede comprender, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de AAV2 enlazado operativamente a (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 de un AAV de dragón barbudo.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de la invención puede enlazarse operativamente a un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o comprender una mutación puntual, por ejemplo, de modo que el tropismo natural de la proteína de la cápside se reduzca hasta eliminarse y/o de modo que la proteína de la cápside comprenda una etiqueta detectable. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende la etiqueta detectable que comprende c-myc (SEQ ID NO: 44). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende el primer miembro y, opcionalmente, el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína que forma un enlace covalente. En algunas modalidades, el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en (a) SpyTag: SpyCatcher, (b) SpyTag: KTag, (c) Isopeptag: pilin C, (d) SnoopTag: SnoopCatcher y (e) SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica puede comprender (a) un epítipo B1 (SEQ ID NO: 45), (b) SpyTag, (c) SpyCatcher o cualquier combinación de (a)-(c).

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de animal primate/no primate de la invención (por ejemplo, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAAV, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo, etc.) comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente a esta, opcionalmente, a través de un primer o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una proteína de la cápside VP2 quimérica de animal primate/no primate (por ejemplo, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAAV, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo, etc.) en una posición de aminoácido que se encuentra en una región variable (VR) o una porción de esta de la proteína de la cápside VP2 quimérica de primate/no primate, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la proteína de la cápside VP2 quimérica de primate/no primate a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una proteína de la cápside VP2

quimérica de primate/no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR I, VR II, VR III, VR IV, VR V, VR VI, VR VII, VR VIII VR IX o el bucle HI de la proteína de la cápside VP2 quimérica de primate/no primate, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP2 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una proteína de la cápside VP2 quimérica de primate/no primate (por ejemplo, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAAV, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo, etc.) en una posición de aminoácido que se encuentra en VR VIII o VR IV de la proteína de la cápside VP2 quimérica de primate/no primate, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la proteína de la cápside VP2 quimérica de primate/no primate a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAAV comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I444 o I580. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I573 o I436. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 e I565; opcionalmente en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I436 e I437; opcionalmente en I431.

Las proteínas de la cápside VP1 de animal no primate de la invención incluyen las cápsides de VP1 de no primates (a) que encapsulan un genoma de un otro, por ejemplo, segundo, AAV y/o (b) poseen mutaciones. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de AAV de animal no primate de la invención encapsula un genoma de un otro, por ejemplo, segundo, AAV. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de un animal no primate de la invención puede enlazarse operativamente a un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o comprender una mutación puntual, por ejemplo, de modo que el tropismo natural de la proteína de la cápside se reduzca hasta eliminarse y/o de modo que la proteína de la cápside comprenda una

etiqueta detectable. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende la etiqueta detectable que comprende c-myc (SEQ ID NO: 44). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende el primer miembro y, opcionalmente, el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína que forma un enlace covalente. En algunas modalidades, el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en (a) SpyTag: SpyCatcher, (b) SpyTag: KTag, (c) Isopeptag: pilin C, (d) SnooTag: SnooCatcher y (e) SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate puede comprender (a) un epítipo B1 (SEQ ID NO: 45), (b) SpyTag, (c) SpyCatcher o cualquier combinación de (a)-(c).

En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP1 de un AAV de animal no primate de la invención en una posición de aminoácido que se encuentra en una región variable (VR) o una porción de esta de la proteína de la cápside VP1, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP1 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP1 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR I, VR II, VR III, VR IV, VR V, VR VI, VR VII, VR VIII VR IX o el bucle HI de la proteína de la cápside VP1, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP1 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP1 de un AAV de animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR VIII o VR IV de la proteína de la cápside VP1, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside VP1 a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de un AAV de animal no primate es una proteína de la cápside VP1 de un AAV de no primate seleccionado del grupo de los AAV de no primate que se proporcionan en la Tabla 2. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP1 de un AAV de aves (AAAV). En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de AAAV comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I444 o I580. En algunas modalidades, una

proteína de la cápside VP1 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP31 de un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I573 o I436. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de un AAV de animal no primate es la proteína de la cápside VP1 de un AAV de lobo marino. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 de un AAV de lobo marino comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, SpyTag) enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437, e I565; opcionalmente en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I436 e I437; opcionalmente en I431.

En algunas otras modalidades, una proteína de la cápside VP1 de la invención puede ser una proteína de la cápside VP1 quimérica, que comprende en enlace operativo una porción de una proteína de la cápside VP1 del AAV de animal no primate y una porción de la proteína de la cápside VP1 de otro AAV, en donde el otro AAV no es el AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 del otro AAV que comprende al menos un dominio PLA₂ del otro AAV y (b) una porción de la cápside VP1 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 del otro AAV que comprende al menos un dominio VP1-u del otro AAV y (b) una porción de la cápside VP1 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de un dominio VP1-u y una región común VP1/VP2 de un otro, por ejemplo, segundo AAV y (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, el otro AAV es un AAV de animal no primate. En algunas otras modalidades, el otro AAV es un AAV de primate.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de un AAV de primate que

comprende al menos un dominio PLA₂ del AAV de primate y (b) una porción de la cápside VP1 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de un AAV de primate que comprende al menos un dominio VP1-u del AAV de primate y (b) una porción de la cápside VP1 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de un dominio VP1-u y una región común VP1/VP2 de un AAV de primate y (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV1. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV2. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV3. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV4. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV5. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV6. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV7. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV8. En algunas modalidades, el AAV de primate es AAV9. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate se selecciona del grupo de AAV de animal no primate que se proporciona en la Tabla 2. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de ave, un AAV de dragón barbudo o un AAV de lobo marino.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio PLA₂ de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio VP1-u de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 del AAV de animal no primate que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de un dominio VP1-u y una región común VP1/VP2 de AAV2 y (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del animal no primate.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio PLA₂ de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 de un AAV de ave (AAAV) que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAAV.

5 En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio VP1-u de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 de un AAAV que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 del AAAV.

10 En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de un dominio VP1-u y una región común VP1/VP2 de AAV2 y (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de un AAAV.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 2.

15 En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/lobo marino comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio PLA₂ de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 de un AAV de lobo marino que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de lobo marino.

20 En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/lobo marino comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio VP1-u de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 de lobo marino que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de lobo marino.

25 En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/lobo marino comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de un dominio VP1-u y una región común VP1/VP2 de AAV2 y (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de un lobo marino.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 4.

30 En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/dragón barbudo comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio PLA₂ de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la

proteína de la cápside VP3 de dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/dragón barbudo comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una porción de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 que comprende al menos un dominio VP1-u de AAV2 y (b) una porción de la cápside VP1 de dragón barbudo que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/dragón barbudo comprende, desde el extremo N al extremo C, (a) una secuencia de aminoácidos de un dominio VP1-u y una región común VP1/VP2 de AAV2 y (b) una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP3 de un dragón barbudo. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/dragón barbudo comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica puede enlazarse operativamente a un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o comprender una mutación puntual, por ejemplo, de modo que el tropismo natural de la proteína de la cápside se reduzca hasta eliminarse y/o de modo que la proteína de la cápside comprenda una etiqueta detectable. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende la etiqueta detectable que comprende c-myc (SEQ ID NO: 44). En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende el primer miembro y, opcionalmente, el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína que forma un enlace covalente. En algunas modalidades, el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en (a) SpyTag: SpyCatcher, (b) SpyTag: KTag, (c) Isopeptag: pilin C, (d) SnoopTag: SnoopCatcher y (e) SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica puede comprender (a) un epítipo B1 (SEQ ID NO: 45), (b) SpyTag, (c) SpyCatcher y cualquier combinación de (a)-(c).

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de animal primate/no primate (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo, etc.) comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente a esta, opcionalmente, a través de un primer o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una proteína de la cápside VP1 quimérica de animal

primate/no primate (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo, etc.) en una posición de aminoácido que se encuentra en una región variable (VR) o una porción de esta de la proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/no primate, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/no primate a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una cápside VP1 de una proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/animal no primate en una posición de aminoácido que se encuentra en VR I, VR II, VR III, VR IV, VR V, VR VI, VR VII, VR VIII VR IX o el bucle HI de la proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/animal no primate, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la cápside de la proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/animal no primate a través de un primer y/o un segundo enlazador. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza operativamente a una proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/no primate (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo, etc.) en una posición de aminoácido que se encuentra en VR VIII o VR IV de la proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/no primate, opcionalmente, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína se enlaza a la proteína de la cápside VP1 quimérica de primate/no primate a través de un primer y/o un segundo enlazador.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I444 o I580. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I444. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAAV comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I580. En algunas modalidades, una proteína de la

cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 e I565; opcionalmente en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I436 e I437; opcionalmente en I432. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de

AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I432. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I565. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I429. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I430. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I431. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I433. En algunas modalidades,

una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I434. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I435. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I436. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I437. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I432. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 53. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 55. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 57. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 59. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de

lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 63. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 67. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 69. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de lobo marino comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 71.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado operativamente, opcionalmente, a través de un primer y/o un segundo enlazador, en la posición I436 o I573. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I436. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo comprende SpyTag enlazado operativamente, opcionalmente, a través de una primera y una segunda secuencia enlazadora, en la posición I573. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV2/AAV de dragón barbudo comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de la invención comprende además un primer miembro y un segundo miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, opcionalmente, en donde el ligando de direccionamiento es un resto de unión. En algunas modalidades, el resto de unión es un anticuerpo o una porción de este. En algunas modalidades, el anticuerpo, o porción de este, se fusiona con el segundo miembro, por ejemplo, SpyCatcher. En algunas modalidades, el anticuerpo o porción de este se fusiona en su extremo C con un enlazador, opcionalmente, un enlazador que comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO: 49 (GSGESG), y el

enlazador se fusiona con el segundo miembro, por ejemplo, SpyCatcher, en el extremo C del enlazador.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de la invención puede comprender una etiqueta detectable, dicha etiqueta detectable puede actuar, opcionalmente, como un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o para la detección y/o el aislamiento de la proteína de la cápside. En algunas modalidades, la etiqueta detectable es c-myc. En algunas modalidades, la etiqueta detectable comprende el epítipo B1 de AAV, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos IGTRYLTR (SEQ ID NO: 45).

Una proteína de la cápside de AAV de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 2, (b) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 4, (c) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 6, (d) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8, (e) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10, (f) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12, (g) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14, (h) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16, (i) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18, (j) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20, (k) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22, (l) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24, (m) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26, (n) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28, (o) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30, (p) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32, (q) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34, (r) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36, (s) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 53, (t) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 55, (u) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 57, (v) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 59, (w) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 61, (x) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 63, (y) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 65, (z) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 67, (aa) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 69, (bb) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 71, (cc) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, a SEQ ID

NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 71 y (dd) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las porciones de VP2 y/o VP3 de las secuencia de aminoácidos establecidas en cualquiera de (a)-(cc).

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de la invención es codificada por una molécula de ácido nucleico de la invención. En la presente descripción también se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de la cápside de la invención.

En la presente descripción se describen las moléculas de ácido nucleico que comprenden un gen cap de AAV que codifica una proteína de la cápside de AAV VP1, una proteína de la cápside de AAV VP2 y/o una proteína de la cápside de AAV VP3, en donde el gen de cap de AAV, o una porción de este, comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una secuencia de identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de ácido nucleico de un gen cap de un AAV de animal no primate o una porción de este, o un AAV remoto o una porción de este, y en donde el gen cap del AAV se modifica adicionalmente para comprender (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de nucleótidos quimérica o (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d). En algunas modalidades de moléculas de ácido nucleico, el ácido nucleico comprende un gen rep de AAV y un gen cap de AAV, en donde todo el gen cap de AAV comprende una primera secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia de ácido nucleico de un gen cap de un AAV de animal no primate o un AAV remoto, y en donde el gen rep de AAV, o una porción de este, comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la secuencia d ácido nucleico de un gen rep de un segundo AAV, o porción de este, en donde el AAV de animal no primate no es idéntico al segundo AAV. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende al menos una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a al

menos una porción de la secuencia de nucleótido de un gen *cap* seleccionado del grupo que consiste en (i) un gen *cap* de un AAV de animal no primate, (ii) un gen *cap* de un AAV remoto, o (iii) una de sus combinaciones, en donde dicho gen *cap* de AAV se modifica, además, para comprender (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de nucleótidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de nucleótidos de otro gen *cap* de AAV que se enlaza operativamente a dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* de AAV que se selecciona del grupo que consiste en el gen *cap* de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal no primate, en donde dicho gen *cap* de AAV se modifica, además, para comprender (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de nucleótidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de nucleótidos de otro gen *cap* de AAV que se enlaza operativamente a dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* de un AAV de animal no primate, (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal remoto, en donde dicho gen *cap* de AAV se modifica, además, para comprender (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable, (c) una mutación puntual, (d) una secuencia de nucleótidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de nucleótidos de otro gen *cap* de AAV que se enlaza operativamente a dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* de un AAV de animal remoto, (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende una primera secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia a una secuencia de nucleótido de un gen *cap* seleccionado del grupo que consiste en (i) un gen *cap* de un AAV de animal no primate, (ii) un gen *cap* de un AAV de primate remoto, y (iv) una de sus combinaciones, en donde el gen *rep* de AAV comprende una segunda secuencia de nucleótidos de un gen *rep* de AAV de otro AAV.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a una secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal no primate, en donde el gen *rep* de AAV comprende una segunda secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos de un gen *rep* de AAV de un otro, por ejemplo, un segundo AAV.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a una primera secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV animal remoto, en donde el gen *rep* de AAV comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una segunda secuencia de nucleótidos de un gen *rep* de AAV de un otro, por ejemplo, un segundo AAV.

En algunas modalidades de moléculas de ácido nucleico de la invención, una secuencia de nucleótidos del gen *cap* que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos del AAV de animal no primate, el gen *cap* una secuencia de nucleótidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos del AAV remoto, o una de sus combinaciones, se modifica para comprender (a) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable y/o (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una mutación puntual.

En algunas modalidades de ácido nucleico, el par de unión proteína: proteína se selecciona de SpyTag: SpyCatcher, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin-C, SnoopTag: SnoopCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable, por ejemplo, c-myc, que comprende una
5 secuencia establecida como la SEQ ID NO: 44.

En algunas modalidades de ácidos nucleicos, una secuencia de nucleótidos de un gen *cap* del AAV de animal no primate, el gen *cap* del AAV remoto, o una de sus combinaciones, se modifica para comprender el epítipo B1 que comprende una secuencia de aminoácidos de IGTRYLTR (SEQ ID NO: 45).

- 10 En algunas modalidades de moléculas de ácido nucleico de la invención, una secuencia de nucleótidos de un gen *cap* del AAV de animal no primate, el gen *cap* del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP3, o una porción de esta, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con
15 una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV remoto. En algunas modalidades, una secuencia de nucleótidos de un gen del *cap* de AAV de animal no primate, el gen *cap* del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP2, o una porción de esta, que comprende una secuencia de
20 aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV remoto. En algunas modalidades, una secuencia de nucleótidos de un gen del *cap* de AAV de animal no primate, el gen *cap* de AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende
25 una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP1, o una porción de esta, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV de animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV remoto.
- 30 En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP3 de animal no primate de la invención. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia

de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP3 de animal no primate de la invención y una proteína de la cápside VP2 de animal no primate de la invención. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP3 de animal que no es un primate de la invención, una proteína de la cápside VP2 de la invención y una proteína de la cápside VP1 de la invención.

En algunas modalidades, el gen *cap* de una molécula de ácido nucleico de la invención codifica (i) una proteína de la cápside VP1 que es (a) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de otro, por ejemplo, un segundo AAV operativamente unido a una región común VP1/VP2 y una región de VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV que no es de primates o el AAV remoto, o (b) una proteína de la cápside VP1 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV que no es de primates o el AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 que es (a) una proteína de la cápside VP2 de AAV quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de otro, por ejemplo, un segundo AAV enlazado operativamente a una región VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos del AAV de no primate o (b) una proteína de la cápside VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 de AAV de primate y/o (iii) una proteína de la cápside VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV de no primate o el AAV remoto.

En algunas modalidades, un gen *cap* de una molécula de ácido nucleico de la invención codifica (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de un otro, por ejemplo, AAV enlazado operativamente a una región común VP1/VP2 y una región VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV de no primate o del AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 de AAV quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de un otro, por ejemplo, un AAV enlazado operativamente a una región VP3 del AAV de no primate o del AAV remoto, y/o (iii) la proteína de la cápside VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos del AAV de no primate o del AAV remoto.

En algunas modalidades, el gen *cap* de una molécula de ácido nucleico de la invención codifica (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos de otro AAV enlazado operativamente a una región común VP1/VP2 y una región VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de secuencia identidad, a una secuencia de aminoácidos del AAV de no primates o del AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV de no primates o del AAV remoto, y (iii) la proteína de la cápside VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV de primate o del AAV remoto.

En algunas modalidades, el gen *cap* de una molécula de ácido nucleico de la invención codifica (i) una proteína de la cápside VP1 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV de no primate o el AAV remoto, (ii) una proteína de la cápside VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV de no primate o del AAV remoto, y/o (iii) una proteína de la cápside VP3 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a o que tiene una identidad significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos del AAV de no primate o del AAV remoto.

En algunas modalidades de moléculas de ácido nucleico de la invención, el otro, segundo AAV es un AAV de primate o una combinación de AAV de primate. En algunas modalidades, el otro AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 y una de sus combinaciones. En algunas modalidades, el otro AAV es AAV2.

En algunas modalidades de moléculas de ácido nucleico de la invención, el AAV de animal no primate es un AAV de no primate enumerado en la Tabla 2. En algunas modalidades, el AAV de no primate es un AAV de ave (AAAV), un AAV de lobo marino o un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAAV y, opcionalmente, una secuencia de nucleótidos de una proteína de la cápside de AAAV comprende una modificación en la posición I444 o I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAAV. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de animal escamoso, por ejemplo, un AAV de dragón barbudo y, opcionalmente, una secuencia de nucleótidos de un AAV de dragón barbudo comprende una modificación en la posición I573 o I436 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo. En algunas modalidades, el AAV de animal no primate es un AAV de mamífero, por ejemplo, un AAV de lobo marino y, opcionalmente, una secuencia de nucleótidos de un AAV de lobo marino comprende una modificación en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 y A565 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de lobo marino.

Las modalidades de moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en (a) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1, (b) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID

NO: 3, (c) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 5, (d) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7, (e) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 9, (f) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 11, (g) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 13, (h) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 15, (i) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 17, (j) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 19, (k) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 21, (l) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 23, (m) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 25, (n) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 27, (o) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 29, (p) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 31, (q) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 33, (r) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 35, (s) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 52, (t) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 54, (u) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 56, (v) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 58, (w) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 60, (x) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 62, (y) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 64, (z) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 66, (aa) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 68, (bb) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 70, (cc) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 o 70, (dd) cualquier porción de la secuencia de nucleótidos de (a)-(cc) que codifica una VP2 proteína de la cápside y / o una proteína de la cápside VP3.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 3, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 5, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7, una porción

[illegible]

nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 33, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 35, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 52, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 54, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 56, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 58, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 60, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 62, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 64, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 66, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 68, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 70, una porción de esta que codifica una proteína de la cápside VP2 y/o VP3, y variantes modificadas de estas.

En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP1 de la invención y, opcionalmente, una proteína de la cápside VP2 y/o VP3 de la invención se

enlaza operativamente a un promotor. En algunas modalidades, el promotor se selecciona de un promotor viral, un promotor bacteriano, un promotor de mamífero (por ejemplo, humano o no humano), un promotor de ave, un promotor de pez, un promotor de insecto, y cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el promotor se selecciona de p40, SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG. En algunas modalidades, el promotor es un promotor de p40 de AAV. En algunas modalidades, el promotor dirige la expresión de las una o más proteínas de la cápside en una célula de empaquetamiento.

En algunas modalidades, el gen *cap* de una molécula de ácido nucleico de la invención se enlaza operativamente a un promotor. En algunas modalidades, el promotor dirige la expresión de las una o más proteínas de la cápside en una célula de empaquetamiento. En algunas modalidades, el promotor se selecciona de p40, SV40, EF, por ejemplo, EF1 α CMV, B19p6 y CAG.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas Rep de AAV, opcionalmente, en donde la segunda secuencia de nucleótidos se enlaza operativamente a un promotor. En algunas modalidades, las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal primate. En algunas modalidades, las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal no primate. En algunas modalidades, las una o más proteínas Rep se seleccionan de Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40, opcionalmente, las una o más proteínas Rep comprenden Rep78. En algunas modalidades, el promotor enlazado operativamente a la segunda secuencia de nucleótidos, que codifica una o más proteínas Rep de AAV, se selecciona de un promotor viral, un promotor bacteriano, un promotor de mamífero (por ejemplo, humano o no humano), un promotor de ave, un promotor de pez, un promotor de insecto, y cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el promotor enlazado operativamente a la segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas Rep de AAV, se selecciona de p19, p5, p40, SV40, EF, por ejemplo, EF1 α CMV, B19p6 y CAG. En algunas modalidades, el promotor dirige la expresión de las una o más proteínas de la cápside en una célula de empaquetamiento. En algunas modalidades, el promotor enlazado operativamente a la segunda secuencia de nucleótidos, que codifica una o más proteínas Rep de AAV, se selecciona de p19 y/o p5.

Las composiciones y células de empaquetamiento que comprenden, y las proteínas de la cápside codificadas a partir de las moléculas de ácido nucleico de la invención, también son parte de la invención. También se describen partículas virales expresadas por las células de empaquetamiento de la invención.

Las composiciones y las células de empaquetamiento para producir partículas virales de AAV de la invención, en algunas modalidades, comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención, que comprende un gen *cap* de la invención que codifica una proteína de la cápside de la invención. En algunas modalidades, una composición y/o célula de empaquetamiento de la invención

5 comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, el gen *cap* comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 3, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 5, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7, la secuencia de nucleótidos establecida como la

10 SEQ ID NO: 9, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 11, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 13, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 15, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 17, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 19, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 21, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 23, la secuencia de

15 nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 25, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 27, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 29, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 31, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 33, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 35, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 52, la secuencia de nucleótidos establecida como la

20 SEQ ID NO: 54, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 56, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 58, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 60, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 62, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 64, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 66, la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 68, la secuencia de

25 nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 70, cualquier porción de la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 o 70, que codifica una cápside de VP2, cualquier porción de la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 o 70 que codifican una cápside VP3 y

30 cualquier combinación de estas.

En algunas modalidades, las composiciones y las células de empaquetamiento comprenden, además, una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *rep* que codifica una o más

proteínas Rep de AAV, en donde dicho gen *rep* se enlaza operativamente a un promotor, opcionalmente, en donde el gen *rep* y el gen *cap* son de dos AAV diferentes. En algunas modalidades, el promotor enlazado operativamente al gen *rep* dirige la expresión de las una o más proteínas Rep en la célula de empaquetamiento, por ejemplo, el promotor se selecciona de p5, p19, SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG. En algunas modalidades, las una o más proteínas Rep se seleccionan de Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40, opcionalmente, las una o más proteínas Rep comprenden Rep78. En algunas modalidades, las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal primate. En algunas otras modalidades, las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal no primate. En algunas modalidades, las una o más proteínas Rep comprenden ambos.

En algunas modalidades, las composiciones y las células de empaquetamiento de la invención comprenden, además, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de un nucleótido de interés flanqueado en al menos un lado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV, que es reconocida por la una o más proteínas Rep. En algunas modalidades, el nucleótido de interés está flanqueado en el otro lado por una segunda ITR del mismo AAV que la al menos una ITR. En algunas modalidades, el nucleótido de interés está flanqueado en el otro lado por una segunda ITR, en donde la segunda ITR y la primera ITR son de AAV diferentes.

[0002] En algunas modalidades, una composición y/o célula de empaquetamiento de la invención comprende además una molécula de ácido nucleico que comprende un nucleótido de interés (por ejemplo, secuencia de nucleótidos de un transgén) flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV 5' y 3', de modo que las partículas virales de interés comprenden, además, un genoma que comprende el nucleótido de interés flanqueado por las ITR de AAV 5' y 3'.

En algunas modalidades, una composición y/o célula de empaquetamiento de la invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de referencia.

En consecuencia, en algunas modalidades, una composición, célula de empaquetamiento, y/o partícula viral de la invención comprende además un genoma que comprende de 5' a 3': una ITR 5', un nucleótido de interés, y una ITR 3'. En algunas modalidades, el genoma comprende además un promotor enlazado operativamente al nucleótido de interés. En algunas modalidades, las ITR 5'

y 3' son de AAV de la misma especie. En algunas modalidades, las ITR 5' y 3' son de AAV de dos especies diferentes.

En algunas modalidades, el nucleótido de interés es un gen reportero. En algunas modalidades, el gen reportero codifica β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (efe), MmGFP, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina, o una de sus combinaciones.

En algunas modalidades, el nucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas o una(s) porción(ones) de este, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

En la presente descripción se describe un método para elaborar una partícula viral de AAV de la invención, el método comprende cultivar una célula de empaquetamiento bajo condiciones suficientes para la producción de partículas virales, la célula de empaquetamiento comprende (1) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas Rep de AAV, por ejemplo, un gen *rep*, y (2) una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP1 de AAV, opcionalmente, una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP2 de AAV, y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside VP3 de AAV de animal no primate, (por ejemplo, una primera, una segunda y una tercera molécula de nucleótidos de la invención) y, opcionalmente, (3) un nucleótido de interés flanqueado por una primera y/o una segunda ITR de un segundo AAV, en donde las una o más proteínas Rep de AAV reconocen un sitio de reconocimiento de la primera y/o la segunda ITR del segundo AAV, en donde la tercera secuencia de nucleótidos codifica una proteína de la cápside VP3 de AAV de animal no primate de la invención y, opcionalmente, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica una proteína de la cápside VP1 de AAV y/o la segunda secuencia de nucleótidos codifica una proteína de la cápside VP2 de AAV de la invención. En algunas modalidades, un único gen *cap* de la invención comprende la primera, la segunda y la tercera secuencia de nucleótidos. En algunas modalidades, un único plásmido de empaquetamiento comprende la al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas Rep de AAV y cualquier combinación del primer, el segundo y el tercer nucleótido, respectivamente, que codifica una proteína de la

cápside VP1 de AAV, una proteína de la cápside VP2 de AAV, y proteína de la cápside VP3 de AAV de un animal no primate.

En algunas modalidades, el método comprende cultivar una célula de empaquetamiento de la invención. En algunas modalidades, el método comprende cultivar una célula de empaquetamiento de la invención que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, en donde la célula de empaquetamiento comprende, opcionalmente, además, un plásmido auxiliar y/o un plásmido de transferencia que comprende un nucleótido de interés.

Algunas modalidades del método comprenden, además, aislar partículas virales adenoasociadas autocomplementarias del sobrenadante de cultivo y/o lisado celular. Algunas modalidades del método comprenden, además, lisar la célula de empaquetamiento y aislar las partículas virales adenoasociadas de cadena simple del sobrenadante de cultivo y/o lisado celular. Algunas modalidades comprenden además a. limpiar los restos celulares, b. tratar el sobrenadante que contiene las partículas virales con Benzonasa o DNasa I y MgCl₂, c. concentrar las partículas virales, d. purificar las partículas virales, y e. cualquier combinación de a.-d.

En algunas modalidades, la partícula viral de mosaico se genera mediante la transfección de mezclas de un primer gen *cap* que codifica una proteína de la cápside VP que comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y al menos un gen *cap* de referencia que codifica una proteína de la cápside VP de referencia en las células de empaquetamiento en una relación determinada. En algunas modalidades, puede generarse una partícula viral de mosaico de la invención con mezclas de un gen *cap*: genes *cap* de referencia. En algunas modalidades, el gen *cap* modificado codifica al menos una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de AAV que comprende una modificación, por ejemplo, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y el gen *cap* de referencia codifica una proteína de la cápside de referencia correspondiente a al menos una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de AAV modificadas, excepto por la modificación. En algunas modalidades, un gen *cap* modificado codifica una proteína de la cápside VP1 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y un gen *cap* de referencia codifica una proteína de la cápside VP1 de referencia que carece de la modificación. En algunas modalidades, un gen *cap* modificado codifica una proteína de la cápside VP2 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y un gen *cap* de referencia codifica una proteína de la cápside VP2 de referencia que carece de la modificación. En algunas modalidades, un gen *cap* modificado codifica una proteína de la cápside VP3 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y un

gen *cap* de referencia codifica una proteína de la cápside VP3 de referencia que carece de la modificación.

Generalmente, las partículas virales, tal como se describen en la presente descripción, comprenden una cápside viral que comprende una proteína de la cápside, tal como se describe en la presente descripción, en donde la cápside viral encapsula un nucleótido de interés. En algunas modalidades, el nucleótido de interés está bajo el control de un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor viral, un promotor bacteriano, un promotor de mamífero, un promotor de ave, un promotor de pescado, un promotor de insectos, y cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el nucleótido de interés está bajo el control de un promotor no humano. En algunas modalidades, el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV). En algunas modalidades, el promotor es un promotor de EF, por ejemplo, EF1 α . En algunas modalidades, el promotor es un promotor de CAG. En algunas modalidades, el promotor es un promotor de ubiquitina C (UbC).

Generalmente, un nucleótido de interés puede ser uno o más genes, que pueden codificar un marcador detectable, por ejemplo, un reportero, o un polipéptido terapéutico. En algunas modalidades, el nucleótido de interés es un gen reportero. En algunas modalidades, el nucleótido de interés es un gen reportero que codifica un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en proteína fluorescente verde, luciferasa, β -galactosidasa, etc. En algunas modalidades, el marcador detectable es una proteína fluorescente verde. En otras modalidades, el nucleótido de interés se selecciona del grupo que consiste en un gen suicida, un nucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de este, un nucleótido que codifica un sistema CRISPR/Cas o porción(ones) de este, un nucleótido que codifica ARN antisentido, un nucleótido que codifica ARNip, una enzima secretada, un gen que codifica una proteína terapéutica, etcétera. En una modalidad, el nucleótido de interés codifica un multidominio terapéutico, por ejemplo, una proteína que comprende al menos dos dominios que proporcionan dos funciones distintas.

Las composiciones descritas en la presente descripción, generalmente, comprenden una partícula viral que comprende una proteína de la cápside viral, tal como se describe en la presente descripción, por ejemplo, comprende una cápside que comprende la proteína de la cápside viral (que incluye una cápside de mosaico), en donde la cápside encapsula un nucleótido de interés. En algunas modalidades, una composición descrita en la presente descripción comprende (1) una partícula viral que tiene una cápside que comprende una proteína de la cápside viral descrita en la presente descripción, y (2) un portador farmacéuticamente aceptable.

En la presente descripción también se describen métodos de uso de las proteínas de la cápside viral, partículas virales que las comprenden, composiciones, etc. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto una célula diana (que puede ser *in vitro* (por ejemplo, *ex vivo*) o *in vivo*, por ejemplo, en un ser humano) con una partícula viral que comprende una proteína de la cápside viral, tal como se describe en la presente descripción, en donde la cápside viral o la partícula viral comprende un ligando de direccionamiento que se une específicamente a una proteína expresada en la superficie de una célula diana.

Las partículas virales, tal como se describen en la presente descripción, son particularmente adecuadas para la introducción dirigida de un nucleótido de interés en una célula específica ya que las una o más proteínas virales descritas en la presente descripción comprenden un primer miembro de un par de unión proteína: proteína con su segundo miembro cognado, opcionalmente, enlazado a un ligando de direccionamiento. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento se enlaza operativamente a la proteína (segundo miembro), por ejemplo, se fusiona a la proteína, opcionalmente, a través de un enlazador. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento puede ser un resto de unión, por ejemplo, un ligando natural, un anticuerpo, una molécula de unión multiespecífica, etc. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento es un anticuerpo o una porción de este. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento es un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a una proteína de la superficie celular en una célula diana y un dominio constante de cadena pesada. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento es un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a una proteína de la superficie celular en una célula diana y un dominio constante de cadena pesada de IgG. En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento es un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a una proteína de la superficie celular en una célula diana y un dominio constante de cadena pesada de IgG, en donde el dominio constante de cadena pesada de IgG se enlaza operativamente, por ejemplo, a través de un enlazador, a una proteína (por ejemplo, un segundo miembro de un par de unión proteína: proteína) que forma un enlace covalente isopeptídico con el primer miembro. En algunas modalidades, una proteína de la cápside descrita en la presente descripción comprende un primer miembro que comprende SpyTag enlazado operativamente a la proteína de la cápside viral, y enlazado covalentemente a SpyTag, un segundo miembro que comprende SpyCatcher enlazado a un ligando de direccionamiento que comprende un dominio variable de anticuerpo y un dominio de cadena pesada de IgG, en donde SpyCatcher y el dominio de cadena pesada de IgG se unen a través de un enlazador de

aminoácidos, por ejemplo, GSGESG (SEQ ID NO: 49). En algunas modalidades, el segundo miembro comprende la secuencia establecida como la SEQ ID NO:47, que comprende una porción de una cadena pesada de IgG4humana, dicha porción de IgG4 tiene una secuencia establecida como la SEQ ID NO: 51, enlazada a través de un enlazador (SEQ ID NO: 49) a SpyCatcher (SEQ ID NO: 43).

[0003] Generalmente, un ligando de direccionamiento se une específicamente a una molécula de la superficie celular, por ejemplo, un oligosacárido, un receptor, un marcador de la superficie celular, etc., expresada en la superficie de una célula eucariota de mamífero (por ejemplo, ser humano), por ejemplo, una célula diana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** proporciona una modalidad ilustrativa (no a escala), no taxativa y de ejemplo, de un plásmido de expresión de Rep-Cap de la invención que puede usarse para generar una partícula viral quimérica de AAV. Las secuencias de AAV de primate se muestran como casillas no rellenas y las secuencias de AAV de animales no primates se muestran en casillas rellenas. También se muestran, con fines ilustrativos no taxativos, los ejemplos de posiciones (a escala) para la inserción de (1) un primer miembro de un par de unión proteína: proteína: para dirigir el tropismo de la cápside ensamblada que comprende las proteínas VP1, VP2, y VP3 codificadas (línea continua dentro de las secuencias de la cápside de AAV de animal no primate) y (2) una etiqueta detectable para la detección de las proteínas VP1, VP2, y VP3 codificadas (línea punteada dentro de las secuencias de la cápside de AAV de animal no primate). Un plásmido de expresión de Rep-Cap, tal como se muestra en la figura 1, puede usarse para producir partículas virales de AAV que comprenden un nucleótido de interés que está flanqueado por las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 5' y 3' del AAV de primate.

La **figura 2** proporciona transferencias western mediante el uso del anticuerpo de B1, que reconoce un epítipo B1 modificado genéticamente en un gen *cap* quimérico de AAV de primate/no primate (véase la figura 1), para analizar la proteína VP1 resultante de AAV de animal primate/no primate, la proteína VP2 de AAV de no primate, y la proteína VP3 de AAV de no primate. El AAV de primate fue AAV2 y el AAV de animal no primate fue (A) AAV de ave, (B) AAV de lobo marino o (C) AAV de dragón barbudo. Mediante la transferencia Western se analizaron muestras de proteínas recogidas durante varias etapas de purificación de partículas de AAV mediante

cromatografía por afinidad, que incluye la muestra de entrada, la fracción de flujo continuo (FT), y la fracción de elución de la columna de cromatografía por afinidad.

La **figura 3A** proporciona una estructura de cinta de VP3 de AAV de ave no taxativa prevista que destaca K580 y G444 como sitios de inserción no taxativos para un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. La **figura 3B** proporciona la cuantificación por qPCR del título del virus obtenido a partir de preparaciones de virus en bruto de un panel de partículas virales quiméricas de AAV2/AAV de ave, que no tienen SpyTag o que comprenden una inserción de SpyTag en la posición indicada, o partículas de mosaico compuestas por partículas de AAV2/AAV de ave que no tienen SpyTag mezcladas con partículas AAV2/AAV de ave que presentan una inserción peptídica de SpyTag en la posición indicada. La **figura 3C** proporciona una transferencia western mediante el uso de un anticuerpo B1, que reconoce un epítipo lineal modificado genéticamente en proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 quiméricas de AAV2/AAV de ave, que analiza la reacción entre un anticuerpo anti-ASGR1 fusionado con SpyCatcher “SpyC-anti-ASGR1 mAb”, y un panel de partículas virales quiméricas de AAV2/AAV de ave que carecen o presentan una inserción de SpyTag en la posición indicada, o partículas de mosaico que comprenden partículas quiméricas de AAV2/AAV de ave que carecen de SpyTag mezcladas con partículas quiméricas de AAV2/AAV de ave que presentan una inserción peptídica de SpyTag en la posición indicada.

La **figura 4A** proporciona una estructura de cinta de VP3 de AAV de lobo marino no taxativo prevista que destaca A565 y G432 como sitios de inserción no taxativos para un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. La **figure 4B** proporciona la cuantificación por qPCR del título del virus obtenido a partir de preparaciones de virus en bruto de un panel de partículas virales quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino, que no tienen SpyTag o que comprenden una inserción de SpyTag en la posición indicada, o partículas de mosaico compuestas por partículas de AAV2/AAV de lobo marino que no tienen SpyTag mezcladas con partículas AAV2/AAV de lobo marino que presentan una inserción de peptídica de SpyTag en la posición indicada. La **figura 4C** proporciona una transferencia western mediante el uso de un anticuerpo B1, que reconoce un epítipo lineal modificado genéticamente en proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino, que analiza la reacción entre un anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher “SpyC-anti-HER2 mAb”, y un panel de partículas virales de AAV2/AAV de lobo marino que carecen o presentan una inserción de SpyTag en la posición indicada, o partículas de AAV2/AAV de lobo marino de mosaico que comprenden partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecen de SpyTag mezcladas con

partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentan una inserción peptídica de SpyTag en la posición indicada.

La **figura 5** proporciona (A) la cuantificación por qPCR del título del virus obtenido a partir de preparaciones de virus en bruto de un panel de partículas virales de AAV2/AAV de lobo marino, que no tienen SpyTag o que presentan una inserción de SpyTag en la posición indicada, y (B) una transferencia western mediante el uso de un anticuerpo B1, que reconoce un epítipo lineal modificado genéticamente en proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino, que analiza la reacción entre un anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher “SpyC mAb”, y un panel de partículas virales de AAV de lobo marino que no tienen SpyTag o presentan una inserción de SpyTag en la posición indicada.

La **figura 6A** proporciona una estructura de cinta de VP3 de AAV de dragón barbudo no taxativo prevista que destaca T573 y G436 como sitios de inserción no taxativos para un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. La **figura 6B** proporciona la cuantificación por qPCR del título del virus obtenido a partir de preparaciones de virus en bruto de un panel de partículas virales quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo, que no tienen SpyTag o que comprenden una inserción de SpyTag en la posición indicada, o partículas de mosaico compuestas por partículas de AAV2/AAV de dragón barbudo que no tienen SpyTag mezcladas con partículas AAV2/AAV de dragón barbudo que presentan una inserción de peptídica de SpyTag en la posición indicada. La **figura 6C** proporciona una transferencia western mediante el uso de un anticuerpo B1, que reconoce un epítipo lineal modificado genéticamente en proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo, que analiza la reacción entre un anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher “SpyC-anti-HER2 mAb”, y un panel de partículas virales de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecen o presentan una inserción de SpyTag en la posición indicada, o partículas de AAV2/AAV de dragón barbudo de mosaico que comprenden partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecen de SpyTag mezcladas con partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que presentan una inserción peptídica de SpyTag en la posición indicada.

La **figura 7A** proporciona los gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo que evalúa la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) por parte de células HER2-positivas (+) 293 hErbB2 infectadas con partículas quiméricas de AAV2/AAAV que no tienen SpyTag, partículas quiméricas de AAV2/AAAV con G444 enlazador6 SpyTag, o partículas quiméricas de AAV2/AAAV con K580 enlazador6 SpyTag. Las partículas quiméricas de

AAV2/AAAV con G444 enlazador6 SpyTag y las partículas quiméricas de AAV2/AAAV con K580 Linker6 SpyTag se conjugaron con un anticuerpo de control de isotipo irrelevante contra GLP1R o con un anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher (SEQ ID NO: 43) a través de SpyTag (SEQ ID NO: 42). Los virus expresan GFP como un marcador de transducción. La **figura 7B** proporciona los gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo que evalúa la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) por parte de células precursoras ASGR1-negativas (-) 293 o ASGR1-positivas (+) 293 hASGR1 infectadas con partículas quiméricas de AAV2/AAAV que no tienen SpyTag o partículas quiméricas de AAV2/AAAV con K580 enlazador6 SpyTag. Las partículas quiméricas de AAV2/AAAV con K580 enlazador6 SpyTag se conjugaron con un anticuerpo de control de isotipo irrelevante contra GLP1R fusionado con SpyCatcher a través de SpyTag, o se conjugaron con un anticuerpo fusionado con SpyCatcher que se une específicamente a ASGR1 a través de SpyTag. Los virus expresan GFP como un marcador de transducción.

La **figura 8A** proporciona los gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo que evalúa la expresión de proteína fluorescente verde (GFP) por parte de células HER2-positivas (+) 293 hErbB2 o células precursoras HER2-negativas (-) 293 infectadas con partículas quiméricas de AAV2/de lobo marino que no tienen SpyTag o partículas quiméricas de AAV2/de lobo marino con G432 Linker6 SpyTag. Las partículas quiméricas de AAV2/de lobo marino con G432 enlazador6 SpyTag se conjugaron con un anticuerpo de control de isotipo irrelevante contra GLP1R fusionado con SpyCatcher a través de SpyTag, o conjugado con un anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher (SEQ ID NO: 43) a través de SpyTag. Los virus expresan GFP como un marcador de transducción. La **figura 8B** proporciona los gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo que evalúa la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) por parte de células precursoras ASGR1-positivas (+) 293 hASGR1 o ASGR1-negativas (-) 293 infectadas con partículas quiméricas de AAV2/de lobo marino que no tienen SpyTag o células infectadas con partículas quiméricas de AAV2/de lobo marino con G432 Linker6 SpyTag. Las partículas quiméricas de AAV2/de lobo marino con G432 enlazador6 SpyTag se conjugaron con un anticuerpo de control de isotipo irrelevante contra GLP1R fusionado con SpyCatcher a través de SpyTag, o se conjugaron con un anticuerpo fusionado con SpyCatcher que se une específicamente a ASGR1 a través de SpyTag. Los virus expresan GFP como un marcador de transducción.

La **figura 9** proporciona gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo que evalúa la expresión de proteína fluorescente verde (GFP) por parte de células HER2- positivas (+) 293 infectadas con un panel de partículas virales quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino, ya sea partículas de AAV2/AAV de lobo marino que no tienen SpyTag o que comprenden una
5 inserción de SpyTag en la posición indicada. La SpyTag insertada en las partículas quiméricas de AAV2/lobo marino se conjugaron a un anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher (SEQ ID NO: 43) a través de SpyTag. Los virus expresan GFP como un marcador de transducción.

La **figura 10A** proporciona los gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo
10 que evalúa la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) por parte de células 293 HerBb2 positivas para HER2 (+) “no infectadas” o infectadas con partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecen de SpyTag, partículas de mosaico quiméricas de AAV2/de dragón barbudo con T573 enlazador6 SpyTag, o partículas de mosaico quiméricas de AAV2/de dragón barbudo con G436 enlazador6 SpyTag. Las partículas de mosaico quiméricas de AAV2/dragón
15 barbudo con T573 enlazador6 SpyTag y las partículas de mosaico quiméricas de AAV2/dragón barbudo con G436 enlazador6 SpyTag se conjugaron con el anticuerpo anti-HER2 (HERCEPTIN®) fusionado con SpyCatcher (SEQ ID NO: 43) a través de SpyTag. Los virus expresan GFP como un marcador de transducción. La **figura 10B** proporciona los gráficos de dispersión obtenidos a partir de una citometría de flujo que evalúa la expresión de proteína
20 fluorescente verde (GFP) por parte de células 293 hASGR1 positivas para ASGR1 (+) o células 293 precursoras negativas para ASGR1 (-) infectadas con partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que no tienen SpyTag, partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo con T573 enlazador6 SpyTag, o partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo con T573 enlazador6 SpyTag anti-ASGR1. Las partículas quiméricas de AAV2/dragón barbudo con
25 T573 enlazador6 SpyTag anti-ASGR1 se conjugaron con un anticuerpo fusionado con SpyCatcher que se une específicamente a ASGR1 a través de SpyTag. Los virus expresan GFP como un marcador de transducción.

La **figura 11A** proporciona los resultados de un ensayo de luciferasa Nanoluc que evalúa la expresión del reportero Nanoluc por parte de células positivas (+) para hASGR1 después de la
30 infección con partículas de “AAV2 anti-ASGR1”, partículas quiméricas de AAV2/AAAV anti-ASGR1 o partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino anti-ASGR1 en la presencia de la concentración indicada de IgG humana purificada. Todas las partículas se conjugaron con un

anticuerpo fusionado con SpyCatcher que se une específicamente a ASGR1 a través de SpyTag. Los virus expresan Nanoluc como un marcador de transducción. La **figura 11B** proporciona una cuantificación de los gráficos en la figura 11A, pero normalizados a la condición de “PBS solo”. La **figura 11C** proporciona una tabla de los valores de IC50 para la concentración de IgG necesaria para neutralizar los virus indicados en un 50 %.

La **figura 12** proporciona las (A) imágenes de luminiscencia de ratones genéticamente modificados que expresan ASGR1 humano en las células hepáticas (ratones humanizados con ASGR1) 33 días de una inyección intravenosa con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o con 5.0×10^{11} genomas virales (vg)/ animales de partículas quiméricas de AAV2/AAV con SpyTag que presentan un nucleótido de luciferasa de luciérnaga de interés y modificadas con (1) un anticuerpo SpyCatcher-anti-ASGR1 humano o (2) un anticuerpo SpyCatcher-anti-GLP1R humano (mAb de control). Los virus expresan luciferasa de luciérnaga como un marcador de transducción. Los ratones se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum In Vivo (PerkinElmer); (B) una cuantificación de la radiancia promedio de los animales individuales dentro de las imágenes de luminiscencia representadas en el panel A; y (C) a cuantificación de la radiancia promedio de órganos disecados (hígado y pulmón) de los animales representados en el panel A.

La **figura 13** proporciona las (A) imágenes de luminiscencia de ratones genéticamente modificados que expresan ASGR1 humano en las células hepáticas (ratones humanizados con ASGR1) 33 días de una inyección intravenosa con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o con 5.0×10^{11} genomas virales (vg)/animales de partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con SpyTag que presentan un nucleótido de luciferasa de luciérnaga de interés y modificadas con (1) un anticuerpo SpyCatcher-anti-ASGR1 humano o (2) un anticuerpo SpyCatcher-anti-GLP1R humano (mAb de control). Los virus expresan una luciferasa de luciérnaga como un marcador de transducción. Los ratones se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum In Vivo (PerkinElmer); (B) cuantificación de la radiancia promedio de los animales individuales dentro de las imágenes de luminiscencia representadas en el panel A; (C) cuantificación de la radiancia promedio de órganos disecados (hígado y pulmón) de los animales representados en el panel A.

La **figura 14** proporciona una imagen de inmunofluorescencia de un órgano del oído interno de un ratón neonatal del cultivo de explante de corte 3 días después de la infección con partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag. El virus expresa GFP como un marcador de transducción (verde), y las células pilosas se etiquetan con un anticuerpo que detecta Myo7a (rojo).

La **figura 15A** proporciona un alineamiento de 16 aminoácidos del extremo C de las secuencias quiméricas de AAV2 o AAV2/lobo marino que comprenden una modificación del epítipo B1 para reemplazarlo completamente o solo en el residuo 730 con la secuencia homóloga de AAV de lobo marino. Se ejemplifica el epítipo del anticuerpo monoclonal B1. La **figura 15B** proporciona una cuantificación de qPCR del título de virus obtenido a partir de las preparaciones de virus purificadas de partículas quiméricas de AAV de AAV2/lobo marino que no tienen SpyTag o no tienen SpyTag y que comprenden una modificación del epítipo B1 para reemplazarlo por completo o solo en el residuo 730 con una secuencia homóloga de AAV de lobo marino. La **figura 15C** proporciona una tinción de gel de proteína mediante el uso de SYPRO Ruby analizando la expresión de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de partículas quiméricas de AAV de AAV2/lobo marino que no tienen SpyTag o no tienen SpyTag y que comprende una modificación del epítipo B1 para reemplazarlo por completo o solo en residuo 730 con secuencia homóloga de AAV de lobo marino. La **figura 15D** proporciona un gráfico XY obtenido de la evaluación de luminiscencia de la expresión de la luciferasa NanoLuc de los lisados de células HEK293T infectadas en varias multiplicidades de infección (MOI) con partículas quiméricas de AAV de AAV2/lobo marino que no tienen SpyTag o no tienen SpyTag y que comprenden una modificación del epítipo B1 para reemplazarlo por completo o solo en el residuo 730 con la secuencia homóloga de AAV de lobo marino. Los virus expresan la luciferasa NanoLuc como un marcador de transducción.

La **figura 16** proporciona la cuantificación de la radiancia promedio de órganos disecados de ratones 34 días después de la inyección intravenosa con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o 5.0×10^{11} genomas virales (vg)/animal de partículas quiméricas de AAV de AAV2/lobo marino que llevan un nucleótido luciferasa de luciérnaga de interés y modificadas al no tener SpyTag o no tener SpyTag y que comprenden una modificación del epítipo B1 para reemplazarlo por completo o solo en el residuo 730 con secuencia homóloga de AAV de lobo marino. Los virus expresan una luciferasa de luciérnaga como un marcador de transducción. Los ratones se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se

obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum In Vivo (PerkinElmer).

La **figura 17** proporciona una modalidad ilustrativa (no a escala), no taxativa y de ejemplo, de un plásmido de expresión de Rep-Cap de la invención que puede usarse para generar una partícula viral quimérica de AAV. Las secuencias de AAV de primate se muestran como cajas sin relleno y las secuencias de AAV de animales que no son primate se muestran en cajas rellenas. También se muestran con fines ilustrativos únicamente las posiciones ilustrativas no taxativas (no a escala) para (1) ubicaciones de interfaz alternativas entre las secuencias de la cápside de los primates y los leones marinos (líneas negras punteadas dentro de la secuencia de la cápside del AAV del animal primate) y (2) una etiqueta detectable para la detección de las proteínas VP1, VP2 y VP3 codificadas (línea de puntos dentro de las secuencias de la cápside del AAV de animal no primate). Un plásmido de expresión de Rep-Cap, tal como se muestra en la figura 17, puede usarse para producir partículas virales de AAV que comprenden un nucleótido de interés que está flanqueado por las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 5' y 3' del AAV de primate.

La **figura 18A** proporciona una cuantificación de qPCR del título de virus obtenido a partir de preparaciones de virus purificadas de partículas quiméricas de AAV de AAV2/lobo marino que no tienen SpyTag y que comprenden ubicaciones de interfaz alternativas entre AAV2 y las secuencias de la cápside de lobo marino. Las preparaciones se purificaron a partir del lisado celular (v2 - v4) o tanto de lisado celular como de medio (v5). La **figura 18B** y **figura 18C** proporcionan los gráficos XY obtenidos de la evaluación de luminiscencia de la expresión de la luciferasa NanoLuc de los lisados de células HEK293T infectadas en varias multiplicidades de infección (MOI) con partículas de AAV de AAV2/lobo marino que no tienen SpyTag y ubicaciones de interfaz alternativas entre AAV2 y las secuencias de la cápside de lobo marino. Un conjunto de datos históricos para AAV de AAV2/lobo marino No SpyTag se usa como referencia. Los virus expresan la luciferasa NanoLuc como un marcador de transducción. La **figura 18D** proporciona la cuantificación de la radiancia promedio de órganos disecados de ratones 56 días después de la inyección intravenosa con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o 5.0×10^{11} genomas virales (vg)/animal de AAV de AAV2/lobo marino que llevan un nucleótido luciferasa de luciérnaga de interés y se modifican al no tener SpyTag o no tener SpyTag y el epítipo B1 reemplazado por completo con la secuencia homóloga de AAV de lobo marino con o sin ubicaciones de interfaz alternativas entre las secuencias de la cápside de AAV2 y lobo marino. Los virus expresan luciferasa de luciérnaga como un marcador de transducción. Los ratones se

anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum In Vivo (PerkinElmer).

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Aunque en los últimos años se han visto mejoras en los enfoques recombinantes para el direccionamiento de células específicas a través de terapia génica de AAV, los enfoques recombinantes actuales usados para desarrollar un AAV que escape a la detección y/o la neutralización por parte de anticuerpos preexistentes, que posiblemente se hallan desarrollado en la vida temprana, siguen siendo un problema. En la presente descripción se describe un enfoque que emplea (1) las capacidades naturales de los AAV de animales no primates o los AAV remotos para infectar células de primates, (2) la falta de NAb en seres humanos para las proteínas de la cápside de AAV de animales no primates, y si se desea o es necesario, (3) la adaptabilidad de un primer miembro de un par de unión proteína: proteína genéticamente modificado en las proteínas de la cápside de AAV para la producción de partículas virales de AAV útiles para la terapia génica dirigida, por ejemplo, la introducción de un nucleótido de interés en una células específica de interés. En la presente descripción se describe una molécula de nucleótidos que comprende al menos un gen *cap* de AAV empleado de conformidad con su función deseada. Una molécula de nucleótidos de la invención comprende un gen *cap* o una porción de este de un AAV de animal no primate y/o remoto (para la producción de cápsides de virus que no son fácilmente reconocidas por NAb preexistentes). El gen *cap* o porción de este de un AAV humano no primate puede modificarse con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína al cual puede unirse un segundo miembro que comprende un ligando de direccionamiento y dirigir el tropismo de las partículas virales de AAV resultantes.

Para los AAV de animales no primates o los AAV remotos que son incapaces de infectar las células de primate, el gen *cap* puede diseñarse como un gen *cap* quimérico que codifica al menos el dominio de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) de una proteína de la cápside VP1 de AAV de un primate y al menos una porción de la proteína de la cápside VP3 de un AAV de primate no humano o AAV remoto. Una proteína de la cápside VP1 (más particularmente, la región única de VP1 (VP1-u) de la cápside Vp1) presenta el dominio PLA₂ y se considera que es importante durante una infección por AAV al mediar la transferencia desde el genoma viral de endosomas/lisosomas tardíos hacia el núcleo para iniciar la replicación (Zadori y otros., 2001, Dev Cell, 1(2):291-302). La proteína de la

cápside VP3 es la principal proteína de la cápside de la superficie de una partícula de virus AAV, y como tal, es poco probable que una cápside de virus que comprende al menos una porción de una proteína de la cápside VP3 de un AAV de animal no primate o un AAV remoto sea reconocida por NAb cultivados contra los serotipos de AAV aislados de primates durante el curso de la infección con el AAV de primate.

Una representación no taxativa de una molécula de ácido nucleico que comprende el gen *rep* de un AAV de primate y un gen *cap* quimérico se proporciona en la figura 1. Para el AAV remoto o AAV de humano no primate que es capaz de infectar las células de primate, el gen *rep* de un AAV de primate puede enlazarse operativamente a un gen *cap* tal como se describe en la presente descripción o un gen *cap* de un AAV no primate. Los ejemplos en la presente descripción muestran que dicha molécula de ácido nucleico, cuando se expresa en una línea de células de empaquetamiento con un plásmido auxiliar y un genoma de AAV de primate que presenta un nucleótido de interés, es capaz de codificar la replicación adecuada y las proteínas de la cápside que funcionan para replicar y encapsular, respectivamente, el genoma del AAV de primate en una partícula viral capaz de infectar células *in vivo*. Además, los ejemplos muestran que el tropismo de dicha partícula viral de AAV se adapta fácilmente mediante el uso del primer y segundo miembro de un par de unión proteína: proteína, y, además, la inserción de un primer y segundo miembro de un par de unión proteína: proteína no aumenta la probabilidad de reconocimiento de NAb cultivados contra la infección por AAV de primates. Como tal, en la presente descripción se proporcionan las partículas virales modificadas genéticamente, las composiciones que las comprenden, y los métodos de elaboración y uso de estas.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a “un método” incluye uno o más métodos y/o etapas del tipo descrito en la presente descripción y/o los que serán evidentes para los expertos en la técnica después de la lectura de esta descripción.

El “por ciento (%) de identidad” o similar puede determinarse fácilmente para secuencias de aminoácidos o nucleótidos, en la longitud completa de una proteína o una porción de esta. Una porción puede tener una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos o 24 nucleótidos, respectivamente, y puede tener hasta aproximadamente 700 aminoácidos o 2100 nucleótidos,

respectivamente. Generalmente, cuando se hace referencia a "identidad", "homología" o "similitud" entre dos virus adenoasociados diferentes, la "identidad", "homología" o "similitud" se determina en referencia a las secuencias "alineadas". Secuencias "alineadas" o "alineamientos" se refieren a múltiples secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de proteínas (aminoácidos), que a menudo contienen correcciones para bases o aminoácidos faltantes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia.

Los alineamientos pueden realizarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de programas de alineamiento de secuencia múltiple disponibles pública o comercialmente. Los programas de alineamiento de secuencias están disponibles para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". Generalmente, cualquiera de estos programas se usa con los ajustes previamente determinados, aunque un experto en la técnica puede modificar estos ajustes según sea necesario. Alternativamente, un experto en la técnica puede utilizar otro algoritmo o programa de computadora que proporcione al menos el nivel de identidad o alineamiento que proporcionan los algoritmos y programas referenciados. Véase, por ejemplo, JD Thomson y otros, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

También están disponibles múltiples programas de alineamiento de secuencias para secuencias de ácidos nucleicos. Ejemplos de tales programas incluyen, "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP" y "MEME", a los que puede accederse a través de servidores web en Internet. Los expertos en la técnica conocen otras fuentes para tales programas. Alternativamente, también se usan las utilidades de Vector NTI. También hay varios algoritmos conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos, incluidos los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse mediante el uso de FASTATM, un programa en GCG Versión 6.1. FASTATM proporciona los alineamientos y por ciento de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda. Por ejemplo, el por ciento de identidad de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico puede determinarse mediante el uso de FASTATM con sus parámetros previamente determinados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) como se proporciona en GCG Versión 6.1, incorporada en la presente descripción como referencia.

"Identidad significativa" abarca los alineamientos de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos que son al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 93 %, por ejemplo, al menos el 95 %, por

ejemplo, al menos el 96 %, por ejemplo, al menos el 97 %, por ejemplo, al menos el 98 %, por ejemplo, al menos el 99 % o, por ejemplo, al menos el 100 % idénticos.

El término “quimérico” abarca un gen funcional o polipéptido que comprende las secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos, respectivamente, de al menos dos organismos diferentes, por ejemplo, porciones de un gen o polipéptido de al menos un primer y un segundo AAV, en donde la al menos primera y segunda porciones están enlazadas operativamente. A menos que se especifiquen como quiméricos, las secuencias de nucleótidos, genes, polipéptidos y aminoácidos se consideran no quiméricas, por ejemplo, que comprenden una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de un único organismo, por ejemplo, un único AAV.

El término “anticuerpo” incluye las moléculas de inmunoglobulinas que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de la cadena pesada comprende al menos tres dominios, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y opcionalmente C_{H4} . Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera (C_H) y una región constante de cadena ligera (C_L). Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada dominio variable de la cadena pesada y ligera comprende tres CDR y cuatro FR, ordenados desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Las estructuras de anticuerpos tetraméricas típicas comprenden dos dominios de unión a antígeno idénticos, cada uno de los cuales se forma por asociación de los dominios de V_H y V_L , y cada uno de los cuales junto con los respectivos dominios C_H y C_L forman la región Fv del anticuerpo. Los anticuerpos de dominio único comprenden un dominio de unión a antígeno único, por ejemplo, una V_H o una V_L . El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, la parte de un anticuerpo que reconoce y se une al primer miembro de un par de unión específico de un antígeno, también se denomina “parátopo”. Es una región pequeña (de 5 a 10 aminoácidos) de una región Fv de un anticuerpo, parte del fragmento de unión al antígeno (región Fab) y puede contener partes de las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo. Un parátopo se une específicamente a un primer miembro de un par de unión específico cuando el parátopo se une al primer miembro de un par de unión

específico con una alta afinidad. El término anticuerpo de “alta afinidad” se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su primer miembro diana de un par de enlace específico alrededor de 10^{-9} M o menor (por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M o aproximadamente 1×10^{-12} M). En una modalidad, la K_D se mide mediante resonancia superficial de plasmones, por ejemplo, BIACORE™; En otra modalidad, K_D se mide mediante ELISA.

La frase “región determinante de complementariedad”, o el término “CDR”, incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de los genes de inmunoglobulinas de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o una pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de células T). Una CDR puede ser codificada, por ejemplo, por una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por una célula B o una célula T virgen o madura. Una CDR puede mutarse somáticamente (por ejemplo, variar de una secuencia codificada en la línea germinal de un animal), humanizarse, y/o modificarse con sustituciones, adiciones, o deleciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden ser codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácidos nucleicos no reordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácidos nucleicos de células B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o la conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

La frase “cadena ligera” incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de otra manera incluye las cadenas ligeras κ y λ humanas y una VpreB, así como también las cadenas ligeras sustitutas. Los dominios variables de la cadena ligera incluyen típicamente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique de cualquier otra manera. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el amino terminal al carboxilo terminal, un dominio variable que incluye FR1-CDR1- FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y una región constante de la cadena ligera. Un dominio variable de cadena ligera está codificado por una secuencia génica de región variable de cadena ligera, que generalmente comprende los segmentos V_L y J_L , derivados de un repertorio de segmentos V y J presentes en la línea germinal. Las secuencias, localizaciones y nomenclatura para los segmentos de cadena ligera V y J para varios organismos pueden encontrarse en la base de datos IMGT, www.imgt.org. Las cadenas ligeras incluyen, por ejemplo, las que no se unen

selectivamente a un primer o a un segundo primer miembro de un par de unión específico unido selectivamente por el primer miembro de un par de unión específico-proteína de unión en la que aparecen. Las cadenas ligeras incluyen, además, las que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada u otra cadena ligera con la unión y el reconocimiento de, uno o más del primer miembro de un par de unión específico unido selectivamente por el primer miembro de un par de unión específico-proteína de unión en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes o universales incluyen las derivadas de un gen de V κ 1-39J κ humano o un gen de V κ 3-20J κ humano e incluyen las versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, con maduración de afinidad) de las mismas. Los segmentos de la V_L humana ilustrativos incluyen un segmento génico de V κ 1-39 humano, un segmento génico de V κ 3-20 humano, un segmento génico de V λ 1-40 humano, un segmento génico de V λ 1-44 humano, un segmento génico de V λ 2-8 humano, un segmento génico de V λ 2-14 humano, y segmento génico de V λ 3-21 humano e incluye versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, con maduración de afinidad) de las mismas. Pueden elaborarse cadenas ligeras que comprenden un dominio variable de un organismo (por ejemplo, humano o roedor, por ejemplo, rata o ratón; o ave, por ejemplo, pollo) y una región constante del mismo organismo o uno diferente (por ejemplo, humano o roedor, por ejemplo, rata o ratón; o ave, por ejemplo, pollo).

El término “aproximadamente” o “alrededor de” incluye que está dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro del 50 %, con mayor preferencia dentro del 20 %, aún con mayor preferencia dentro del 10 %, e incluso con mayor preferencia dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. La variación permitida abarcada por el término “aproximadamente” o “alrededor de” depende del sistema particular en estudio, y puede apreciarse fácilmente por un experto en la técnica.

La frase “cadena pesada,” o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye una secuencia de región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, de cualquier organismo. Los dominios variables de la 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, después del dominio variable (del extremo N al extremo C), un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2, y un dominio C_H3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un primer

miembro de un par de unión específico (por ejemplo, reconocer el primer miembro de un par de unión específico con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de ser expresado y secretado por una célula, y que comprende al menos una CDR. Los dominios variables de la cadena pesada son codificados por una secuencia de nucleótidos de región variable, que generalmente comprende segmentos V_H , D_H , y J_H derivados de un repertorio de segmentos V_H , D_H , y J_H presentes en la línea germinal. Las secuencias, las localizaciones y la nomenclatura para los segmentos de la cadena pesada V, D, y J para varios organismos pueden encontrarse en la base de datos IMGT, que es accesible a través de internet en la red mundial (www) en la URL “imgt.org.”

El término "anticuerpo solamente de cadena pesada", "proteína de unión a antígeno solamente de cadena pesada", "proteína de unión a antígeno de dominio único", "proteína de unión a dominio único" o similares se refiere a una molécula de inmunoglobulina monomérica u homodimérica que comprende una cadena de tipo inmunoglobulina que comprende un dominio variable unido operativamente a una región constante de cadena pesada, que no puede asociarse con una cadena ligera debido a que la región constante de cadena pesada típicamente carece de un dominio C_{H1} funcional. En consecuencia, el término "anticuerpo solamente de cadena pesada", "proteína de unión a antígeno solamente de cadena pesada", "proteína de unión a antígeno de dominio único", "proteína de unión de dominio único" o similares abarca tanto (i) una proteína de unión a antígeno de dominio único monomérica que comprende una de las cadenas de tipo inmunoglobulina que comprende un dominio variable enlazado operativamente a una región constante de cadena pesada que carece de un dominio C_{H1} funcional, o (ii) una proteína de unión a antígeno de dominio único homodimérica que comprende dos cadenas de tipo inmunoglobulina, cada una de las cuales comprende un dominio variable enlazado operativamente a una región constante de cadena pesada que carece de un dominio C_{H1} funcional. En diversos aspectos, una proteína de unión a antígeno de dominio único homodimérica comprende dos cadenas similares a inmunoglobulinas idénticas, cada una de las cuales comprende un dominio variable idéntico enlazado operativamente a una región constante de cadena pesada idéntica que carece de un dominio C_{H1} funcional. Adicionalmente, cada cadena de tipo inmunoglobulina de una proteína de unión a antígeno de dominio único comprende un dominio variable, que puede derivarse de segmentos génicos de la región variable de cadena pesada (por ejemplo, V_H , D_H , J_H), segmentos génicos de cadena ligera (por ejemplo, V_L , J_L), o una de sus combinaciones, unida a una secuencia génica de la región constante de la cadena pesada (C_H) que comprende una delección o mutación de inactivación en una secuencia que codifica

C_H1 (y, opcionalmente, una región de bisagra) de un gen de la región constante de la cadena pesada, por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgD o una de sus combinaciones. Una proteína de unión a antígeno de dominio único que comprende un dominio variable derivado de los segmentos génicos de cadena pesada puede denominarse como un "anticuerpo de dominio único V_H" o "proteína de unión a antígeno de dominio único V_H", véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 8,754,287; patentes de Estados Unidos núm. 20140289876; 20150197553; 20150197554; 20150197555; 20150196015; 20150197556 and 20150197557, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad como referencia. Una proteína de unión a antígeno de dominio único que comprende un dominio variable derivado de segmentos génicos de cadena ligera puede denominarse como una "proteína de unión a antígeno de dominio único V_L", véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos núm. 20150289489, que se incorpora en su totalidad como referencia. La frase "cadena ligera" incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de cualquier otra manera incluye las cadenas ligeras humanas kappa (κ) y lambda (λ) y una VpreB, así como también las cadenas ligeras sustitutas. Los dominios variables de la cadena ligera incluyen típicamente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique de cualquier otra manera. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino al extremo carboxilo, un dominio variable que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y una secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera. Los dominios variables de la cadena ligera son codificados por la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera, que generalmente comprende los segmentos génicos V_L de cadena ligera y J_L de cadena ligera, derivados de un repertorio de segmentos génicos V y J de cadena ligera presentes en la línea germinal. Las secuencias, las localizaciones y la nomenclatura para los segmentos génicos V y J de cadena ligera para varios organismos pueden encontrarse en la base de datos IMGT, que es accesible a través de internet en la red mundial (www) en la URL "imgt.org." Las cadenas ligeras incluyen, por ejemplo, las que no se unen selectivamente a un primer o a un segundo primer miembro de un par de unión específico unido selectivamente por el primer miembro de un par de unión específico-proteína de unión en la que aparecen. Las cadenas ligeras incluyen, además, las que se unen y reconocen, o ayudan a la unión y reconocimiento de la cadena pesada, uno o más del primer miembro de un par de unión específico unido selectivamente por el primer miembro de un par de unión específico-proteína de unión en la que aparecen. Las cadenas ligeras incluyen, además, las que se unen y reconocen, o ayudan a la unión y reconocimiento de la cadena pesada,

uno o más del primer miembro de un par de unión específico unido selectivamente por el primer miembro de un par de unión específico-proteína de unión en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes o universales incluyen las derivadas de un gen de Vκ1-39Jκ5 humana o un gen de Vκ3-20Jκ1 humana e incluyen las versiones somáticamente mutadas (por ejemplo, con maduración de afinidad) de las mismas.

La expresión "enlazado operativamente", como se usa en la presente descripción, incluye una yuxtaposición física (por ejemplo, en un espacio tridimensional) de componentes o elementos que interactúan, directamente o indirectamente entre sí, o se coordinan de cualquier otra manera para participar en un evento biológico, cuya yuxtaposición logra o permite tal interacción y/o coordinación. Para proporcionar un ejemplo, se dice que una secuencia de control (por ejemplo, una secuencia de control de expresión) en un ácido nucleico está "enlazada operativamente" a una secuencia codificante cuando se ubica con relación a la secuencia codificante de manera que su presencia o ausencia tenga un impacto en la expresión y/o actividad de la secuencia codificante. En muchas modalidades, un "enlace operativo" implica un enlace covalente de componentes o elementos relevantes entre sí. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que, en algunas modalidades, no se requiere enlace covalente para lograr un enlace operativo eficaz. Por ejemplo, en algunas modalidades, las secuencias de control de ácido nucleico que están enlazadas operativamente con secuencias codificantes que controlan son contiguas al nucleótido de interés. Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, una o más de tales secuencias de control actúan en trans o a una distancia para controlar una secuencia codificante de interés. En algunas modalidades, el término "secuencia de control de la expresión", como se usa en la presente descripción se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias y/o suficientes para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se unen. En algunas modalidades, las secuencias de control de la expresión pueden ser o comprender secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y/o potenciadoras de la transcripción; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficacia de la traducción (por ejemplo, secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y/o, en algunas modalidades, secuencias que potencian la secreción de proteínas. En algunas modalidades, una o más secuencias de control son preferentemente o exclusivamente activas en una célula u organismo huésped particular, o tipo de esta. Para dar solo un ejemplo, en procariotas, las secuencias de control típicamente incluyen promotor, sitio de unión

ribosomal y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, en muchas modalidades, las secuencias de control típicamente incluyen promotores, potenciadores y/o secuencias de terminación de la transcripción. Los expertos en la técnica apreciarán a partir del contexto que, en muchas modalidades, el término "secuencias de control" se refiere a componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y en algunas modalidades incluye componentes cuya presencia es ventajosa para la expresión (que incluye, por ejemplo, secuencias líderes, secuencias de orientación, y/o secuencias de parejas de fusión).

“Redireccionamiento” o “redirección” puede incluir un escenario en el que la partícula de tipo salvaje se dirige a varias células dentro de un tejido y/o varios órganos dentro de un organismo, y el direccionamiento general del tejido u órganos se reduce o suprime mediante la inserción del aminoácido heterólogo, y cuyo redireccionamiento a más de una célula específica en el tejido o un órgano específico en el organismo se logra con el ligando de direccionamiento (por ejemplo, a través de un ligando de direccionamiento) que se une a un marcador expresado por la célula específica. Tal redireccionamiento o redirección puede incluir, además, un escenario en el que la partícula de tipo salvaje se dirige a un tejido, cuyo direccionamiento del tejido se reduce y suprime mediante la inserción del aminoácido heterólogo, y cuyo redireccionamiento a un tejido completamente diferente se logra con el ligando de direccionamiento.

“Par de unión específica”, “par de unión proteína: proteína”, y similares, incluyen dos proteínas (por ejemplo, un primer miembro (por ejemplo, un primer polipéptido) y un segundo miembro cognado (por ejemplo, un segundo polipéptido)) que interactúan para formar un enlace (por ejemplo, un enlace no covalente entre un primer miembro, epítipo, y un segundo miembro, porción de unión al antígeno de un anticuerpo que reconoce el epítipo) o un enlace isopeptídico covalente en condiciones que permiten o facilitan la formación de enlaces. En algunas modalidades, el término "cognado" se refiere a componentes que funcionan juntos. Los anticuerpos epítopos y cognados de estos, particularmente epítopos que también pueden actuar como una etiqueta detectable (por ejemplo, c-myc) son conocidos en la técnica. Los pares de unión de proteína: proteína específicos capaces de interactuar para formar un enlace isopeptídico covalente se revisan en Veggiani y otros. (2014) *Trends Biotechnol.* 32:506, e incluyen pares de unión péptido: péptido tales como SpyTag: SpyCatcher, SpyTag002:SpyCatcher002; SpyTag: KTag; isopeptag: pilin C, SnoopTag: SnoopCatcher, etc. Generalmente, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se refiere al miembro de un par de unión proteína: proteína, que generalmente tiene menos de 30 aminoácidos de longitud, y que forma un enlace isopeptídico

covalente con la segunda proteína cognada, en donde la segunda proteína cognada es generalmente más larga, pero puede tener, además, menos de 30 aminoácidos de longitud tal como en el sistema SpyTag: KTag.

El término "enlace isopeptídico" se refiere a un enlace amida entre un grupo carboxilo o carboxamida y un grupo amino al menos uno de los cuales no se deriva de una cadena principal de proteína o alternativamente no es parte de la cadena principal de proteína. Un enlace isopeptídico puede formarse dentro de una sola proteína o puede producirse entre dos péptidos o un péptido y una proteína. Por lo tanto, un enlace isopeptídico puede formarse de forma intramolecular dentro de una sola proteína o intermolecular, es decir, entre dos moléculas peptídicas/proteica, por ejemplo, entre dos enlazadores peptídicos. Típicamente, un enlace isopeptídico puede producirse entre un residuo de lisina y un residuo de asparagina, ácido aspártico, glutamina, o ácido glutámico o el grupo del extremo carboxilo de la cadena proteica o peptídica o puede producirse entre el extremo alfa-amino de la cadena proteica o peptídica y una asparagina, ácido aspártico, glutamina o ácido glutámico. En la presente descripción, se hace referencia a cada residuo del par implicado en el enlace isopeptídico como un residuo reactivo. En modalidades preferidas de la invención, un enlace isopeptídico puede formarse entre un residuo de lisina y un residuo de asparagina o entre un residuo de lisina y un residuo de ácido aspártico. Particularmente, pueden producirse enlaces isopeptídicos entre la amina de cadena lateral de la lisina y el grupo carboxamida de la asparagina o grupo carboxilo de un aspartato.

El sistema SpyTag: SpyCatcher se describe en la patente de Estados Unidos núm. 9,547,003 y Zaveri y otros. (2012) *PNAS* 109: E690-E697, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia, y se deriva del dominio CnaB2 de la proteína de unión a fitomejoramiento FbAb de *Streptococcus pyogenes*. Al dividir el dominio, Zakeri y otros obtuvieron un péptido "SpyTag" que tiene la secuencia AHIVMVDAYKPTK (SEQ ID NO: 42) que forma un enlace amida con su proteína afín "SpyCatcher", un polipéptido de 112 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 43. (Zakeri (2012), *supra*). Un par de unión específico adicional derivado del dominio CnaB2 es SpyTag: KTag, que forma un enlace isopeptídico en presencia de SpyLigasa. (Fierer (2014) *PNAS* 111: E1176-1181). La SpyLigasa se modificó genéticamente mediante la escisión de la hebra β de SpyCatcher que contiene una lisina reactiva, dando como resultado KTag, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína de 10 residuos que tiene la secuencia de aminoácidos ATHIKFSKRD (SEQ ID NO: 72). El sistema SpyTag002:SpyCatcher002 se describe en Keeble y otros (2017) *Angew Chem*

Int Ed Engl 56:16521-25, incorporado en la presente descripción en su totalidad como referencia. SpyTag002 tiene la secuencia de aminoácidos VPTIVMVDAYKRYK, establecida como la SEQ ID NO: 73, y se une a SpyCatcher002.

El sistema SnoopTag: SnoopCatcher se describe en Veggiani (2016) *PNA* 113:1202-07. El dominio tipo Ig D4 de RrgA, una adhesión de *Streptococcus pneumoniae*, se separó para formar SnoopTag (residuos 734-745) y SnoopCatcher (residuos 749-860). La incubación de SnoopTag y SnoopCatcher da como resultado un enlace isopeptídico espontáneo que es específico entre las proteínas complementarias. Veggiani (2016)), *supra*.

El par de unión específico a isopeptag: pilin-C se derivó de la proteína pilin principal Spy0128 de *Streptococcus pyogenes*. (Zakeir y Howarth (2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132:4526-27). Isopeptag tiene la secuencia de aminoácidos TDKDMTITFTNKKDAE, establecida como la SEQ ID NO: 75, y se une a pilin-C (residuos 18-299 de Spy0128). La incubación de SnoopTag y SnoopCatcher da como resultado un enlace isopeptídico espontáneo que es específico entre las proteínas complementarias. Zakeir y Howarth (2010), *supra*.

El término “etiqueta detectable” incluye una secuencia de polipéptidos que es miembro de un par de unión específica, por ejemplo, que se une específicamente a través de un enlace no covalente con otra secuencia de polipéptidos, por ejemplo, un parátipo de anticuerpos, con alta afinidad. Las etiquetas detectables ilustrativas no taxativas incluyen la etiqueta de hexahistidina, etiqueta FLAG, etiqueta Strep II, etiqueta de péptido de unión a estreptavidina (SBP), péptido de unión a calmodulina (CBP), glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta S, etiqueta HA y etiqueta c-myc (SEQ ID NO: 44). (Revisado en Zhao y otros. (2013) *J. Analytical Meth. Chem.* 1-8; incorporado en la presente descripción como referencia). Una etiqueta detectable común para el AAV de primates es el epítipo B1 (SEQ ID NO: 45). Las proteínas de la cápside de AAV de no primates de la invención, que no comprenden naturalmente el epítipo B1, pueden modificarse en la presente descripción para comprender un epítipo B1. Generalmente, las proteínas de la cápside de AAV de no primates pueden comprender una secuencia con homología sustancial con el epítipo B1 dentro de los últimos 10 aminoácidos de la proteína de la cápside. En consecuencia, en algunas modalidades, una proteína de la cápside de AAV de no primates de la invención puede modificarse con una, pero menos de cinco, mutaciones puntuales dentro de los últimos 10 aminoácidos de la proteína de la cápside de manera que la proteína de la cápside de AAV comprenda un epítipo B1.

El término "células diana" incluye cualquiera de las células en las que se desea la expresión de un nucleótido de interés. Preferentemente, las células diana exhiben un receptor en su superficie que permite que la célula sea seleccionada como diana por un ligando de direccionamiento, tal como se describe a continuación.

- 5 El término "transducción" o "infección", o similares, se refieren a la introducción de un ácido nucleico en un núcleo de la célula diana mediante una partícula viral. El término eficiencia en relación con la transducción o similares, por ejemplo, "eficiencia de transducción" se refiere a la fracción (por ejemplo, porcentaje) de células que expresan un nucleótido de interés después de la incubación con un número establecido de partículas virales que comprenden el nucleótido de
10 interés. Los métodos bien conocidos para determinar la eficiencia de transducción incluyen la citometría de flujo de células transducidas con un gen reportero fluorescente, RT-PCR para determinar la expresión del nucleótido de interés, etc.

- Generalmente, la proteína de la cápside viral/cápside/partícula de "referencia" es idéntica a la proteína de la cápside viral/cápside/partícula de prueba, excepto por el cambio para el cual debe
15 analizarse el efecto. Por ejemplo, para determinar el efecto, por ejemplo, en la eficiencia de transducción, de insertar un primer miembro de un par de unión específica en una partícula viral de prueba, las eficiencias de transducción de la partícula viral de prueba (en ausencia o presencia de un ligando de direccionamiento adecuado) pueden compararse con las eficiencias de transducción de una partícula viral de referencia (en ausencia o presencia de un ligando de direccionamiento
20 apropiado si es necesario), que es idéntico a la partícula viral de referencia en cada caso (por ejemplo, mutaciones puntuales adicionales, nucleótido de interés, números de partículas virales y células diana, etc.), excepto por la presencia de un primer miembro de un par de unión específica. En algunas modalidades, una proteína de la cápside viral de referencia es aquella que puede formar una cápside con una segunda proteína de la cápside viral modificada para comprender al menos un
25 primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde la proteína de la cápside viral de referencia no comprende el primer miembro de un par de unión proteína: proteína, preferentemente en donde la cápside formada por la proteína de la cápside viral de referencia y la proteína de la cápside viral modificada es una cápside de mosaico.

Virus adenoasociados (AAV)

- 30 "AAV" es una abreviatura para el virus adenoasociado y puede usarse para hacer referencia al virus en sí mismo o derivados de este. Los AAV son pequeños virus de ADN de cadena simple, no envueltos. Generalmente, un genoma de AAV de tipo salvaje es de 4.7 kb y se caracteriza por dos

repeticiones terminales invertidas (ITR) y dos marcos abiertos de lectura (ORF), *rep* y *cap*. El marco de lectura *rep* de tipo salvaje codifica cuatro proteínas con peso molecular de 78 kD (“Rep78”), 68 kD (“Rep68”), 52 kD (“Rep52”) y 40 kD (“Rep 40”). Rep78 y Rep68 se transcriben a partir del promotor p5, y Rep52 y Rep40 se transcriben a partir del promotor p19. Estas proteínas funcionan principalmente en la regulación de la transcripción y la replicación del genoma de AAV. El marco de lectura de *cap* de tipo salvaje codifica tres proteínas virales (VP) estructurales (cápside) con pesos moleculares de 83-85 kD (VP1), 72-73 kD (VP2) y 61-62 kD (VP3). Más del 80 % de las proteínas totales en un virión de AAV (cápside) comprenden VP3; en los viriones maduros VP1, VP2 y VP3 se encuentran con una abundancia relativa de aproximadamente 1:1:10, aunque se han informado relaciones de 1:1:8. Padron y otros. (2005) J. Virology 79:5047-58.

Las secuencias genómicas de varios serotipos de AAV, así como también las secuencias de las repeticiones terminales invertidas naturales (ITR), proteínas Rep y subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Tales secuencias pueden encontrarse en la bibliografía o en bases de datos públicas tales como GenBank. Véase, por ejemplo, los números de acceso de GenBank NC_002077 (AAV1), AF063497 (AAV1), NC001401 (AAV-2), AF043303 (AAV2), NC_001729 (AAV3), NC_001829 (AAV4), U89790 (AAV4), NC_006152 (AAV5), AF513851 (AAV7), AF513852 (AAV8) y NC_006261 (AAV8); cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia para enseñar secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de AAV. Véase, además, por ejemplo, Srivistava y otros. (1983) J. Virology 45:555; Chiorini y otros. (1998) J. Virology 71:6823; Chiorini y otros. (1999) J. Virology 73:1309; Bantel-Schaal y otros. (1999) J. Virology 73:939; Xiao y otros. (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu y otros. (1996) Virology 221:208; Shade y otros, (1986) J. Virol. 58:921; Gao y otros. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 99:11854; Moris y otros. (2004) Virology 33:375-383; Solicitud de patente de EE. UU. 20170130245; solicitudes de patentes internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y la patente de EE.UU. núm. 6,156,303, que se incorporan en su totalidad a la presente como referencia. La Tabla 2 en la presente descripción proporciona las secuencias de varios AAV de no primate.

“AAV” abarca todos los subtipos y las formas de origen natural y modificadas, excepto cuando se requiera de cualquier otra manera. AAV incluye AAV de primate (por ejemplo, AAV tipo 1 (AAV1), AAV de primate tipo 2 (AAV2), AAV de primate tipo 3 (AAV3), AAV de primate tipo 4 (AAV4), AAV de primate tipo 5 (AAV5), AAV de primate tipo 6 (AAV6), AAV de primate tipo 7 (AAV7), AAV de primate tipo 8 (AAV8), AAV de animal no primate (por ejemplo, AAV de ave

(AAV)) y otros AAV de animal que no son primate tales como AAV de mamífero (por ejemplo, AAV de murciélago, AAV de lobo marino, AAV de bovino, AAV de canino, AAV de equino, AAV de caprino, AAV de ovino, etc.), AAV de escamosos (por ejemplo, AAV de serpiente, AAV de dragón barbudo), etc., AAV remoto, etc. "AAV de primate" se refiere a un AAV generalmente
5 aislado de primates. De manera similar, "AAV de animal no primate" se refiere a un AAV aislado de animales no primates. "AAV remoto", como se usa en la presente descripción, abarca:

El AAV aislado de animales primates o no primates generalmente, tiene un contacto limitado con la población humana general,

El AAV aislado de animales primates, por ejemplo, un AAV de primate, que comprende una
10 proteína de la cápside VP1 de tipo salvaje que comprende una secuencia de aminoácidos con menos del 99 %, por ejemplo, menos del 95 %, por ejemplo, menos del 90 %, por ejemplo, menos del 85 %, identidad de secuencia de aminoácidos con cada uno de los siguientes: la proteína de la cápside VP1 de AAV1, la proteína de la cápside VP1 de AAV2, la proteína de la cápside VP1 de AAV3, la proteína de la cápside VP1 de AAV4, la proteína de la cápside VP1 de AAV5, la
15 proteína de la cápside VP1 de AAV6, la proteína de la cápside VP1 de AAV7, la proteína de la cápside VP1 de AAV8, la proteína de la cápside VP1 de AAV9, la proteína de la cápside VP1 de AAV10, la proteína de la cápside VP1 de AAV11, la proteína de la cápside VP1 de AAV12 y la proteína de la cápside VP1 de AAV13 y/o

AAV aislado de animales que no son primate, por ejemplo, un AAV de animales que no son
20 primate, que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje que comprende una secuencia de aminoácidos con menos del 99 %, por ejemplo, menos del 95 %, por ejemplo, menos del 90 %, por ejemplo, menos del 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cada uno de los AAV enumerados en la tabla 2.

La seropositividad puede evaluarse mediante el uso de métodos bien conocidos. Por ejemplo, la
25 ausencia de presencia de IgG puede realizarse mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otros ensayos inmunitarios conocidos. Para detectar los anticuerpos neutralizantes, puede realizarse un ensayo de neutralización en el cual las partículas de AAV se incuban con cantidades crecientes (diluciones en serie) de (i) suero de un sujeto específico o suero mezclado de múltiples sujetos o (ii) inmunoglobulinas purificadas (IVIG o IgG) preparadas a partir
30 de una muestra individual o muestras de suero agrupadas (por ejemplo, de decenas a miles de donantes que representan una sección transversal de inmunoglobulinas en una población dada), seguido por detección de la infección celular, por ejemplo, al seguir la expresión de un gen

reportero (por ejemplo, un gen de luciferasa, GFP, etc). El nivel de infección se compara luego con el nivel en una muestra de control no expuesta al suero/IVIG/IgG. Véase, por ejemplo, el ejemplo 8. El título de neutralización puede definirse, por ejemplo, como la concentración de IVIG/IgG o el mayor factor de dilución de suero que da como resultado una inhibición del 50 % o mayor de la expresión del gen reportero en comparación con el control. En una modalidad, se considera que una dilución en suero en la que se observa más de 70 % de reducción de la cantidad de células infectadas en comparación con el control es positiva para la actividad neutralizante. Las interacciones con anticuerpos neutralizantes conocidos específicos pueden estudiarse, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de inmunotransferencia.

10 Tal como se usa en la presente descripción, “de un AAV [indicado]” en relación con un gen (por ejemplo, *rep*, *cap*, etc.), proteína de la cápside (por ejemplo, una proteína de la cápside VP1, una proteína de la cápside VP2, una proteína de la cápside VP3, etc), una región de una proteína de la cápside de un AAV indicado (por ejemplo, una región PLA₂, región VP1-u, región común VP1/VP2, región VP3), secuencia de nucleótidos (por ejemplo, secuencia de ITR), por ejemplo, un

15 gen *cap* o proteína de la cápside de AAV2, etc, abarca, además del gen o polipéptido, respectivamente, que comprende una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos establecida en la presente descripción para el AAV indicado, también variantes del gen o el polipéptido, que incluyen variantes que comprenden la menor cantidad de nucleótidos o aminoácidos necesarios para retener una o más funciones biológicas. Tal como se usa en la

20 presente descripción, un gen variante o un polipéptido variante comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos establecida en la presente descripción para el gen o polipéptido de un AAV indicado, en donde las una o más diferencias, generalmente, no alteran al menos una función biológica del gen o polipéptido, y/o la caracterización filogenética del gen o polipéptido, por

25 ejemplo, cuando las una o más diferencias pueden deberse a una degeneración del código genético, variaciones de aislamiento, longitud de la secuencia, etc. Por ejemplo, el gen *rep* y el gen *cap*, tal como se usan en la presente descripción, pueden abarcar los genes *rep* y *cap* que difieren del gen de tipo salvaje en que los genes pueden codificar una o más proteínas Rep y proteínas Cap, respectivamente. En algunas modalidades, un gen Rep codifica al menos Rep78 y/o Rep68. En

30 algunas modalidades, el gen *cap* incluye los que difieren del tipo salvaje en que se quitan uno o más codones iniciales alternativos o secuencias entre uno o más codones iniciales alternativos de modo que el gen *cap* solo codifique una única proteína Cap, por ejemplo, en donde los codones

iniciales de VP2 y/o VP3 se quitan o sustituyen de modo que el gen *cap* codifique una proteína de la cápside VP1 funcional, pero no una proteína de la cápside VP2 o una proteína de la cápside VP3. En consecuencia, tal como se usa en la presente descripción, un gen *rep* abarca cualquier secuencia que codifica una proteína Rep funcional. Un gen *cap* abarca cualquier secuencia que
5 codifica al menos un gen *cap* funcional.

Se sabe que el gen *cap* de tipo salvaje expresa las tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3 de un marco abierto de lectura simple del gen *cap* bajo el control de promotor p40 que se encuentra en el ORF de *rep*. El término "proteína de la cápside", "proteína Cap", y similares, incluyen una proteína que es parte de la cápside del virus. Para los virus adenoasociados, las proteínas de la
10 cápside, generalmente, se denominan VP1, VP2 y/o VP3, y pueden ser codificadas por un único gen *cap*. Para el AAV, las tres proteínas de la cápside de AAV se producen en la naturaleza de forma superpuesta a partir del uso del codón inicial de la traducción alternativo del ORF de *cap*, aunque las tres proteínas usan un codón de detención común. El ORF de un gen *cap* de tipo salvaje codifica, desde 5' a 3', tres codones iniciales alternativos: "el codón inicial de VP1", "el codón
15 inicial de VP2", y "el codón inicial de VP3"; y un "codón de detención común". La proteína viral más grande, VP1, es generalmente codificada desde el codón inicial de VP1 hasta el "codón de detención común." VP2 es generalmente codificada desde el codón inicial de VP2 hasta el codón de detención común. VP3 es generalmente codificada desde el codón inicial de VP3 hasta el codón de detención común. En consecuencia, VP1 comprende en su secuencia del extremo N, que no
20 comparte con VP2 o VP3, lo que se denomina la región única de VP1 (VP1-u). La región VP1-u generalmente es codificada por la secuencia de un gen *cap* de tipo salvaje que comienza desde el codón inicial de VP1 hasta el "codón inicial de VP2." VP1-u comprende un dominio de fosfolipasa A2 (PLA₂), que puede ser importante para la infección, así como también las señales de localización nuclear que pueden ayudar al virus a dirigirse al núcleo para desencadenar y liberar el
25 genoma. Las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 comparten la misma secuencia del extremo C que constituye la totalidad de VP3, que también puede denominarse en la presente descripción la región VP3. La región VP3 es codificada desde el codón inicial de VP3 hasta el codón de detención común. VP2 tiene ~ 60 aminoácidos adicionales que comparte con VP1. Esta región se denomina región común VP1/VP2.

30 En algunas modalidades, una o más de las proteínas Cap de la invención pueden codificarse por uno o más genes *cap* que tienen uno o más ORF. En algunas modalidades, las proteínas VP de la invención pueden expresarse a partir de más de un ORF que comprenden una secuencia de

nucleótidos que codifica cualquier combinación de VP1, VP2 y/o VP3 mediante el uso de secuencias de nucleótidos separadas enlazadas operativamente al menos a una secuencia de control de expresión para expresarse en células de empaquetamiento, donde cada una produce una o más de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 de la invención. En algunas modalidades, una proteína de la cápside VP de la invención puede expresarse individualmente a partir de un ORF que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de VP1, VP2 o VP3 mediante el uso de las secuencias de nucleótidos separadas enlazadas operativamente a una secuencia de control de expresión para expresarse en una célula de replicación viral, donde cada una produce solo una proteína de la cápside VP1, VP2 o VP3. En otra modalidad, las proteínas VP pueden expresarse a partir de un ORF que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 enlazadas operativamente al menos a una secuencia de control de expresión para expresarse en una célula de replicación viral, donde cada una produce una proteína de la cápside VP1, VP2 y VP3. En consecuencia, aunque las posiciones de aminoácidos proporcionadas en la presente descripción pueden proporcionarse en relación con la proteína de la cápside VP1 del AAV mencionado, un experto en la técnica podrá determinar respectivamente y fácilmente la posición de ese mismo aminoácido dentro de la proteína de la cápside VP2 y/o VP3 del AAV, y la posición correspondiente de los aminoácidos entre AAV diferentes.

La expresión “repetición terminal invertida” o “ITR” incluye las secuencias de ácido nucleico simétricas en el genoma de virus adenoasociados necesarias para una replicación eficiente. Las secuencias de ITR se ubican en cada extremo del genoma de ADN de AAV. Las ITR sirven como los orígenes de replicación para la síntesis de ADN viral y son componentes cis esenciales para generar partículas de AAV, por ejemplo, empaquetadas en partículas de AAV.

Las ITR de AAV comprenden sitios de reconocimiento para las proteínas de replicación Rep78 o Rep68. La región A"D" de la ITR comprende el sitio de mella del ADN donde la replicación del ADN se inicia y proporciona direccionalidad a la etapa de replicación de ácidos nucleicos. Una réplica de AAV en una célula de mamífero comprende, típicamente, dos secuencias de ITR.

Una sola ITR puede modificarse genéticamente con sitios de unión a Rep en ambas cadenas de las regiones “A” y dos regiones D simétricas en cada lado del palíndromo de la ITR. Tal construcción modificada genéticamente en una plantilla de ADN circular de doble hebra permite la replicación de ácido nucleico iniciada por Rep78 o Rep68 que avanza en ambas direcciones. Una sola ITR es suficiente para la replicación de AAV de una partícula circular. En los métodos para producir una

partícula viral de AAV de la invención, la secuencia de codificación de *rep* codifica una proteína Rep o un equivalente de proteína Rep que es capaz de unirse a una ITR comprendida en el plásmido de transferencia.

Las proteínas Cap de la invención, cuando son expresadas con proteínas Rep adecuadas por una célula de empaquetamiento, pueden encapsular un plásmido de transferencia que comprende un nucleótido de interés y un número par de dos o más secuencias de ITR. En algunas modalidades, un plásmido de transferencia comprende una secuencia de ITR. En algunas modalidades, un plásmido de transferencia comprende dos secuencias de ITR.

Rep78 y/o Rep68 se unen a sitios únicos y conocidos en la secuencia de la horquilla de ITR, y actúan para romper y desenrollar las estructuras de horquilla al final de un genoma de AAV, lo que proporciona de esta manera acceso a la maquinaria de replicación de la célula de replicación viral. Tal como se conoce, las proteínas Rep pueden expresarse a partir de más de un ORF que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica cualquier combinación de Rep78, Rep68, Rep 52 y/o Rep40, mediante el uso de secuencias de nucleótidos separadas enlazadas operativamente al menos a una secuencia de control de expresión para expresarse en una célula de replicación viral, donde cada una produce una o más proteínas Rep, Rep78, Rep68, Rep 52 y/o Rep40. De manera alternativa, las proteínas Rep pueden expresarse individualmente a partir de un ORF que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de Rep78, Rep68, Rep 52 o Rep40 mediante el uso de secuencias de nucleótidos separadas unidas operativamente a una secuencia de control de expresión para expresarse en una célula de empaquetamiento, donde cada una produce solo una proteína Rep, Rep78, Rep68, Rep 52 o Rep40. En otra modalidad, las proteínas Rep pueden expresarse a partir de un ORF que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas Rep, Rep78 y Rep52, enlazadas operativamente al menos a una secuencia de control de expresión para expresarse en una célula de replicación viral, donde cada una produce una proteína Rep, Rep78 y Rep52.

En un método de producción de un virión AAV, por ejemplo, una partícula viral, de la invención, una secuencia *rep* de codificación y un gen *cap* de la invención puede proporcionarse un único plásmido de empaquetamiento (véase, por ejemplo, la figura 1). Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que dicha condición no es necesaria. Tales partículas virales pueden o no incluir un genoma.

Una “proteína de la cápside quimérica de AAV” incluye una proteína de la cápside de AAV que comprende las secuencias de aminoácidos, por ejemplo, porciones de dos o más AAV diferentes y

que es capaz de formar y/o forma una cápside viral/partícula viral de AAV. Una proteína de la cápside quimérica de AAV es codificada por un gen de la cápside quimérico de AAV, por ejemplo, un nucleótido que comprende múltiples, por ejemplo, al menos dos, secuencias de ácidos nucleicos, cada una de ellas es idéntica a una porción de un gen de la cápside que codifica una proteína de la cápside de AAV diferentes, y que juntas codifican una proteína de la cápside quimérica funcional de AAV. La asociación de una proteína de la cápside quimérica con un AAV específico indica que la proteína de la cápside comprende una o más porciones de una proteína de la cápside de ese AAV y una o más porciones de una proteína de la cápside de un AAV diferente. Por ejemplo, una proteína de la cápside quimérica de AAV2 incluye una proteína de la cápside que comprende una o más porciones de una proteína de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2 y una o más porciones de una proteína de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 de un AAV diferente.

El término “porción” se refiere a al menos 5 aminoácidos o al menos 15 nucleótidos, pero menos que el polipéptido de longitud completa o la molécula de ácido nucleico, con 100 % de identidad con una secuencia de la que se deriva la porción, véase Penzes (2015) *J. General Virol.* 2769. Una “porción” abarca cualquier segmento contiguo de aminoácidos o nucleótidos suficiente para determinar que la forma de polipéptido o molécula de ácido nucleico de la que se deriva la porción es “de un AAV [especificado]” o tiene “identidad significativa” con un AAV particular, por ejemplo, un AAV de animal no primate o AAV remoto. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 5 aminoácidos o 15 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 10 aminoácidos o 30 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 15 aminoácidos o 45 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 20 aminoácidos o 60 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 25 aminoácidos o 75 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 30 aminoácidos o 90 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 35 aminoácidos o 105 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 40 aminoácidos o 120 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción

comprende al menos 45 aminoácidos o 135 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 50 aminoácidos o 150 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 60 aminoácidos o 180 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 70 aminoácidos o 210 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 80 aminoácidos o 240 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 90 aminoácidos o 270 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado. En algunas modalidades, una porción comprende al menos 100 aminoácidos o 300 nucleótidos con 100 % de identidad con una secuencia asociada con el AAV indicado.

Proteínas de la cápside del virus modificadas, partículas virales, ácidos nucleicos

En algunas modalidades, una proteína Cap de la invención, por ejemplo, una proteína de la cápside VP1 tal como se describe en la presente descripción, una proteína de la cápside VP2 tal como se describe en la presente descripción, y/o una proteína de la cápside VP3 tal como se describe en la presente descripción, se modifica para comprender, por ejemplo, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable, una mutación puntual, etc.

El quimerismo es un tipo de modificación tal como se describe en la presente descripción.

Generalmente, la modificación del gen o un polipéptido de un AAV indicado, o variantes de estos, da como resultado una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos que establece en la presente descripción para el AAV indicado, en donde la modificación altera, confiere, o elimina una o más funciones biológicas, pero no cambia la caracterización filogenética del gen o polipéptido. Una modificación puede incluir una inserción, por ejemplo, de un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y una mutación puntual, por ejemplo, de modo que el tropismo natural de la proteína de la cápside se reduzca hasta eliminarse y/o de modo que la proteína de la cápside comprenda una etiqueta detectable. Las modificaciones preferidas incluyen aquellas que no alteran y, preferentemente, disminuyen el reconocimiento bajo a nulo de la cápside modificada por parte de anticuerpos previamente existentes que se encuentran en la población general que se produjeron durante el curso de una infección con otro AAV, por ejemplo, infección con serotipos tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12,

AAV13, AAVDJ, Anc80L65, AAV2G9, AAV-LK03, viriones basados en dichos serotipos, viriones de modalidades de terapia génica de AAV usadas actualmente, o una de sus combinaciones. Otras modificaciones, tal como se describe en la presente descripción, incluyen la modificación de una proteína de la cápside de manera que comprenda un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable, etc., dichas modificaciones, generalmente, son causadas por modificaciones en el nivel genético, por ejemplo, mediante la modificación de un gen *cap*.

En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, es una cápside de mosaico, por ejemplo, comprende al menos dos conjuntos de proteínas VP1, VP2, y/o VP3, donde cada conjunto es codificado por un gen *cap* diferente. Una cápside de mosaico en la presente descripción se refiere generalmente a un mosaico de una primera proteína de la cápside viral modificada para comprender un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y una segunda proteína de la cápside viral correspondiente que carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína.

En relación con una cápside de mosaico, la segunda proteína de la cápside viral que carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína puede denominarse una proteína de la cápside de referencia codificada por un gen *cap* de referencia. En algunas modalidades de la cápside de mosaico, preferentemente cuando las proteínas de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 modificadas con un primer miembro del par de unión proteína: proteína no es una proteína de la cápside quimérica, una proteína de la cápside de referencia VP1, VP2 y/o VP3 puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteína de la cápside viral VP1, VP2 y/o VP3 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, excepto que la proteína de la cápside de referencia carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades de la cápside de mosaico, una proteína de la cápside de referencia VP1, VP2 y/o VP3 corresponde a la proteína de la cápside viral VP1, VP2 y/o VP3 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, excepto que la proteína de la cápside de referencia carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, una proteína de la cápside de referencia VP1 corresponde a la proteína de la cápside VP1 viral modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, excepto que la proteína de la cápside de referencia carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, una proteína de la cápside de referencia VP2 corresponde a la proteína de la cápside VP2 viral modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,

excepto que la proteína de la cápside de referencia carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, una proteína de la cápside de referencia VP3 corresponde a la proteína de la cápside VP3 viral modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, excepto que la proteína de la cápside de referencia carece del primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades de la cápside de mosaico que comprenden una proteína de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 quimérica modificada adicionalmente para comprender un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una proteína de referencia puede ser una proteína de la cápside correspondiente de la cual porciones de la misma forman parte de la proteína de la cápside quimérica. Como ejemplo no taxativo en algunas modalidades, la cápside de mosaico que comprende una proteína de la cápside de AAV2/AAAV VP1 quimérica modificada para comprender un primer miembro de un par de unión proteína: proteína puede comprender además como proteína de la cápside de referencia: una proteína de la cápside de AAV2 VP1 que carece del primer miembro, una proteína de la cápside AAAV VP1 que carece del primer miembro, una proteína quimérica de la cápside AAV2/AAAV VP1 que carece del primer miembro. De manera similar, en algunas modalidades, una cápside de mosaico que comprende una proteína de la cápside quimérica de AAV2/AAAV VP2 modificada para comprender un primer miembro de un par de unión proteína: proteína puede comprender, además, como una proteína de la cápside de referencia: una proteína de la cápside de AAV2 VP2 que carece del primer miembro, una proteína de la cápside de AAAV VP1 que carece del primer miembro, una proteína de la cápside de AAV2/AAAV VP2 que carece del primer miembro. En algunas modalidades, una cápside de mosaico que comprende una proteína de la cápside quimérica de AAV2/AAAV VP3 modificada para comprender un primer miembro de un par de unión proteína: proteína puede comprender, además, como una proteína de la cápside de referencia: una proteína de la cápside de AAV2 VP2 que carece del primer miembro, una proteína de la cápside de AAAV VP1 que carece del primer miembro, una proteína de la cápside de AAV2/AAAV VP3 que carece del primer miembro. En algunas modalidades de la cápside de mosaico, una proteína de la cápside de referencia puede ser cualquier proteína de la cápside siempre que carezca del primer miembro del par de unión proteína: proteína y sea capaz de formar una cápside con la primera proteína de la cápside modificada con el primer miembro de un par de unión proteína: proteína.

Generalmente las partículas de mosaico son generadas mediante la transfección de mezclas de los genes *Cap* modificados y de referencia en la producción de células en las relaciones indicadas. Las relaciones de subunidades de proteínas, por ejemplo, relaciones de proteína VP modificada:

proteína VP sin modificar, en la partícula pueden, pero no necesariamente, reflejar estequiométricamente las relaciones de al menos dos especies del gen *cap* que codifica la primera proteína de la cápside modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y uno o más genes *cap* de referencia, por ejemplo, gen *cap* modificado: genes *cap* de referencia transfectados en células de empaquetamiento. En algunas modalidades, las relaciones de subunidades de proteínas en la partícula no reflejan estequiométricamente la relación del gen *cap* modificado: genes *cap* de referencia transfectados en células de empaquetamiento.

En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas varía de aproximadamente 1:59 a aproximadamente 59:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la subunidad proteica es al menos aproximadamente 1:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 30 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 30 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:2 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 20 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 40 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 3:5. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:3 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 15 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 45 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:4 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 12 proteínas de la cápside modificadas y 48 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:5 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende 10 proteínas de la cápside modificadas y 50 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:6. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:7. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:8. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:9 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 6 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente

54 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:10. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:11 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 5 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 55 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:12. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:13. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:14 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 4 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 56 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:15. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:19 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 3 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 57 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:29 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 2 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 58 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 1:59. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 2:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 40 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 20 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 5:3. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 3:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 45 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 15 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 4:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 48 proteínas de la cápside modificadas y 12 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades

de proteínas es al menos aproximadamente 5:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende 50 proteínas de la cápside modificadas y 10 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 6:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 7:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 8: 1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 9:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 54 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 6 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 10:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 11:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 55 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 5 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 12:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 13:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 14:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 56 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 4 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 15:1. En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 19:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 57 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 3 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 29:1 (por ejemplo, la partícula viral de mosaico comprende aproximadamente 58 proteínas de la cápside modificadas y aproximadamente 2 proteínas de la cápside de referencia). En algunas modalidades de partículas virales de mosaico, la relación de subunidades de proteínas es al menos aproximadamente 59:1.

En algunas modalidades de partículas virales que no están de mosaico, la relación de subunidades de proteínas puede ser 1:0 en donde cada proteína de la cápside de la partícula viral que no está de

mosaico se modifica con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades de partículas virales que no están de mosaico, la relación de subunidades de proteínas puede ser 0:1 en donde cada proteína de la cápside de la partícula viral que no está de mosaico no está modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína.

- 5 En algunas modalidades, una proteína de la cápside de la invención se modifica para comprender una etiqueta detectable. Se conocen en la técnica muchas etiquetas detectables. (Véase, por ejemplo: Nilsson y otros. (1997) "Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of modified proteins" *Protein Expression and Purification* 11: 1-16, Terpe y otros. (2003) "Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems" *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:523-533, y sus referencias).
- 10 Las etiquetas detectables incluyen, de modo taxativo, una etiqueta detectable de polihistidina (por ejemplo, His-6, His-8 o His-10) que se une a cationes divalentes inmovilizados (por ejemplo, Ni^{2+}), un resto de biotina (por ejemplo, en una secuencia de polipéptidos biotinilados *in vivo*) que se une a la avidina inmovilizada, una secuencia GST (glutathión S-transferasa) que se une al glutatión
- 15 inmovilizado, una etiqueta S que se une a la proteína S inmovilizada, un antígeno que se une a un anticuerpo o dominio o fragmento de este inmovilizado (que incluye, por ejemplo, etiquetas T7, myc, FLAG y B que se unen a los anticuerpos correspondientes), una etiqueta FLASH (una etiqueta muy detectable que se acopla a restos específicos basados en arsénico), un receptor o dominio de receptor que se une a un ligando inmovilizado (o viceversa), proteína A o un derivado
- 20 de la misma (por ejemplo, Z) que se une a IgG inmovilizada, proteína de unión a maltosa (MBP) que se une a amilosa inmovilizada, una proteína de unión a albúmina que se une a la albúmina inmovilizada, un dominio de unión a quitina que se une a la quitina inmovilizada, un péptido de unión a calmodulina que se une a calmodulina inmovilizada y un dominio de unión a celulosa que se une a la celulosa inmovilizada. Otra etiqueta detectable ilustrativa es una etiqueta SNAP,
- 25 disponible comercialmente en Covalys (www.covalys.com). En algunas modalidades, una etiqueta detectable descrita en la presente descripción comprende una etiqueta detectable reconocida solo por un paratopo de anticuerpo. En algunas modalidades, una etiqueta detectable descrita en la presente descripción comprende una etiqueta detectable reconocida por un paratopo de anticuerpo y otros pares de unión específico.
- 30 En algunas modalidades, la etiqueta detectable forma un par de unión con un dominio constante de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la etiqueta detectable y/o la etiqueta detectable forma un par de unión con un ion metálico, por ejemplo, Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , etc. En algunas

modalidades, la etiqueta detectable se selecciona del grupo que consiste en estreptavidina, Strep II, HA, L14, 4C-RGD, LH y proteína A.

En algunas modalidades, la etiqueta detectable se selecciona del grupo que consiste en FLAG, HAYd c-myc (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 44). En algunas modalidades, la etiqueta detectable es c-myc (SEQ ID NO: 44).

En algunas modalidades, una etiqueta detectable es un epítipo de linfocitos B, por ejemplo, tiene una longitud de aproximadamente 1 aminoácido y aproximadamente 35 aminoácidos, y forma un par de unión con un parátipo de anticuerpo, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la etiqueta detectable comprende un epítipo B1 (SEQ ID NO: 45). En algunas modalidades, una proteína de la cápside se modifica para comprender un epítipo B1 en la región VP3.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de la invención comprende al menos un primer miembro de un par de unión de péptido: péptido.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de la invención comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína que comprende una etiqueta detectable, que también puede usarse para la detección y/o el aislamiento de la proteína Cap y/o como un primer miembro de un par de unión proteína: proteína. En algunas modalidades, una etiqueta detectable actúa como un primer miembro de un par de unión proteína: proteína para la unión de un ligando de direccionamiento que comprende una proteína de unión multiespecífica que puede unirse tanto a la etiqueta detectable como a una diana expresada por una célula de interés. En algunas modalidades, la proteína Cap de la invención comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína que comprende c-myc (SEQ ID NO: 44). El uso de una etiqueta detectable como un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se describe, por ejemplo, en el documento WO2019006043, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

En algunas modalidades, una proteína de la cápside comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, en donde el par de unión proteína: proteína forma un enlace isopeptídico covalente. En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión de péptido: péptido se une covalentemente a través de un enlace isopeptídico a un segundo miembro cognado del par de unión de péptido: péptido, y opcionalmente, en donde el segundo miembro cognado del par de unión de péptido: péptido se fusiona con un ligando de direccionamiento, dicho ligando de direccionamiento se une a una diana expresada por una célula de interés. En algunas modalidades, el par de unión proteína: proteína puede seleccionarse del grupo que consiste en SpyTag:

SpyCatcher, SpyTag002:SpyCatcher002, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin-C y SnoopTag: SnoopCatcher. En algunas modalidades, en donde el primer miembro es SpyTag (o una porción biológicamente activa de este) y la proteína (segundo miembro cognado) es SpyCatcher (o una porción biológicamente activa de esta). En algunas modalidades, en donde el primer miembro es SpyTag (o una porción biológicamente activa de este) y la proteína (segundo miembro cognado) es KTag (o una porción biológicamente activa de esta). En algunas modalidades, en donde el primer miembro es KTag (o una porción biológicamente activa de este) y la proteína (segundo miembro cognado) es SpyTag (o una porción biológicamente activa de esta). En algunas modalidades, en donde el primer miembro es SnoopTag (o una porción biológicamente activa de este) y la proteína (segundo miembro cognado) es SnoopCatcher (o una porción biológicamente activa de esta). En algunas modalidades, en donde el primer miembro es Isopeptag (o una porción biológicamente activa de este) y la proteína (segundo miembro cognado) es Pilin-C (o una porción biológicamente activa de esta). En algunas modalidades, en donde el primer miembro es SpyTag002 (o una porción biológicamente activa de este) y la proteína (segundo miembro cognado) es SpyCatcher002 (o una porción biológicamente activa de esta). En algunas modalidades, una proteína Cap de la invención comprende un SpyTag. El uso de un primer miembro de un par de unión proteína: proteína se describe en el documento WO2019006046, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad.

En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable se enlaza operativamente a (se traduce en marco con, se une químicamente a, y/o es presentada por) una proteína Cap de la invención a través de un primer o segundo enlazador, por ejemplo, un espaciador de aminoácido, que tiene al menos un aminoácido de longitud. En algunas modalidades, un primer miembro de un par de unión proteína: proteína está flanqueado por un primer y/o un segundo enlazador, por ejemplo, un primer y/o un segundo espaciador de aminoácidos, cada uno de dichos separadores tiene al menos un aminoácido de longitud.

En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador no son idénticos. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno o dos aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos o tres aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres o cuatro aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de longitud. En algunas

modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tienen independientemente uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada uno del primer y/o segundo enlazador tiene independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en secuencia y/o en longitud y cada uno tiene un aminoácido de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene un aminoácido de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene dos aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene tres aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene cuatro aminoácidos de longitud, por ejemplo, el enlazador es GLSG (SEQ ID NO: 37). En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene cinco aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene seis aminoácidos de longitud, por ejemplo, el primer y segundo enlazador comprenden una secuencia de GLSGSG (SEQ ID NO: 38). En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene siete aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene ocho aminoácidos de longitud, por ejemplo, cada uno del primer y segundo enlazador comprende una secuencia de GLSGLSGS (SEQ ID NO: 39). En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene nueve aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene diez aminoácidos de longitud, por ejemplo, el primer y segundo enlazador comprenden una secuencia de

GLSGLSGLSG (SEQ ID NO: 40) o GLSGGSGLSG (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el primer y segundo enlazador son idénticos en longitud y cada uno tiene más de diez aminoácidos de longitud.

Generalmente, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tal como se describe en la presente descripción, por ejemplo, que comprende un primer miembro de un par de unión específica por sí mismo o en combinación con uno o más enlazadores, tiene entre alrededor de 5 aminoácidos a alrededor de 50 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene al menos 5 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 6 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 7 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 8 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 9 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 10 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 11 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 12 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 13 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 14 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 15 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 16 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 17 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 18 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 19 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 20 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de

[illegible]

longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 43 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 44 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 45 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 46 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 47 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 48 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 49 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos del primer miembro de un par de unión proteína: proteína tiene 50 aminoácidos de longitud.

Debido a la gran conservación de al menos las extensiones largas y el miembro largo de los miembros de la familia estrechamente relacionados, los sitios de inserción correspondientes para AAV distintos de los AAV enumerados pueden identificarse al realizar un alineamiento de aminoácidos o mediante la comparación de las estructuras de la cápside. Véase, por ejemplo, Rutledge y otros. (1998) *J. Virol.* 72:309-19; Mietzsch y otros. (2019) *Viruses* 11, 362, 1-34, y la patente de EE. UU. núm. 9,624,274 para alineamientos ilustrativos de las proteínas de la cápside de AAV diferentes, cada uno de los cuales se incorporan en la presente descripción en su totalidad como referencia. Por ejemplo, Mietzsch y otros (2019) proporcionan una superposición de cintas de diferentes dependoparvovirus en la figura 7, que representan las regiones variables de VR I a VR IX. Mediante el uso de dicho análisis estructural, tal como se describe allí, y el análisis de secuencias un experto en la técnica puede determinar qué aminoácidos dentro de la región variable corresponden a la secuencia de aminoácidos del AAV que puede incorporar la inserción de un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable.

En consecuencia, en algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o la etiqueta detectable se inserta en una proteína de la cápside VP1 de un AAV de animal no primate después de una posición de aminoácido que se corresponde con una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en G453 de la proteína de la cápside VP1 de AAV2, N587 de la proteína de la cápside VP1 de AAV2, G453 de la proteína de la cápside VP1 de AAV9 y A589 de la proteína de la cápside VP1 de AAV9. En algunas modalidades, el primer

miembro de un par de unión proteína: proteína y/o la etiqueta detectable se inserta en una proteína de la cápside VP1 de un AAV de animal no primate entre los aminoácidos que se corresponden con N587 y R588 de una cápside VP1 de AAV2. Los sitios de inserción adecuados adicionales de una proteína de la cápside VP1 de animal no primate incluyen los correspondientes a I-1, I-34, I-138, I-139, I-161, I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-459, I-471, I-520, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713 e I-716 de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 (Wu y otros. (2000) *J. Virol.* 74:8635-8647). Una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, puede ser una proteína de la cápside de animal no primate que comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable que se inserta en una posición que se corresponde con una posición de una proteína de la cápside de AAV2 seleccionada del grupo que consiste en I-1, I-34, I-138, I-139, I-161, I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-459, I-471, I-520, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713, I-716 y una de sus combinaciones. Los sitios de inserción adecuados adicionales de un AAV de animal no primate incluyen aquellos correspondientes a I-587 de AAV1, I-589 de AAV1, I-585 de AAV3, I-585 de AAV4 e I-585 de AAV5. En algunas modalidades, una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, puede ser una proteína de la cápside de animal no primate que comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable que se inserta en una posición que se corresponde con una posición seleccionada del grupo que consiste en I-587 (AAV1), I-589 (AAV1), I-585 (AAV3), I-585 (AAV4), I-585 (AAV5) y una de sus combinaciones.

En algunas modalidades, el primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable que se inserta en una proteína de la cápside VP1 de AAV de animal no primate después de una posición de aminoácido que se corresponde con una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en I444 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de ave, I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de ave, I573 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de dragón barbudo, I436 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de dragón barbudo, I429 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I430 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I431 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I432 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I433 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I434 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I436 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino, I437 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino e I565 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de lobo marino.

La nomenclatura I-####, I#, o similares, en la presente descripción se refiere al sitio de inserción (I) con #### que nombra el número de aminoácidos con respecto a la proteína VP1 de una proteína de la cápside de AAV, sin embargo, tal inserción puede ubicarse directamente en el extremo N o C, preferentemente en el extremo C de un aminoácido en la secuencia de 5 aminoácidos del extremo N o C del aminoácido dado, preferentemente 3, con mayor preferencia 2, especialmente 1 aminoácido en el extremo N o C del aminoácido dado. Adicionalmente, las posiciones referidas en la presente descripción se relacionan con la proteína VP1 codificada por un gen de la cápside de AAV, y las posiciones correspondientes (y las mutaciones puntuales de estas) pueden identificarse fácilmente para las proteínas de la cápside VP2 y VP3 codificadas por el gen de la cápside al realizar un alineamiento de secuencias de las proteínas VP1, VP2 y VP3 codificadas por el gen de la cápside de AAV adecuado.

En consecuencia, una inserción en la posición correspondiente del ácido nucleico codificante de uno de estos sitios del gen cap conduce a una inserción en VP1, VP2 y/o VP3, ya que las proteínas de la cápside son codificadas por marcos de lectura superpuestos del mismo gen con codones iniciales escalonados. Por lo tanto, para AAV2, por ejemplo, de acuerdo con esta nomenclatura las inserciones entre los aminoácidos 1 y 138 se insertan solamente en VP1, las inserciones entre 138 y 203 se insertan en VP1 y VP2, y las inserciones entre 203 y el extremo C se insertan en VP1, VP2 y VP3, que también es, por supuesto, el caso para el sitio de inserción I-587. Por lo tanto, la presente invención abarca los genes estructurales de AAV con inserciones correspondientes en las proteínas VP1, VP2 y/o VP3.

En la presente descripción también se proporcionan los ácidos nucleicos que codifican una proteína de la cápside VP3 de la invención. Las proteínas de la cápside de AAV pueden ser, pero no necesariamente, codificadas por marcos de lectura superpuestos del mismo gen con codones iniciales escalonados. En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside VP3 de la invención no codifica también una proteína de la cápside VP2 o una proteína de la cápside VP1 de la invención. En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside VP3 de la invención puede codificar también una proteína de la cápside VP2 de la invención, pero no codifica también una cápside VP1 de la invención. En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside VP3 de la invención puede codificar también una proteína de la cápside VP2 de la invención y una cápside VP1 de la invención.

En algunas modalidades, una cápside viral que comprende la proteína de la cápside viral modificada que comprende el primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, en donde el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, comprende una proteína de unión multiespecífica, etc.) es capaz de infectar una
5 células específica, por ejemplo, tiene una capacidad potenciada de dirigirse y unirse a una célula específica, en comparación con una cápside viral de control que es idéntica a la proteína de la cápside viral modificada, excepto por que carece de uno o ambos del primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína, por ejemplo, comprende una proteína de la cápside de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral
10 modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción detectable en comparación con la eficiencia de transducción no detectable de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente
15 descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 10 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína
20 enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 20 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de
25 transducción que es 30 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de
30 transducción que es 40 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de

direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 50 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado

5 enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 60 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de

10 transducción que es 70 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 75 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside

15 viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 80 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que

20 comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 85 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de

25 transducción que es 90 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de

30 unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 95 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la

cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 99 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control.

- 5 En algunas modalidades, una cápside viral que comprende la proteína de la cápside viral modificada que comprende el primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, en donde el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, comprende una proteína de unión multiespecífica, etc.) es capaz de infectar una células específica, por ejemplo, tiene una capacidad potenciada de dirigirse y unirse a una célula
- 10 específica, en comparación con una cápside viral de control que es idéntica a la proteína de la cápside viral modificada, excepto por que carece de uno o ambos del primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína, por ejemplo, comprende una proteína de la cápside de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro
- 15 de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción detectable en comparación con la eficiencia de transducción no detectable de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado
- 20 a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 10 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 20 %
- 25 mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 30 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control.
- 30 En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta

una eficiencia de transducción que es 40 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 50 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 60 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 70 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 75 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 80 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 85 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 90 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada,

tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína adecuado enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 95 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es 99 % mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 1.5 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 2 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 3 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 4 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 5 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una

eficiencia de transducción que es al menos 6 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 7 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 8 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 9 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 10 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 20 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro apropiado de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 30 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 40 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside

viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 50 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 60 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 70 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 80 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 90 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una cápside viral que comprende una proteína de la cápside viral modificada, tal como se describe en la presente descripción, unida al primer y el segundo miembro de un par de unión proteína: proteína enlazado a un ligando de direccionamiento presenta una eficiencia de transducción que es al menos 100 veces mayor que la eficiencia de transducción de una cápside viral de control. En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, y, opcionalmente, comprende un primer y un segundo miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, en donde el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, comprende una proteína de unión multiespecífica, etc.) es más capaz de evitar la neutralización por parte de anticuerpos previamente existentes en el suero aislado de un paciente

humano, en comparación con una partícula viral de control adecuada (por ejemplo, que comprende una cápside viral de un serotipo de AAV del cual una porción se incluye en la cápside vital de la invención, por ejemplo, como parte de la proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones), que, opcionalmente, también comprende un primer y un segundo miembro de un par de unión proteína: proteína (por ejemplo, en donde el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, comprende una proteína de unión multiespecífica, etc.). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 2 veces más de IVIG o IgG total para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 2 veces con respecto al de una partícula viral de control).

En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 3 veces más de IVIG o IgG total para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 3 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 4 veces más de IVIG o IgG total para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 4 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 5 veces más de IVIG o IgG total para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor

de IC50 que es al menos 5 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 6 veces más de IVIG o IgG total para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 6 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 7 veces más de IVIG o IgG total para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 7 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 8 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 8 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 9 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 9 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 10 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 10 veces con respecto al de una partícula viral de

control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 20 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 20 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 30 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 30 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 40 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 40 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 50 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 50 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 60 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 60 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que

comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 70 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 70 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 80 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 80 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 90 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 90 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, requiere al menos 100 veces más de IVIG total o IgG para la neutralización (por ejemplo, 50 % o más de inhibición de la infección) en comparación con una partícula viral de control apropiada (por ejemplo, una partícula viral de la invención tiene un valor de IC50 que es al menos 100 veces con respecto al de una partícula viral de control). En algunas modalidades, una partícula viral de la invención que comprende una proteína de la cápside viral que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones, tiene una IC50 no detectable cuando se incubaba con un grupo Ig de suero humano de al menos 100; 10,000; 20,000; 30,000; 40,000; 50,000; o más donantes humanos.

Ligandos de direccionamiento

Una partícula viral descrita en la presente descripción puede comprender, además, un ligando de direccionamiento.

En algunas modalidades de la invención que comprenden una etiqueta detectable, un ligando de direccionamiento comprende una molécula de unión multiespecífica que comprende (i) un parátipo de anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta detectable y (ii) un segundo dominio de unión que se une específicamente a un receptor, que puede conjugarse con la superficie de una perla (por ejemplo, para purificación) o ser expresado por una célula diana. En consecuencia, una molécula de unión multiespecífica comprende (i) un parátipo de anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta detectable y (ii) un segundo dominio de unión que se une específicamente a un receptor que se dirige a la partícula viral. Tal “direccionamiento” o “dirección” puede incluir un escenario en el que la partícula viral de tipo salvaje se dirige a varias células dentro de un tejido y/o varios órganos dentro de un organismo, cuyo direccionamiento amplio del tejido o los órganos se reduce hasta suprimirse mediante la inserción de la etiqueta detectable, y cuyo redireccionamiento a células más específicas en el tejido u órganos más específicos en el organismo se logra con la molécula de unión multiespecífica. Tal redireccionamiento o redirección puede incluir, además, un escenario en el que la partícula viral de tipo salvaje se dirige a un tejido, cuyo direccionamiento del tejido se reduce hasta suprimirse mediante la inserción de la etiqueta detectable, y cuyo redireccionamiento a un tejido completamente diferente se logra con la molécula de unión multiespecífica. Un parátipo de anticuerpo, tal como se describe en la presente descripción, comprende generalmente como mínimo una región determinante de la complementariedad (CDR) que reconoce específicamente la etiqueta detectable, por ejemplo, una región CDR3 de un dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. En algunas modalidades, una molécula de unión multiespecífica, comprende un anticuerpo (o una porción de este) que comprende el parátipo de anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta detectable. Por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, puede comprender una región variable de la cadena pesada de dominio único o una región variable de la cadena ligera de dominio único, en donde la región variable de la cadena pesada de dominio único o la región variable de la cadena ligera de dominio único comprende un parátipo de anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta detectable. En algunas modalidades, una molécula de unión multiespecífica puede comprender una región Fv, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica puede comprender un scFv, que comprende un parátipo de anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta detectable. En algunas modalidades, una molécula de unión multiespecífica, tal como se describe en la presente descripción, comprende un parátipo de anticuerpo que se une específicamente a c-myc (SEQ ID NO: 44).

Una modalidad de la presente invención es una estructura multimérica que comprende una proteína de la cápside viral modificada de la presente invención. Una estructura multimérica comprende al menos 5, preferentemente, al menos 10, con mayor preferencia, al menos 30, con la máxima preferencia, al menos 60 proteínas de la cápside viral modificadas, que comprenden un primer miembro de un par de unión específica, tal como se describe en la presente descripción. Pueden formar cápsides virales regulares (partículas virales vacías) o partículas virales (cápsides que encapsulan un nucleótido de interés). La formación de partículas virales que comprenden un genoma viral es una característica altamente preferida para el uso de las cápsides virales modificadas descritas en la presente descripción.

Una modalidad adicional de la presente invención es el uso de al menos una proteína de la cápside viral y/o un ácido nucleico que la codifica, preferentemente, al menos una estructura multimérica (por ejemplo, partícula viral) para la fabricación y el uso en la transferencia de un nucleótido de interés en una célula diana.

Métodos de uso y elaboración

Una modalidad adicional de las proteínas de la cápside viral modificadas descritas en la presente descripción es su uso para suministrar un nucleótido de interés, por ejemplo, un gen reportero o un gen terapéutico, a una célula diana. Generalmente, un nucleótido de interés puede ser un plásmido de transferencia, que generalmente puede comprender las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 5' y 3' que flanquean el gen o genes reporteros o gen terapéutico (que pueden estar bajo el control de un promotor viral o no viral, cuando se abarca dentro de una partícula de AAV. En una modalidad, un nucleótido de interés es un plásmido de transferencia que comprende de 5' a 3': una 5' ITR, un promotor, un gen (por ejemplo, un gen reportero y/o terapéutico) y una 3' ITR.

Los ejemplos no taxativos de promotores útiles incluyen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus de formación de focos del bazo (SFFV), el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1a) (el promotor de EF1a de 1.2 kb o el promotor de EF1a de 0.2 kb), el promotor de EF 1 quimérica α /IF4, y el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK). Un potenciador interno también puede estar presente en la construcción viral para aumentar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, puede usarse el potenciador de CMV (Karasuyama y otros. 1989. J. Exp. Med. 169:13, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, el potenciador de CMV puede usarse en combinación con el promotor de β -actina de pollo.

Una variedad de genes reporteros (o restos detectables) pueden encapsularse en una estructura multimérica que comprende las proteínas de la cápside viral modificadas descritas en la presente descripción. Los genes reporteros ilustrativos incluyen, por ejemplo, β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*), proteín plásmido pRep2 Cap AAV2 VP1 de dragón barbudo VP2 VP3, que comprende el gen rep de AAV2 y un gen cap quimérico que codifica una proteína de la cápside VP1 quimérica que comprende la región VP1-u de AAV2 enlazada operativamente con la región común VP1/Vna fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), MmGFP, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina, o una de sus combinaciones. Los métodos descritos en la presente descripción demuestran la construcción de partículas de direccionamiento que emplean el uso de un gen reportero que codifica la proteína fluorescente verde, sin embargo, tras la lectura de esta descripción los expertos en la técnica comprenderán que las cápsides virales descritas en la presente descripción pueden generarse en ausencia de un gen reportero o con cualquier gen reportero conocido en la técnica.

Una variedad de genes terapéuticos también puede encapsularse en una estructura multimérica que comprende las proteínas de la cápside viral modificadas descritas en la presente descripción, por ejemplo, como parte de una partícula de transferencia. Los ejemplos no taxativos de un gen terapéutico incluyen los que codifican una toxina (por ejemplo, un gen suicida), un anticuerpo terapéutico o fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas o porción(ones) de estos, ARN antisentido, ARNip, ARNhp, etc.

Una modalidad adicional de la presente invención es un proceso para la preparación de una proteína de la cápside modificada, el método comprende las etapas de:

- a) expresar un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside modificada en condiciones adecuadas, y
- b) aislar la proteína de la cápside expresada de la etapa a).

En algunas modalidades, una partícula viral, tal como se describe en la presente descripción, comprende una cápside de mosaico, por ejemplo, una cápside que comprende proteínas de la cápside modificadas genéticamente, tal como se describe en la presente descripción (en ausencia o presencia de un enlace covalente con un ligando de direccionamiento) en una determinada relación

con las proteínas de la cápside de referencia. Un método para elaborar tal partícula viral de mosaico comprende

- a) expresar un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside modificada y un nucleótido que codifica una proteína de la cápside de referencia en una relación (peso/peso) de al menos aproximadamente 60:1 a aproximadamente 1:60, por ejemplo, 2:1, 1:1, 3:5, 1:2, 1:3, etc. bajo condiciones adecuadas, y
- b) aislar la proteína de la cápside expresada de la etapa a).

En algunas modalidades, una composición descrita en la presente descripción comprende, o un método descrito en la presente descripción combina, un gen *cap* modificado: gen *cap* de referencia (o combinación genes *cap* de referencia) en una relación que varía de al menos aproximadamente 1:60 a aproximadamente 60:1, por ejemplo, 2:1, 1:1, 3:5, 1:2, 1:3, etc. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:2. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:3. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:4. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:5. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:6. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:7. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:8. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:9. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:10. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:11. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:12. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:13. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:14. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:15. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:16. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:17. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:18. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:19. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:20. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:25. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:30. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:35. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:40. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:45. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:50. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:55. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 1:60. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 2:1. En algunas modalidades, la

relación es al menos aproximadamente 3:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 4:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 5:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 6:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 7:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 8:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 9:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 10:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 11:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 12:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 13:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 14:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 15:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 16:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 17:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 18:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 19:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 20:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 25:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 30:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 35:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 40:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 45:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 55:1. En algunas modalidades, la relación es al menos aproximadamente 60:1.

En algunas modalidades, las proporciones de subunidades de proteínas VP en la partícula viral de mosaico pueden, pero no necesariamente, reflejar estequiométricamente las proporciones del gen *gorra* modificado: gen *cap* de referencia. Como una modalidad ilustrativa no taxativo, puede considerarse que una cápside de mosaico formada de acuerdo con el método, pero no necesariamente, tiene una relación de proteína de la cápside modificada: proteína de la cápside de referencia similar a la relación (peso: peso) de los ácidos nucleicos que la codifican usada para producir la cápside de mosaico. En algunas modalidades, una cápside de mosaico comprende una relación de subunidades de proteínas de aproximadamente 1:59 a aproximadamente 59:1.

Las modalidades adicionales de la presente invención son un método para alterar el tropismo de un virus, el método comprende las etapas de: (a) insertar un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de la cápside viral para formar una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside genéticamente

modificada que comprende la secuencia de aminoácidos y/o (b) cultivar una célula de empaquetamiento en condiciones suficientes para la producción de partículas virales, en donde la célula de empaquetamiento comprende el ácido nucleico. Una modalidad adicional de la presente invención es un método para mostrar un ligando de direccionamiento en la superficie de una

5 proteína de la cápside, el método comprende las etapas de: (a) expresar un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside viral, tal como se describe en la presente descripción, (y opcionalmente con un nucleótido que codifica una proteína de la cápside de referencia) en condiciones adecuadas, en donde el ácido nucleico codifica una proteína de la cápside que comprende un primer miembro de un par de unión específica, (b) aislar la proteína de la cápside

10 expresada que comprende un primer miembro de un par de unión específica de la etapa (a) o la cápside que la comprende, y (c) incubar la proteína de la cápside o la cápside con un segundo miembro cognado del par de unión específica en condiciones adecuadas para permitir la formación de un enlace isopeptídico entre el primer y el segundo miembro, en donde el segundo miembro cognado del par de unión específica está fusionado con un ligando de direccionamiento.

15 En algunas modalidades, la célula de empaquetamiento comprende además un plásmido auxiliar y/o un plásmido de transferencia que comprende un nucleótido de interés. En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, aislar las partículas virales adenoasociadas autocomplementarias del sobrenadante de cultivo. En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, lisar la célula de empaquetamiento y aislar las partículas virales

20 adenoasociadas de cadena simple del lisado celular. En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, (a) limpiar los desechos celulares, (b) tratar el sobrenadante que contiene las partículas virales con nucleasas, por ejemplo, DNasa I y $MgCl_2$, (c) concentrar las partículas virales, (d) purificar las partículas virales, y (e) cualquier combinación de (a)-(d).

Las células de empaquetamiento útiles para la producción de las partículas virales descritas en la

25 presente descripción incluyen, por ejemplo, células animales permisivas para el virus, o células modificadas para que sean permisivas al virus; o la construcción de células de empaquetamiento, por ejemplo, con el uso de un agente de transformación tal como fosfato de calcio. Los ejemplos no taxativos de las líneas celulares de empaquetamiento útiles para producir las partículas virales descritas en la presente descripción incluyen, por ejemplo, células embrionarias de riñón humano

30 293 (HEK-293) (por ejemplo, Colección Americana de Cultivos Tipo [ATCC] núm. CRL-1573), células HEK-293 que contienen el antígeno T grande SV40 (HEK-293T o 293T), células HEK293T/17, línea celular de sarcoma humano HT-1080 (CCL-121), línea celular similar a

linfoblastos Raji (CCL-86), línea celular tipo epitelio de astrocitoma-glioblastoma U87-MG (HTB-14), línea celular de linfoma T HuT78 (TIB-161), células NIH/3T3, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, ATCC núm. CRL9618, CCL61, CRL9096), células HeLa (por ejemplo, ATCC núm. CCL-2), células Vero, células NIH 3T3 (por ejemplo, ATCC núm. CRL-1658), células Huh-7, células BHK (por ejemplo, ATCC núm. CCL10), células PC12 (ATCC núm. CRL1721), células COS, células COS-7 (ATCC núm. CRL1651), células RATI, células L de ratón (ATCC núm. CCLI.3), células HLHepG2, células CAP, células CAP-T y similares.

Las células L929, el sistema de células de empaquetamiento viral FLY descrito en Cosset y otros (1995) J Virol 69,7430-7436, células NS0 (mieloma murino), células amniocíticas humanas (por ejemplo, CAP, CAP-T), células de levadura (que incluyen, de modo no taxativo, *S. cerevisiae*, *Picia pastoris*), células vegetales (que incluyen, de modo no taxativo, Tabaco NTI, BY-2), células de insectos (que incluyen, de modo no taxativo a, SF9, S2, SF21, Tni (por ejemplo, High 5)) o células bacterianas (que incluyen, de modo no taxativo, *E. coli*).

Para sistemas y células de empaquetamiento adicionales, las técnicas y partículas de empaquetamiento para empaquetar el genoma de ácido nucleico en la partícula viral pseudotipada véase, por ejemplo, Polo, y otros. Proc Natl Acad Sci USA, (1999) 96:4598-4603. Los métodos de empaquetamiento incluyen el uso de células de empaquetamiento que expresan permanentemente los componentes virales, o la transfección transitoria de las células con plásmidos.

Las modalidades adicionales incluyen métodos de redireccionamiento de un virus y/o suministrar un gen reportero o gen terapéutico a una célula diana, el método comprende un método para transducir células *in vitro* (por ejemplo, *ex vivo*) o *in vivo*, el método comprende las etapas de: poner en contacto la célula diana con una partícula viral que comprende una cápside descrita en la presente descripción, en donde la cápside comprende un ligando de direccionamiento que se une específicamente a un receptor expresado por la células diana. En algunas modalidades, la célula diana se encuentra *in vitro* (por ejemplo, *ex vivo*). En otras modalidades, la célula diana se encuentra *in vivo* en un sujeto, por ejemplo, un ser humano.

Células diana

Una amplia variedad de células puede seleccionarse como diana para suministrar un nucleótido de interés mediante el uso de una partícula viral modificada, tal como se describe en la presente descripción. Las células diana generalmente se seleccionarán en base al nucleótido de interés y el efecto deseado.

En algunas modalidades, un nucleótido de interés puede suministrarse para permitir que una célula diana produzca una proteína que constituye una deficiencia en un organismo, tal como una deficiencia enzimática, o deficiencia inmunitaria, tal como una inmunodeficiencia combinada grave ligada a X. Por lo tanto, en algunas modalidades, se seleccionan como diana las células que normalmente producirían la proteína en el animal. En otras modalidades, se seleccionan como diana las células en el área en la que una proteína sería más beneficiosa.

En otras modalidades, un nucleótido de interés, tal como un gen que codifica un ARNip, puede inhibir la expresión de un gen particular en una célula diana. El nucleótido de interés puede, por ejemplo, inhibir la expresión de un gen implicado en un ciclo de vida del patógeno. Por lo tanto, las células susceptibles a la infección por el patógeno o infectadas con el patógeno pueden ser atacadas. En otras modalidades, un nucleótido de interés puede inhibir la expresión de un gen responsable de la producción de una toxina en una célula diana.

En otras modalidades, un nucleótido de interés puede codificar una proteína tóxica que destruye las células en las que se expresa. En este caso, pueden seleccionarse como diana las células tumorales u otras células no deseadas.

Aún en otras modalidades, un nucleótido de interés codifica una proteína terapéutica.

Una vez que se identifica una población particular de células diana en la que se desea la expresión de un nucleótido de interés, se selecciona un receptor diana que se expresa específicamente en esa población de células diana. El receptor diana puede expresarse exclusivamente en esa población de células o en mayor medida en esa población de células que en otras poblaciones de células. Mientras más específica sea la expresión, el suministro puede dirigirse más específicamente a las células diana. En dependencia del contexto, la cantidad deseada de especificidad del marcador (y por lo tanto del suministro de genes) puede variar. Por ejemplo, para la introducción de un gen tóxico, se prefiere una alta especificidad para evitar la destrucción de células no seleccionadas como diana. Para la expresión de una proteína para el cultivo, o la expresión de un producto secretado donde se desea un impacto global, puede necesitarse menos especificidad de marcador.

Como se analizó anteriormente, el receptor diana puede ser cualquier receptor para el que puede identificarse o crearse un ligando de direccionamiento. Preferentemente, el receptor diana es un péptido o polipéptido, tal como un receptor. Sin embargo, en otras modalidades el receptor diana puede ser un carbohidrato u otra molécula que puede ser reconocida por una pareja de unión. Si una pareja de unión, por ejemplo, ligando, para el receptor diana ya se conoce, este puede usarse como la molécula de afinidad. Sin embargo, si no se conoce una molécula de unión, los

anticuerpos contra el receptor diana pueden generarse mediante el uso de procedimientos estándar. Los anticuerpos pueden usarse después como un ligando de direccionamiento.

Por lo tanto, las células diana pueden seleccionarse en función de una variedad de factores, que incluyen, por ejemplo, (1) la aplicación particular (por ejemplo, terapia, expresión de una proteína a recolectar y conferir resistencia a la enfermedad) y (2) la expresión de un marcador con la cantidad deseada de especificidad.

Las células diana no se limitan de ninguna manera e incluyen líneas celulares y células de la línea germinal, y líneas celulares y células somáticas. Las células diana pueden ser células madre derivadas de cualquier origen. Cuando las células diana son células de la línea germinal, las células diana se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en embriones de células individuales y células madre embrionarias (ES).

Composiciones farmacéuticas, formas de dosificación y administración

Una modalidad adicional proporciona un medicamento que comprende al menos una proteína de la cápside viral modificada y un ligando de direccionamiento apropiado de acuerdo con esta invención y/o un ácido nucleico de acuerdo con esta invención. Preferentemente, dicho medicamento es útil como una partícula de transferencia de genes.

En la presente descripción también se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas virales descritas en la presente descripción y un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, en la presente descripción se describen las formas de dosificación farmacéuticas que comprenden la partícula viral descrita en la presente descripción.

Como se describe en la presente descripción, las partículas virales descritas en la presente descripción pueden usarse para varias aplicaciones terapéuticas (in vivo y ex vivo) y como herramientas de investigación.

Las composiciones farmacéuticas basadas en las partículas virales descritas en la presente descripción pueden formularse de cualquier manera convencional mediante el uso de uno o más portadores y/o excipientes fisiológicamente aceptables. Las partículas virales pueden formularse para su administración, por ejemplo, por inyección, inhalación o aislamiento (ya sea a través de la boca o la nariz) o por administración oral, bucal, parenteral o rectal, o por administración directamente a un tumor.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para una variedad de modos de administración, que incluyen administración sistémica, tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones pueden encontrarse en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences,

Meade Publishing Co., Easton, Pa. Para la administración sistémica, se prefiere la inyección, que incluye intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea. Para los propósitos de la inyección, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma sólida y disolverse nuevamente o suspenderse inmediatamente antes del uso. Las formas liofilizadas de la composición farmacéutica también son adecuadas.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz previamente gelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Las tabletas también pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante adicionado opcionalmente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse además como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener otros agentes que incluyen agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como una preparación de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. Otros sistemas de suministro adecuados incluyen las microesferas, que ofrecen la posibilidad de un suministro no invasivo local de fármacos durante un período de tiempo prolongado. Esta tecnología puede incluir microesferas que tienen un tamaño precapilar, que pueden inyectarse a través de un catéter coronario en cualquier parte seleccionada de un órgano sin provocar inflamación o isquemia. El producto terapéutico administrado es liberado lentamente en el hombre a partir de las microesferas y es absorbido por las células circundantes presentes en el tejido seleccionado.

La administración sistémica también puede ser por medio transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, los penetrantes apropiados para la barrera a permear se usan en la formulación. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. Adicionalmente, los detergentes pueden usarse para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede producirse mediante el uso de atomizadores nasales o supositorios. Para la administración tópica, las partículas virales descritas en la presente descripción pueden formularse en ungüentos, pomadas, geles, o cremas como generalmente se conocen en la técnica. Una solución de lavado también puede usarse localmente para tratar una lesión o inflamación para acelerar la cicatrización.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida. Debe ser estable en condiciones de fabricación y determinados parámetros de almacenamiento (por ejemplo, refrigeración y congelación) y deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Si las formulaciones descritas en la presente descripción se usan como un producto terapéutico para reforzar una respuesta inmunitaria en un sujeto, un agente terapéutico puede formularse en

una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o hierro, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Un portador también puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos conocidos en la técnica. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse al incorporar los compuestos activos o constructos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada.

Después de la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que es terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas o micropartículas y microesferas de liberación lenta y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe amortiguarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intratumoral, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este contexto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una

dosificación podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1,000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión.

La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual. Por ejemplo, a un sujeto puede administrarse partículas virales descritas en la presente descripción diariamente o semanalmente por un período de tiempo o mensualmente, bianualmente o anualmente en dependencia de la necesidad o exposición a un organismo patógeno o a una afección en el sujeto (por ejemplo, cáncer).

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tales como inyección intravenosa, intratumoral, intradérmica o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, tabletas u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo; biodegradable y cualquier otra forma actualmente usada.

También pueden usarse soluciones intranasales o inhalables o atomizadores, aerosoles o inhalantes. Las soluciones nasales pueden ser soluciones acuosas diseñadas para ser administradas a los conductos nasales en gotas o atomizadores. Las soluciones nasales pueden prepararse de manera que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales. Por lo tanto, las soluciones nasales acuosas usualmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5.5 a 7.5. Además, los conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas, y estabilizadores de fármacos apropiados, si se requieren, pueden incluirse en la formulación. Se conocen diversas preparaciones nasales comerciales y pueden incluir, por ejemplo, antibióticos y antihistamínicos y se usan para la profilaxis del asma.

Las formulaciones orales pueden incluir excipientes como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos. En determinadas modalidades definidas, las composiciones farmacéuticas orales incluirán un diluyente inerte o portador comestible asimilable, o pueden encerrarse en una cápsula de gelatina dura o blanda, o pueden comprimirse en tabletas, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas ingeridas, tabletas bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares.

Las tabletas, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tal como fosfato dicálcico; un agente desintegrante, tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y puede adicionarse un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente aromatizante, tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de cualquier otra manera la forma física de la dosificación unitaria. Por ejemplo, tabletas, píldoras, o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe de elixir puede contener los compuestos activos sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un tinte y saborizante, tal como sabor cereza o naranja.

Las modalidades adicionales descritas en la presente descripción pueden referirse a kits para su uso con métodos y composiciones. Los kits pueden incluir además un recipiente adecuado, por ejemplo, viales, tubos, tubos de mini o microcentrífuga, tubos de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro contenedor. Cuando se proporciona un componente o agente adicional, el kit puede contener uno o más recipientes adicionales en los cuales puede colocarse este agente o componente. Los kits en la presente descripción también incluirán típicamente un medio para contener las partículas virales y cualquier otro recipiente de reactivos en un confinamiento cercano para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes plásticos moldeados por soplado o inyección en los que se retienen los viales deseados. Opcionalmente, pueden necesitarse uno o más agentes activos adicionales tales como, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes antifúngicos o antibacterianos o agentes antitumorales para las composiciones descritas.

Las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir la administración a un sujeto por vía intravenosa, intratumoral, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, intravascular, intratumoral, intramuscular, intratecal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada, a través de un catéter, a través de un lavado, en una crema o en una composición lipídica.

Cualquier método conocido por un experto en la técnica puede usarse para la producción a gran escala de partículas virales, células de empaquetamiento y construcciones de partículas descritos en la presente descripción. Por ejemplo, las reservas de semillas maestras y de trabajo pueden prepararse bajo condiciones de GMP en CEF primarios calificados o mediante otros métodos. Las células de empaquetamiento pueden sembrarse en matraces de gran área superficial, cultivarse hasta cerca de la confluencia y purificarse las partículas virales. Las células pueden cultivarse y aislarse y purificarse las partículas virales liberadas en el medio de cultivo, o las partículas virales intracelulares liberadas por alteración mecánica (los restos celulares pueden eliminarse por filtración profunda de poro grande y digerirse el ADN de células hospedadoras digerirse con endonucleasa). Las partículas del virus pueden purificarse posteriormente y concentrarse mediante filtración de flujo tangencial, seguido por diafiltración. El volumen concentrado resultante se formula mediante dilución con un tampón que contiene estabilizadores, se llena en frascos, y se somete a liofilización. Las composiciones y formulaciones pueden almacenarse para su uso posterior. Para su uso, las partículas virales liofilizadas pueden reconstituirse mediante la adición de diluyente.

Ciertos agentes adicionales usados en las terapias de combinación pueden formularse y administrarse por cualquier medio conocido en la técnica.

Las composiciones como se describen en la presente descripción también pueden incluir adyuvantes tales como sales de aluminio y otros adyuvantes minerales, agentes tensoactivos, derivados bacterianos, vehículos y citocinas. Los adyuvantes pueden tener además propiedades inmunomoduladoras de antagonización. Por ejemplo, los adyuvantes pueden estimular la inmunidad Th1 o Th2. Las composiciones y métodos como se describen en la presente descripción pueden incluir, además, la terapia adyuvante.

Más abajo se enumeran las modalidades ilustrativas y no taxativas.

Modalidad 1. Una partícula viral de AAV que comprende una cápside de AAV, en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV comprende al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en

- una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate,
- una proteína de la cápside de un AAV remoto, y
- una de sus combinaciones, y

en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV se modifica para comprender

- (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,
- (b) una etiqueta detectable,
- 5 (c) una mutación puntual,
- (d) una secuencia de aminoácidos quiméricos que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de otra proteína de la cápside de AAV enlazada operativamente a dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en la proteína de la cápside del AAV de animal
- 10 no primate, la proteína de la cápside de un AAV remoto, o la combinación de estas, y
- (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

Modalidad 2. Una partícula viral de AAV que comprende una cápside de AAV,

- 15 en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV comprende al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate,

en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV se modifica para comprender

- 20 (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,
- (b) una etiqueta detectable,
- (c) una mutación puntual,
- (d) una secuencia de aminoácidos quiméricos que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de otra proteína de la cápside de AAV enlazada operativamente a dicha secuencia de
- 25 aminoácidos de la cápside del AAV de animal no primate, y
- (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

Modalidad 3. Una partícula viral de AAV que comprende una cápside de AAV,

- en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV comprende al
- 30 menos una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV remoto,

en donde al menos una proteína de la cápside de AAV de dicha cápside de AAV se modifica para comprender

(a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,

(b) una etiqueta detectable,

5 (c) una mutación puntual,

(d) una secuencia de aminoácidos quiméricos que comprende una porción de una secuencia de aminoácidos de otra proteína de la cápside de AAV enlazada operativamente a dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV remoto, y

(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

10

Modalidad 4. Una partícula viral de AAV que comprende

(A) al menos una proteína de la cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

(i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate,

15 (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV no remoto, y

(iii) una secuencia de aminoácidos de una de sus combinaciones, y

(B) un genoma de AAV que comprende un nucleótido de interés y una ITR de AAV que comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otro AAV.

20 Modalidad 5. Una partícula viral de AAV que comprende

(A) el menos una proteína de la cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate, y

(B) un genoma de AAV que comprende un nucleótido de interés y una ITR de AAV que comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otro AAV.

25

Modalidad 6. Una partícula viral de AAV que comprende

(A) al menos una proteína de la cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV remoto, y

(B) un genoma de AAV que comprende un nucleótido de interés y una ITR de AAV que

30 comprende al menos una porción de una secuencia de ITR de otro AAV.

Modalidad 7. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside de AAV remoto, o una de sus combinaciones, se modifica para comprender

- 5 (a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,
(b) una etiqueta detectable,
(c) una mutación puntual.

Modalidad 8. La partícula de AAV de la modalidad 7, en donde el par de unión proteína:
10 proteína se selecciona de SpyTag: SpyCatcher, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin C, SnooTag: SnooCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002.

Modalidad 9. La partícula de AAV de la modalidad 7, en donde el primer miembro de un
par de unión proteína: proteína comprende c-myc que comprende una secuencia establecida como
15 la SEQ ID NO: 44.

Modalidad 10. La partícula de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
la etiqueta detectable comprende el epítipo B1 que comprende una secuencia de aminoácidos de
IGTRYLTR (SEQ ID NO: 45).

20 Modalidad 11. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate y/o una
25 secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV remoto.

Modalidad 12. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia
30 de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV remoto.

Modalidad 13. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AAV de animal no primate, la proteína de la cápside del AAV remoto, o una de sus combinaciones, comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV de animal no primate y/o una
5 secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV remoto.

Modalidad 14. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la cápside de dicha partícula comprende

(i) una proteína de la cápside VP1 que es

10 una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente con una región común VP1/VP2 y una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto,

o

15 una proteína de la cápside VP1 de AAV de no primate o AAV remoto,

(ii) una proteína de la cápside VP2 que es

una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 de otro AAV enlazada operativamente con una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto, o

20 una proteína de la cápside VP2 de AAV de no primate o AAV remoto, y

(iii) la proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 15. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la cápside de dicha partícula comprende

25 (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente con una región común VP1/VP2 y una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto,

(ii) una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV, opcionalmente, en donde la proteína de la
30 cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 de otro AAV enlazada operativamente con una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto, y

(iii) la proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 16. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la cápside de dicha partícula comprende

(i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente con una región común VP1/VP2 y una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto,

(ii) una proteína de la cápside VP2 de AAV de no primate o AAV remoto, y

(iii) la proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 17. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la cápside comprende

(i) una proteína de la cápside VP1 de AAV de no primate o AAV remoto,

(ii) una proteína de la cápside VP2 de AAV de no primate o AAV remoto, y

(iii) una proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 18. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho otro AAV es un AAV de primate o una combinación de AAV de primate.

Modalidad 19. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho otro AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 y una de sus combinaciones.

Modalidad 20. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho otro AAV es AAV2.

Modalidad 21. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5 y 7-20, en donde dicho AAV de animal no primate es un AAV de no primate enumerado en la Tabla 2.

Modalidad 22. La partícula viral de AAV de cualquiera de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5 y 7-21, en donde el AAV de no primate es un AAV de ave, un AAV de lobo marino o un AAV de dragón barbudo.

Modalidad 23. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5 y 7-22, en donde el AAV de animal no primate es un AAV.

Modalidad 24. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5 y 7-23, en donde la modificación está en la posición I444 o I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAV.

Modalidad 25. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5 y 7-22, en donde el AAV de animal no primate es un AAV de escamoso

Modalidad 26. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5, 7-22 y 25, en donde el AAV de escamoso es un AAV de dragón barbudo.

Modalidad 27. La partícula viral de AAV de cualquiera d cualquier una de las modalidades 1-2, 4-5, 7-22 y 25-26, en donde la modificación está en la posición I573 o I436 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo.

Modalidad 28. La partícula viral de AAV de cualquiera de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5 y 7-22, en donde el AAV de animal no primate es un AAV de mamífero.

Modalidad 29. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5, 7-22 y 28, en donde el AAV de mamífero es un AAV de lobo marino.

Modalidad 30. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades 1-2, 4-5, 7-22 y 28-29, en donde la modificación está en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 y A565 de una VP1 de AAV de lobo marino.

Modalidad 31. La partícula viral de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende una proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate, el AAV remoto, o una de sus combinaciones, en donde proteína de la cápside VP3 se modifica para comprender

(a) al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, opcionalmente, en donde el par de unión proteína: proteína se selecciona del grupo que consiste en SpyTag: SpyCatcher, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin-C, SnoopTag: SnoopCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002

5 (b) una etiqueta detectable, opcionalmente, en donde la etiqueta detectable comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 44 o la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45,

(c) una mutación puntual o

(d) cualquier combinación de (a), (b) y (c).

10 Modalidad 32. La partícula viral de AAV de la modalidad 31, en donde la proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate, el AAV remoto, o una de sus combinaciones, se modifica para comprender

(a) al menos SpyTag que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO:42 y/o

15 (b) una etiqueta detectable que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45.

Modalidad 33. La partícula de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende un primer y/o segundo enlazador que enlaza operativamente un primer miembro de un
20 par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable a una proteína de la cápside de dicha partícula de AAV.

Modalidad 34. La partícula de AAV de la modalidad 33, en donde el primer y el segundo enlazador no son idénticos.

25 Modalidad 35. La partícula de AAV de la modalidad 33 o la modalidad 34, en donde el primer y el segundo enlazador son idénticos.

30 Modalidad 36. La partícula de AAV de cualquiera de las modalidades 33-35, en donde el primer y/o el segundo enlazador tiene una longitud de 10 aminoácidos.

Modalidad 37. La partícula de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable enlazada operativamente a una región variable de una proteína de la cápside de dicha partícula de AAV.

5

Modalidad 38. La partícula de AAV de la modalidad 1 o la modalidad 2, que comprende una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

- (a) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 2,
- 10 (b) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 4,
- (c) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 6,
- (d) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8,
- (e) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10,
- (f) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12,
- 15 (g) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14,
- (h) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16,
- (i) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18,
- (j) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20,
- (k) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22,
- 20 (l) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24,
- (m) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26,
- (n) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28,
- (o) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30,
- (p) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32,
- 25 (q) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34,
- (r) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36,
- (s) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 53,
- (t) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 55,
- (u) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 57,
- 30 (v) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 59,
- (w) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 61,
- (x) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 63,

- (y) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 65,
 (z) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 67,
 (aa) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 69,
 (bb) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 71,
 5 (cc) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 71 y
 10 (dd) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las porciones de VP2 y/o VP3 de las secuencias de aminoácidos establecidas en cualquiera de (a)-(cc).
- 15 Modalidad 39. La partícula de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además una proteína de la cápside de referencia de manera que la cápside es una cápside de mosaico.
- Modalidad 40. La partícula de AAV de cualquiera de las modalidades anteriores, que
 20 comprende una cápside de mosaico que comprende una proteína de la cápside VP3 modificada con un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y una proteína de la cápside VP3 de referencia.
- Modalidad 41. Una proteína de la cápside de virus adenoasociado (AAV) que comprende
 25 una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de un AAV de animal no primate o un AAV remoto, en donde la proteína de la cápside de AAV se selecciona del grupo que consiste en
- (a) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde proteína de la cápside VP1 quimérica de AAV de animal se modifica para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual,
 30 (b) una proteína de la cápside VP1 de AAV no quimérica modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína y/o una etiqueta detectable,

(c) una proteína de la cápside VP2 quimérica, opcionalmente, en donde proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV se modifica para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual,

5 (d) una proteína de la cápside VP2 no quimérica de AAV modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual,

(e) una proteína de la cápside VP3 quimérica de AAV modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual, y

10 (f) una proteína de la cápside VP3 no quimérica de AAV modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína, una etiqueta detectable y/o una mutación puntual.

Modalidad 42. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 41, en donde el primer
15 miembro de un par de unión proteína: proteína está flanqueado por un primer y/o un segundo enlazador que une el primer miembro de un par de unión proteína: proteína con la proteína de la cápside, y en donde cada uno del primer y/o el segundo enlazador tiene, independientemente, al menos un aminoácido de longitud.

20 Modalidad 43. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 42, en donde el primer y el segundo enlazador no son idénticos.

Modalidad 44. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 42, en donde el primer y el segundo enlazador son idénticos y tienen 10 aminoácidos de longitud.

25 Modalidad 45. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-44, en donde la proteína de la cápside comprende además un segundo miembro cognado del par de unión proteína: proteína, opcionalmente en donde el primer y el segundo miembro se unen mediante un enlace covalente, opcionalmente un enlace isopeptídico.

30 Modalidad 46. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-45, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende SpyTag.

- Modalidad 47. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 45 o la modalidad 46, en donde el segundo miembro cognado comprende SpyCatcher.
- 5 Modalidad 48. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 45-47, en donde el segundo miembro cognado comprende KTag.
- Modalidad 49. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 45, en donde el primer miembro es KTag y el segundo miembro cognado comprende SpyTag.
- 10 Modalidad 50. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 45, en donde el primer miembro es SnoopTag y el segundo miembro cognado comprende SnoopCatcher.
- Modalidad 51. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 45, en donde el primer miembro es isopeptag y el segundo miembro cognado comprende Pilin-C.
- 15 Modalidad 52. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 45, en donde el primer miembro es SpyTag002 y el segundo miembro cognado comprende SpyCatcher002.
- Modalidad 53. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 45-52, en donde el segundo miembro se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento, opcionalmente en donde el ligando de direccionamiento es un resto de unión.
- 20 Modalidad 54. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 53, en donde el resto de unión es un anticuerpo, o una porción de este.
- 25 Modalidad 55. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 54, en donde el anticuerpo, o una porción de este se fusiona a SpyCatcher.
- 30 Modalidad 56. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 54 o la modalidad 55, en donde el anticuerpo, o una porción de este, se fusiona con un enlazador en el extremo C, y el enlazador se fusiona con SpyCatcher en el extremo C del enlazador.

- Modalidad 57. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 56, en donde el enlazador comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO: 49 (GSGESG).
- 5 Modalidad 58. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-57, en donde la etiqueta detectable comprende un epítipo B1 que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 45.
- 10 Modalidad 59. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-58, en donde dicho AAV de animal no primate es un AAV de no primate enumerado en la Tabla 2.
- Modalidad 60. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-59, en donde el AAV de no primate es un AAV de ave, un AAV de lobo marino o un AAV de dragón barbudo.
- 15 Modalidad 61. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60, en donde el AAV de animal no primate es un AAV.
- 20 Modalidad 62. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-61, en donde la modificación está en la posición I444 o I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAV.
- Modalidad 63. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60, en donde el AAV de animal no primate es un AAV de escamoso.
- 25 Modalidad 64. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60 y 63, en donde el AAV de escamoso es un AAV de dragón barbudo.
- 30 Modalidad 65. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60 y 63-64, en donde la modificación está en la posición I573 o I436 de una proteína de la cápside VP1 de un AAV de dragón barbudo.

Modalidad 66. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60, en donde el AAV de animal no primate es un AAV de mamífero.

5 Modalidad 67. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60 y 66, en donde el AAV de mamífero es un AAV de lobo marino.

10 Modalidad 68. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-60 y 66-67, en donde la modificación está en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 y A565 de una VP1 de AAV de lobo marino.

Modalidad 69. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-68, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

- (a) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 2,
- (b) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 4,
- 15 (c) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 6,
- (d) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8,
- (e) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10,
- (f) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12,
- (g) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14,
- 20 (h) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16,
- (i) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18,
- (j) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20,
- (k) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22,
- (l) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24,
- 25 (m) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26,
- (n) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28,
- (o) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30,
- (p) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32,
- (q) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34,
- 30 (r) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36,
- (s) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 53,
- (t) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 55,

- (u) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 57,
(v) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 59,
(w) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 61,
(x) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 63,
5 (y) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 65,
(z) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 67,
(aa) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 69,
(bb) la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 71,
(cc) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo,
10 al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID
NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ
ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30,
SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO:
57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID
15 NO: 69 o SEQ ID NO: 71 y
(dd) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las porciones de VP2 y/o VP3 de las
secuencias de aminoácidos establecidas en cualquiera de (a)-(cc).

Modalidad 70. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 41-
20 69, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta
detectable.

Modalidad 71. La proteína de la cápside de AAV de la modalidad 70, en donde la etiqueta
detectable comprende c-myc (SEQ ID NO: 44).

25 Modalidad 72. Una partícula de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV de
cualquiera de las modalidades 41-71.

Modalidad 73. Un ácido nucleico que comprende un gen *cap* que codifica la proteína de la
30 cápside de AAV de cualquiera de las modalidades 41-71.

Modalidad 74. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de un gen *cap* seleccionado del grupo que consiste en

- 5 (i) un gen *cap* de un AAV de animal no primate,
(ii) un gen *cap* de un AAV remoto, o
(iii) una de sus combinaciones,

en donde dicho gen *cap* de AAV se modifica adicionalmente para comprender

- 10 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína:
proteína,
(b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable,
(c) una mutación puntual,
(d) una secuencia de nucleótidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de
nucleótidos de un gen *cap* de otro AAV que se enlaza operativamente con dicha secuencia de
15 nucleótidos del gen *cap* de AAV seleccionado del grupo que consiste en el gen *cap* de AAV de
animal no primate, un AAV remoto o una de sus combinaciones,
(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

Modalidad 75. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *cap* de AAV que
20 codifica una proteína de la cápside de AAV, en donde el gen *cap* de AAV comprende al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal no primate

en donde dicho gen *cap* de AAV se modifica adicionalmente para comprender

- 25 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína:
proteína,
(b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable,
(c) una mutación puntual,
(d) una secuencia de nucleótidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de
nucleótidos de un gen *cap* de otro AAV que se enlaza operativamente con dicha secuencia de
30 nucleótidos del gen *cap* de AAV de animal no primate,
(e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).

- Modalidad 76. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de AAV,
en donde el gen *cap* de AAV comprende al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal remoto
- 5 en donde dicho gen *cap* de AAV se modifica adicionalmente para comprender
- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable,
- (c) una mutación puntual,
- 10 (d) una secuencia de nucleótidos quimérica que comprende una porción de una secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de otro AAV que se enlaza operativamente con dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* de AAV de animal remoto,
- (e) cualquier combinación de (a), (b), (c) y (d).
- 15 Modalidad 77. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV,
en donde el gen *cap* de AAV comprende una primera secuencia de nucleótidos de un gen *cap* seleccionado del grupo que consiste en
- (i) un gen *cap* de un AAV de animal no primate,
- 20 (ii) un gen *cap* de un AAV remoto, y
- (iii) una de sus combinaciones,
- en donde el gen *rep* de AAV comprende una segunda secuencia de nucleótidos de un gen *rep* de AAV de otro AAV.
- 25 Modalidad 78. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV,
en donde el gen *cap* de AAV comprende al menos una primera secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal no primate,
- en donde el gen *rep* de AAV comprende una segunda secuencia de nucleótidos de un gen *rep* de
- 30 AAV de otro AAV.

Modalidad 79. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV,
en donde el gen *cap* de AAV comprende al menos una primera secuencia de nucleótidos de un gen *cap* de un AAV de animal remoto,
5 en donde el gen *rep* de AAV comprende una segunda secuencia de nucleótidos de un gen *rep* de AAV de otro AAV.

Modalidad 80. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-79, en donde el gen *cap* se enlaza operativamente a un promotor.

10 Modalidad 81. La molécula de ácido nucleico de la modalidad 80, en donde dicho promotor dirige la expresión de la o las proteínas de la cápside en una célula de empaquetamiento.

Modalidad 82. La molécula de ácido nucleico de la modalidad 80 o la modalidad 81, en
15 donde el promotor se selecciona de p40, SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.

Modalidad 83. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-82, en donde dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* del AAV de animal no primate, el gen *cap* del AAV remoto, o la combinación de estas, se modifica para comprender

- 20 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un primer miembro de un par de unión proteína: proteína,
(b) una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta detectable y/o
(c) una secuencia de nucleótidos que codifica una mutación puntual.

25 Modalidad 84. La molécula de ácido nucleico de la modalidad 83, en donde el par de unión proteína: proteína se selecciona de SpyTag: SpyCatcher, SpyTag: KTag, Isopeptag: pilin C, SnoopTag: SnoopCatcher y SpyTag002:SpyCatcher002.

30 Modalidad 85. La molécula de ácido nucleico de la modalidad 83, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende c-myc que comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO: 44.

Modalidad 86. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 83-85, en donde la etiqueta detectable comprende el epítipo B1 que comprende una secuencia de aminoácidos de IGTRYLTR (SEQ ID NO: 45).

5 Modalidad 87. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-86, en donde dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* del AAV de animal no primate, el gen *cap* del AAV remoto, o la combinación de estas, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 del AAV de animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP3 de AAV remoto.

10 Modalidad 88. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-87, en donde dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* de AAV de animal no primate, el gen *cap* de AAV remoto, o la combinación de estos, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 del AAV de animal no primate y/o
15 una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP2 de AAV remoto.

Modalidad 89. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-87, en donde dicha secuencia de nucleótidos del gen *cap* de AAV de animal no primate, el gen *cap* de AAV remoto, o la combinación de estos, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una
20 secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 del AAV de animal no primate y/o una secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside VP1 de AAV remoto.

Modalidad 90. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-89, en donde el gen *cap* codifica
25 (i) una proteína de la cápside VP1 que es una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente con una región común VP1/VP2 y una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto, o
30 una proteína de la cápside VP1 de AAV de no primate o AAV remoto,
(ii) una proteína de la cápside VP2 que es

una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 de otro AAV enlazada operativamente con una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto, o

una proteína de la cápside VP2 de AAV de no primate o AAV remoto, y/o

5 (iii) la proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 91. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-90, en donde el gen *cap* codifica

10 (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente con una región común VP1/VP2 y una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto,

(ii) una proteína de la cápside VP2 quimérica de AAV, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP2 quimérica comprende una región común VP1/VP2 de otro AAV enlazada operativamente con una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto, y/o

15 (iii) la proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 92. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las modalidades 73-90. en donde el gen *cap* codifica

20 (i) una proteína de la cápside VP1 de AAV quimérica, opcionalmente, en donde la proteína de la cápside VP1 quimérica comprende una región única de VP1 (VP1-u) de otro AAV enlazada operativamente con una región común VP1/VP2 y una región de VP3 de AAV de no primate o el AAV remoto,

(ii) una proteína de la cápside VP2 de AAV de no primate o AAV remoto, y

25 (iii) la proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 93. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-90, en donde el gen *cap* codifica

(i) una proteína de la cápside VP1 de AAV de no primate o AAV remoto,

30 (ii) una proteína de la cápside VP2 de AAV de no primate o AAV remoto, y/o

(iii) una proteína de la cápside VP3 de AAV de no primate o AAV remoto.

Modalidad 94. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-93, en donde dicho otro AAV es un AAV de primate o una combinación de AAV de primate.

Modalidad 95. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-94, en donde dicho otro AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 y una de sus combinaciones.

Modalidad 96. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-95, en donde dicho otro AAV es AAV2.

Modalidad 97. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78 y 80-96, en donde dicho AAV de animal no primate es un AAV de no primate enumerado en la Tabla 2.

Modalidad 98. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78 y 80-97, en donde el AAV de no primate es un AAV de ave, un AAV de lobo marino o un AAV de dragón barbudo.

Modalidad 99. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78 y 80-98, en donde el AAV de animal no primate es un AAV.

Modalidad 100. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78 y 80-99, en donde la modificación está en un codón que codifica la posición I444 o I580 de una proteína de la cápside VP1 de AAV.

Modalidad 101. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78 y 80-98, en donde el AAV de animal no primate es un AAV de escamoso.

Modalidad 102. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78, 80-98 y 101, en donde el AAV de escamoso es un AAV de dragón barbudo.

Modalidad 103. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 76-77 y 80-98 y 101-102, en donde la modificación está en un codón que codifica la posición I573 o I436 de una proteína de la cápside VP1 de AAV de dragón barbudo.

- 5 Modalidad 104. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 76-77 y 80-98, en donde el AAV de animal no primate es un AAV de mamífero.

Modalidad 105. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78, 80-98 y 104, en donde el AAV de mamífero es un AAV de lobo marino.

10

Modalidad 106. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-75, 77-78, 80-98 y 105, en donde la modificación está en una posición seleccionada del grupo que consiste en I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437 y A565 de una VP1 de un AAV de lobo marino.

15

Modalidad 107. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-106, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en

- (a) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1,
- (b) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 3,
- 20 (c) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 5,
- (d) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7,
- (e) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 9,
- (f) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 11,
- (g) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 13,
- 25 (h) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 15,
- (i) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 17,
- (j) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 19,
- (k) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 21,
- (l) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 23,
- 30 (m) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 25,
- (n) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 27,
- (o) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 29,

- (p) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 31,
(q) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 33,
(r) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 35,
(s) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 52,
5 (t) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 54
(u) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 56
(v) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 58
(w) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 60
(x) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 62
10 (y) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 64
(z) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 66
(aa) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 68
(bb) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 70
(cc) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia significativa, por ejemplo,
15 al menos un 95 % de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 1,
3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, o
cualquiera de estas que codifica una cápside VP2,
(dd) cualquier porción de la secuencia de nucleótidos de (a)-(s) que codifica una proteína de la
cápside VP2 y/o una proteína de la cápside VP3.

20
Modalidad 108. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 73-107, que comprende además un gen *rep* de AAV que codifica una o más proteínas Rep de AAV y se enlaza operativamente a un promotor.

25 Modalidad 109. La molécula de ácido nucleico de la modalidad 108, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en p5, p19 SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.

Modalidad 110. La molécula de ácido nucleico de la modalidad 108 o la modalidad 109, en donde las una o más proteínas Rep se seleccionan de Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.

30
Modalidad 111. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 108-110, en donde las una o más proteínas Rep comprenden Rep78.

- Modalidad 112. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 108-110, en donde las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal primate.
- 5 Modalidad 113. Una proteína de la cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de las modalidades 73-112.
- Modalidad 114. Una partícula de AAV que comprende la proteína de la cápside de la modalidad 113.
- 10 Modalidad 115. Una célula de empaquetamiento para producir partículas de AAV que comprenden la molécula de ácido nucleico que comprende un gen *cap* de acuerdo con cualquiera de las modalidades 73-112.
- 15 Modalidad 116. La célula de empaquetamiento de la modalidad 115, que comprende además una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *rep* que codifica una o más proteínas Rep de AAV, en donde dicho gen *rep* se enlaza operativamente a un promotor, opcionalmente, en donde el gen *rep* y el gen *cap* son de dos AAV diferentes.
- 20 Modalidad 117. La célula de empaquetamiento de la modalidad 116, en donde el promotor enlazado operativamente al gen *rep* dirige la expresión de la(s) proteína(s) Rep en la célula de empaquetamiento.
- 25 Modalidad 118. La célula de empaquetamiento de la modalidad 116 o la modalidad 117, en donde el promotor se selecciona de p5, p19 SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.
- Modalidad 119. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 116-118, en donde las una o más proteínas Rep se seleccionan de Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.
- 30 Modalidad 120. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 116-119, en donde las una o más proteínas Rep comprenden Rep78.

Modalidad 121. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 116-120, en donde las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal primate.

Modalidad 122. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 116-120, en donde las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal no primate.

Modalidad 123. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 116-122, que comprende además una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de un nucleótido de interés flanqueado en al menos un lado por al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV, que es reconocida por la una o más proteínas Rep.

Modalidad 124. La célula de empaquetamiento de la modalidad 123, en donde el nucleótido está flanqueado en el otro lado por una segunda ITR del mismo AAV que la al menos una ITR.

Modalidad 125. La célula de empaquetamiento de la modalidad 124, en donde el nucleótido está flanqueado en el otro lado por una segunda ITR, en donde la segunda ITR y la al menos una ITR son de AAV diferentes.

Modalidad 126. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 123-125, en donde el nucleótido de interés es un gen reportero.

Modalidad 127. La célula de empaquetamiento de la modalidad 126, en donde el gen reportero codifica la β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), MmGFP, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrina, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina o una de sus combinaciones.

Modalidad 128. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 123-125, en donde el nucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas o una(s) porción(ones) de este, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

Modalidad 129. La célula de empaquetamiento de cualquiera de las modalidades 115-133, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de referencia.

- 5 Modalidad 130. Un método para producir una partícula viral que comprende cultivar una célula de empaquetamiento de acuerdo con cualquiera de las modalidades 115-129 en condiciones suficientes para la producción de partículas virales.

- 10 Modalidad 131. El método de la modalidad 130, en donde la célula de empaquetamiento comprende además un plásmido auxiliar y/o un plásmido de transferencia que comprende un nucleótido de interés.

Modalidad 132. El método de la modalidad 130 o modalidad 131, que comprende además una o más de las siguientes etapas:

- 15 a. limpiar los restos celulares,
b. tratar el sobrenadante que contiene las partículas virales con Benzonasa o DNasa I y MgCl₂,
c. concentrar las partículas virales,
d. purificar las partículas virales, y
20 e. cualquier combinación de a.-d.,
opcionalmente, en donde las partículas virales son partículas virales adenoasociadas autocomplementarias y/o aisladas del sobrenadante de cultivo.

- 25 Modalidad 133. Una partícula de AAV elaborada de acuerdo con el método de cualquiera de las modalidades 130-132.

Modalidad 134. Una partícula de AAV de cualquiera de las modalidades 1-40, 72, 114 y 133, que comprende además un nucleótido de interés.

- 30 Modalidad 135. La partícula de AAV de la modalidad 134, en donde el nucleótido de interés es un gen reportero.

Modalidad 136. La partícula de AAV de la modalidad 135, en donde el gen reportero codifica la β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), MmGFP, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrina, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina o una de sus combinaciones.

Modalidad 137. La partícula de AAV de la modalidad 134, en donde el nucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas o una(s) porción(ones) de este, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

Modalidad 138. Una composición farmacéutica que comprende (a) una partícula de AAV de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, 72, 114 y 133, una partícula AAV que comprende una proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las modalidades 41-71 y 113, o una partícula de AAV elaborada de acuerdo con el método de cualquiera de las modalidades 130-132, y (b) un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Modalidad 139. Un método para suministrar un nucleótido de interés a una célula diana que comprende poner en contacto la célula diana con (a) la partícula de AAV de cualquiera de las modalidades 1-40, 72, 114 y 133, o (b) la composición de la modalidad 138.

Modalidad 140. El método de la modalidad 139, en donde la cápside de la partícula de AAV comprende un ligando de direccionamiento que se une específicamente a una proteína expresada en la superficie de la célula diana.

Modalidad 141. El método de la modalidad 139 o la modalidad 140, en donde dicho contacto se realiza *ex vivo*.

Modalidad 142. El método de la modalidad 139 o la modalidad 140, en donde la célula diana se encuentra en un sujeto.

Modalidad 143. El método de la modalidad 142, en donde el sujeto es un ser humano.

Modalidad 144. El método de cualquiera de las modalidades 139-143, en donde la célula diana es una célula humana.

5

Modalidad 145. El método de cualquiera de las modalidades 139-144, en donde el nucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas o una(s) porción(ones) de este, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

10

15

20

25

30

Tabla 2

Descripción	Número de acceso/número de GI	ITR	Región que codifica la proteína no estructural/rep (número de acceso/ número de GI de la proteína)	Región que codifica la proteína de la cápside (número de acceso/ número de GI de la proteína)
<i>Virus adenoasociado de ave</i>				
Virus adenoasociado de ave YZ-1, genoma completo	GQ368252.1/ GI: 255710032		243-2237 (ACU30841.1/ GI:255710033)	2255-4471 (ACU30842.1/ GI:255710034)
Virus adenoasociado de ave ZN1, genoma completo	KE937794.1/ GI: 588284633	1-142 4540-4682	244-2235 (AHK22792.1/ GI: 588284634)	2253-4469 (AHK22793.1/ GI: 588284635)
<i>Virus adenoasociado de ave ATCC VR-865</i>				
Virus adenoasociado de ave ATCC VR-865, genoma completo	AY186198.1/ GI:31414777	1-142 4552-4694	244-2232 (AAO32086.1/ GI:31414778)	2250-4481 (AAO32087.1/ GI:31414779)
Virus adenoasociado de ave ATCC VR-865, genoma completo	NC_004828.1 /GI:31543992	1-142 4552-4694	244-2232 (NP_852780.1/ GI:31543993)	2250-4481 (NP_852781.1/ GI:31543994)
Virus adenoasociado de ave ATCC VR-865, genoma completo	AY629582.1/ GI:48996102	1-142 4552-4694	244-2232 (AAT48612.1/ GI:48996103)	2250-4481 (AAT48613.1/ GI:48996104)
<i>Virus adenoasociado de ave cepa DA-1</i>				
Virus adenoasociado de ave cepa DA-1, genoma completo	AY629583.1/ GI: 48996105	1-142 4540-4682	244-2235 (AAT48614.1/ GI:48996106)	2253-4469 (AAT48615.1/ GI:48996107)
Virus adenoasociado de ave cepa DA-1, genoma completo	NC_006263.1 /GI: 51949968	1-142 4540-4682	244-2235 (YP_077182.1/ GI:51949969)	2253-4469 (YP_077183.1/ GI:51949970)
<i>Virus adenoasociado de murciélago YNM</i>				
Virus adenoasociado de murciélago YNM, secuencia completa	GU226971.1/ GI:289719008		200-2041 (ADD17085.1/ GI:289719009)	2059-4233 (ADD17086.1/ GI:289719010)
Virus adenoasociado de murciélago YNM, genoma completo	NC_014468.1 /GI:304422916		200-2041 (YP_00385857 1.1/ GI: 304422917)	2059-4233 (YP_00385857 2.1/ GI: 304422918)
<i>Virus adenoasociado bovino</i>				
Virus adenoasociado bovino, genoma completo	AY388617.1/ GI:38679253		368-2200 (AAR26464.1/ GI:38679254)	2216-4426 (AAR26465.1/ GI:38679255)
Virus adenoasociado bovino, genoma completo	NC_005889.1 / GI:48696557		368-2200 (YP_024970.1/ GI:48696558)	2216-4426 (YP_024971.1/ GI:48696559)
<i>Parvovirus bovino-2</i>				
Genes de proteína de la cápside aparente y proteína no estructural aparente de parvovirus bovino 2, cds. completo	AF406966.1/ GI: 15825370		306-1919 (AAL09671.1/ GI:15825371)	2268-5384 (AAL09672.1/ GI:15825372)

Tabla 2 - continuación

5	Parvovirus bovino 2, genoma completo	NC_006259.1 /GI:51949957		306-1919 (YP_077175.1/ GI:51949958)	2268-5384 (YP_077176.1/ GI:51949959)
<i>Virus adenoasociado de lobo marino de California 1</i>					
	Aislado de virus adenoasociado de lobo marino de California 1, genes de 1136 Rep78 y VP1, cds. completo,	JN420371.1/ GI:343458966		284-2086 (AEM37641.1/ GI:343458967)	2117-4273 (AEM37642.1/ GI:343458968)
10	Aislado de virus adenoasociado de lobo marino de California 1, genes de 1187 Rep78 y VP1, cds. completo,	JN420372.1/ GI:343458969		291-2093 (AEM37643.1/ GI:343458970)	2124-4280 (AEM37644.1/ GI:343458971)
<i>Parvovirus de ganso</i>					
	Parvovirus de ganso cepa virulenta B, genoma completo	(U25749.1/GI:1113795)	1-444 4663-5106	537-2420 (AAA83229.1/ GI:1113796)	2439-4637 (AAA83230.1/ GI:1113797)
15					2874-4637 (AAA83231.1/ GI:1113798) 3033-4637 (AAA83232.1/ GI:1113799)
20	Parvovirus de ganso, genoma completo	(NC_001701.1/GI:9628649)	1-444 4663-5106	537-2420 (NP_043514.1/ GI:9628650)	2439-4637 (NP_043515.1/ GI:9628651) 2874-4637 (NP_043516.1/ GI:9628652) 3033-4637 (NP_043517.1/ GI:9628653)
25	Parvovirus de ganso cepa 82-0321V, genoma completo	(EU583389.1/GI:190888188)	1-381 4600-4980	474-2357 (ACE95848.1/ GI:190888189)	2376-4574 (ACE95849.1/ GI:190888190)
	Parvovirus de ganso cepa 82-0321, genoma completo	(EU583390.1/GI:190888191)	1-416 4635-5050	509-2392 (ACE95850.1/ GI:190888192)	2411-4609 (ACE95851.1/ GI:190888193)
30	Parvovirus de ganso cepa 06-0329, genoma completo	(EU583391.1/GI:190888194)	1-418 4637-5054	511-2394 (ACE95852.1/ GI:190888195)	2413-4611 (ACE95853.1/ GI:190888196)
	Parvovirus de ganso cepa VG32/1, genoma completo	(EU583392.1/GI:190888197)	1-443 4662-5104	536-2419 (ACE95854.1/ GI:190888198)	2438-4636 (ACE95855.1/ GI:190888199)

Tabla 2 - continuación

5	Parvovirus de ganso cepa SH, genoma completo	(JF333590.1/ GI:343113618)	1-444 4663-5106	537-2420 (AEL87777.1/ GI:343113619)	2439-4637 (AEL87778.1/ GI:343113620) 2874-4637 (AEL87779.1/ GI:343113621) 3033-4637 (AEL87780.1/ GI:343113622)
10	Parvovirus de ganso cepa GDaGPV, genoma completo	(HQ891825.1/ GI:359843307)	1-444 4663-5106	537-2420 (AEV89789.1/ GI:359843308)	2439-4637 (AEV89790.1/ GI:359843309) 2874-4637 (AEV89791.1/ GI:359843310) 3033-4637 (AEV89792.1/ GI:359843311)
15	Parvovirus de ganso cepa SHFX1201, genoma completo	(KC478066.1/ GI:459360514)	1-416	509-2392 (AGG56527.1/ GI:459360515)	2411-4609 (AGG56528.1/ GI:459360516)
	Parvovirus de ganso cepa Y, genoma completo	(KC178571.1/ GI:513129761)	1-444	537-2420 (AGO17637.1/ GI:513129762)	2439-4637 (AGO17638.1/ GI:513129763)
	Parvovirus de ganso cepa E, genoma completo	(KC184133.1/ GI:513129764)	1-443	536-2419 (AGO17639.1/ GI:513129765)	2438-4636 (AGO17640.1/ GI:513129766)
20	Parvovirus de ganso cepa SYG61v, genoma completo	(KC996729.1/ GI:531997217)	1-442	535-2418 (AGT62580.1/ GI:531997218)	2437-4635 (AGT62581.1/ GI:531997219)
	Parvovirus de ganso cepa YZ99-6, genoma completo	(KC996730.1/ GI:531997220)	1-414	507-2390 (AGT62582.1/ GI:531997221)	2409-4607 (AGT62583.1/ GI:531997222)
25	Parvovirus de ganso, genes de proteína no estructural NS (ns) y proteína de la cápside VP (vp), cds. completo	(AF416726.1/ GI:17226299)		1-1884 (AAL37721.1/ GI:17226300) 529-1884 (ABP93843.1/ GI:145694447)	1903-4101 (AAL37722.1/ GI:17226301)
30	Genes de parvovirus de ganso cepa DY NS1 (NS1), NS2 (NS2), VP1 (VP1), VP2 (VP2), y VP3 (VP3), cds. completo	(EF515837.1/ GI:145694443)		1-1884 (ABP93842.1/ GI:145694446)	1903-4101 (ABP82770.1/ GI:145573169) 2338-4101 (ABP93844.1/ GI:145694448) 2497-4101 (ABP93845.1/ GI:145694449)

Tabla 2 - continuación

Parvovirus de ganso cepa PT genes de proteína NS1 y proteína VP1, cds. completo	(JF926695.1/ GI:35446316 2)		9-1892 (AER25356.1/ GI:354463163)	1911-4109 (AER25357.1/ GI:354463164)
Parvovirus de ganso cepa D, genes de proteína NS1 y proteína VP1, cds. completo	(JF926696.1/ GI:35446316 5)		6-1889 (AER25358.1/ GI:354463166)	1908-4106 (AER25359.1/ GI:354463167)
<i>Virus adenoasociado de ratón 1</i>				
Virus 1 adenoasociado de ratón, gen rep, cds parcial; y genes de cápside de VP1, cápside de VP2 y cápside de VP3, cds completo	DQ100362.1/ GI:73665994		1-327 (AAZ79671.1/ GI:73665995)	344-2485 (AAZ79672.1/ GI:73665996) 731-2485 (AAZ79673.1/ GI:73665997) 911-2485 (AAZ79674.1/ GI:73665998)
<i>Parvovirus de pato Muscovy</i>				
Parvovirus de pato Barbarie, genes de proteína REP (rep) y tres proteínas de la cápside VP (vp), cds. completo	U22967.1/GI: 1113784	1-457 4678-5132	548-2431 (AAA83224.1/ GI:1113785)	2450-4648 (AAA83225.1/ GI:1113786) 2885-4648 (AAA83226.1/ GI:1113787) 3044-4648 (AAA83227.1/ GI:1113788)
Parvovirus de pato Muscovy, genoma completo	NC_006147.2 /GI:51593841	1-457 4678-5132	548-2431 (YP_068410.1/ GI: 51593842)	2450-4648 (YP_068411.1/ GI: 51593843) 2885-4648 (YP_068412.1; GI: 51593844) 3044-4648 (YP_068413.1/ GI: 51593845)
Parvovirus de pato Muscovy cepa P, genes de proteína REP y proteína VP1, cds. completo	JF926697.1/ GI:35446316 8		61-1944 (AER25360.1/ GI:354463169)	1963-4161 (AER25361.1/ GI:354463170)
Parvovirus de pato Muscovy cepa P1, genes de proteína REP y proteína VP1, cds. completo	JF926698.1/ GI:35446317 1		61-1944 (AER25362.1/ GI:354463172)	1963-4161 (AER25363.1/ GI:354463173)

Tabla 2 - continuación

5	Aislado de parvovirus de pato Muscovy SDK-SHNH, genoma completo	KC171936.1/ GI:459256867	1-381 4681-5061	512-2395 (AGG53766.1/ GI:459256868)	2414-4612 (AGG53768.1/ GI:459256870) 2849-4612 (AGG53769.1/ GI:459256871) 3008-4612 (AGG53767.1/ GI:459256869)
10	<i>Virus adenoasociado de serpiente 2</i>				
	Virus adenoasociado de serpiente 2, genes de proteína no estructural 1 y proteína de la cápside, cds. parcial	EU872429.1/ GI:215401981		1-642 (ACJ66590.1/ GI:215401982)	661-1297 (ACJ66591.1/ GI:215401983)
15	<i>Parvovirus de serpiente 1</i>				
	Parvovirus de serpiente 1, genes de proteína no estructural 1 (NS1) y proteína de la cápside (VP1), cds. completo	AY349010.1/ GI:38017148		324-2012 (AAR07954.1/ GI:38017149)	2030-4210 (AAR07955.1/ GI:38017150)
20	Parvovirus de serpiente 1, genoma completo	NC_006148.1/ GI:51555744		324-2012 (YP_068093.1/ GI:51555745)	2030-4210 (YP_068094.1/ GI:51555746)

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente para fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Materiales y Métodos

25 Líneas celulares y anticuerpos

Todas las líneas celulares 293 y 293T se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10 %, Pen/Strep al 1 % y L-glutamina al 1 %. Las líneas celulares 293 hErbB2 y 293hASGR1/2 se generaron mediante transducción lentiviral de la línea celular 293 parental con una partícula que expresaba el ADNc correspondiente. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la instalación central de Regeneron TC. El anticuerpo B1 reconoce un epítipo lineal compartido por VP1, VP2 y VP3 de AAV.

Construcciones de proteína de la cápside de AAV

Los GeneBlocks que codifican las secuencias de la cápside de AAV deseadas o los cebadores para la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa, que incluyen las inserciones de SpyTag, que flanquean los aminoácidos enlazadores, y las mutaciones puntuales se adquirieron en IDT y se clonaron en pAAV R2C2 mediante el uso de Gibson Assembly de acuerdo con el protocolo del fabricante (NEB).

Fusión de SpyCatcher a anticuerpos

Los GeneBlock que codifican SpyCatcher se adquirieron de IDT, y se usó Gibson Assembly para clonar la secuencia codificante en marco en los plásmidos de expresión para las cadenas pesadas de anticuerpos en el extremo C de cada construcción, separado por un enlazador de aminoácido flexible GSGESG (SEQ ID NO: 49).

Preparación de partículas virales de AAV

El virus se generó al transfectar células de empaquetamiento 293T mediante el uso de PEI Pro con los siguientes plásmidos: pAd auxiliar, un plásmido del genoma que contiene ITR de AAV2 que codifica una proteína reportera y un plásmido pAAV-CAP que codifica los genes Rep y Cap de AAV, con o sin los plásmidos adicionales que codifican ya sea un scFv o las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo. Las construcciones de scFv o de cadena pesada de anticuerpo se fusionan todas a SpyCatcher en su extremo C, tal como se describió anteriormente. La transfección se realizó en OptiMEM, y el medio se cambió a DMEM suplementado con FBS al 10 %, Pen/Strep al 1 %, y L-glut al 1 % después de 8 horas. Se realizó un protocolo de transfección alternativo en NaCl 150 mM sin intercambiar los medios después de la transfección.

Las células de empaquetamiento transfectadas se incubaron durante 3 días a 37 °C, después el virus se recolectó de los lisados celulares mediante el uso de un protocolo estándar de congelación-descongelación. En resumen, las células de empaquetamiento se levantaron mediante raspado y sedimentado. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en una solución de Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; y MgCl₂ 2 mM [pH 8.0] o Tris-HCl 25mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 1mM; KCl 2.5 mM; Pluronic F68 al 0.001 % [pH 7.4]. Las partículas intracelulares de virus se liberaron al inducir la lisis celular a través de tres ciclos de congelación-descongelación consecutivos, que consistían en la transferencia de la suspensión de células entre el baño de hielo seco/etanol y el baño de agua a 37 °C con agitación vigorosa con vórtex. La viscosidad se redujo al tratar el lisado con EMD Millipore Benzonasa (50 U/ml de lisado celular) durante 60 min a 37 °C, con mezcla ocasional. A continuación, los restos se sedimentaron mediante centrifugación y el sobrenadante resultante se procesó para la preparación del lisado bruto o para una purificación

adicional en gradiente de iodixanol. Para la preparación del lisado bruto, el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro PVDF Millex-GV de 0.22 μm , directamente en la cámara superior de una unidad de filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con el cartucho de filtro de membrana Ultracel-100 (100 KDa MWCO). La unidad de filtro se centrifugó en intervalos de 5-10 minutos hasta que se alcanzó el volumen deseado en la cámara superior, después el virus bruto concentrado se pipeteó en un tubo de unión a proteína baja y se almacenó a 4 °C. Para la purificación en gradiente de iodixanol, el lisado se filtró a través de un filtro PES Nalgene Rapid-Flow de 0.2 μm . El medio que contenía AAV se concentró por separado mediante filtración de flujo tangencial y diafiltración con 1xPBS suplementado con Pluronic F-68 al 0.001 %. Los lisados clarificados o el medio concentrado se cargaron en un gradiente de iodixanol discontinuo y se centrifugaron a 29,600 rpm durante 16 a 18 horas a 10 °C mediante el uso de un rotor SW 32 Ti. Las fracciones de virus se eliminaron de la interfaz entre las soluciones de iodixanol al 40 y 60 por ciento y se intercambiaron en 1xPBS suplementado con Pluronic F-68 al 0.001 % mediante el uso de filtros ultra centrífugos Amicon con un límite de peso molecular nominal de 100 KDa. El título (genomas de vector por mililitro vg/ml) se determinó mediante qPCR mediante el uso de una curva estándar de un virus de concentración conocida.

Infección/transducción celular y análisis por citometría de flujo/luminiscencia

Para infectar las células, las partículas virales se adicionaron directamente a los medios de las células en cultivo, y la mezcla se incubó durante toda la noche a 37 °C. Para las transducciones con el lisado bruto, el medio en cada pocillo se sustituyó 24 horas más tarde, y las células se incubaron durante 3-5 días. Para evaluar la expresión de GFP, el día 3, 4 o 5 después de la infección, las células se tripsinizaron, se resuspendieron en PBS con FBS al 2 %, y el porcentaje de células GFP+ se recolectó en un citómetro de flujo BD FACSCanto y se analizó mediante el uso del programa informático FlowJo. Para la evaluación de la expresión de NanoLuc, el día 2 o 3 después de la infección, las células se lisaron en tampón de lisis pasivo 1x (Promega) y se incubaron con el reactivo de ensayo de luciferasa Nano-Glo. La luminiscencia se evaluó mediante el uso de un lector de placas SpectraMax.

Ensayo de neutralización en la presencia de IgG

Las partículas virales se mezclaron con concentraciones crecientes de IgG humana purificada preparada en PBS, y la mezcla de partículas virales e IgG se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir la unión. Para infectar las células, las partículas virales se adicionaron directamente a los medios de las células en cultivo, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 2 días. El día 2 después

de la infección, se midió la expresión de Nanoluc mediante el uso de un ensayo de luciferasa Nanoglo (Promega) y los datos de RLU se recopilaron en un lector de placas (PerkinElmer).

Análisis de transferencia Western

La reacción entre las proteínas VP1, VP2 y VP3 de AAV etiquetadas con Spy y los anticuerpos o scFv etiquetados con SpyCatcher se monitoreó mediante análisis de transferencia Western. Se 5
adicionó tampón de muestra SDS Tris-Glicina Novex® con agente reductor a volúmenes iguales de preparaciones de virus en bruto, y las muestras se calentaron hasta 85 °C durante 5 minutos, después se enfriaron a temperatura ambiente y se cargaron en un gel de Tris-Glicina al 4-12 % 10
profundido (Invitrogen). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE reductora y se transfirieron a PVDF mediante una transferencia en húmedo. Las membranas se bloquearon con leche al 5 % y se marcaron con una sonda con el anticuerpo monoclonal B1 de ratón (ARP American Research Products, Inc.) diluido 1:100 en TBST durante toda la noche a 4 °C. Las transferencias se lavaron en TBST, se marcaron con una sonda con un anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón y se detectaron mediante el uso de los reactivos de detección quimioluminiscentes 15
en un generador de imágenes Bio-Rad ChemiDoc MP.

Análisis de la tinción de proteínas

La expresión relativa de las proteínas VP1, VP2 y VP3 de AAV se controló mediante análisis de tinción de proteínas de geles de SDS-PAGE. Se prepararon las muestras de AAV mediante el uso de tampón de muestra NuPAGE LDS y agente reductor (Invitrogen) de acuerdo con las 20
instrucciones del fabricante. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos, luego se enfriaron a temperatura ambiente y se cargaron en un gel NuPAGE Bis-Tris comercial al 4-12 % (Invitrogen). Después de la separación de proteínas, los geles se fijaron en metanol al 50 %; ácido acético al 7 %, se tiñeron en gel colorante SYPRO Ruby (Invitrogen) y se lavaron en metanol al 10 %; ácido acético al 7 %. Las imágenes del gel se capturaron en un generador de imágenes Bio-Rad 25
ChemiDoc MP.

Ejemplo 1. Las partículas quiméricas de AAV de no primate pueden producirse y purificarse mediante cromatografía por afinidad.

Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de una placa de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

30	pAd auxiliar	8 µg
	pAAV-UbC-luciferasa de luciérnaga	4 µg
	construcción de plásmido pRep Cap	4 µg

Las construcciones del plásmido Rep Cap incluyen:

pRep2 Cap AAV2 VP1 AAV VP2 VP3

pRep2 Cap AAV2 VP1 de lobo marino VP2 VP3

pRep2 Cap AAV2 VP1 de dragón barbudo VP2 VP3

5 Las preparaciones de virus en bruto se purificaron después mediante cromatografía por afinidad, y se evaluaron las proteínas de la cápside presentes al inicio, el flujo continuo (FT) y las fracciones de elución, mediante transferencia Western (**Figura 2**). Las proteínas de la cápside de los tres virus estaban presentes en la columna de cromatografía inicial, se redujeron en el flujo continuo, y estaban presentes en la fracción de elución, lo que sugiere que el enfoque de cromatografía de columna por afinidad que se usó para purificar las cápsides derivadas de primates, tales como AAV2, también puede utilizarse para la purificación de AAV de no primates.

En cada uno de los siguientes ejemplos, el plásmido pRep2 Cap AAV2 VP1 AAV VP2 VP3, que comprende el gen *rep* de AAV2 y un gen *cap* quimérico que codifica una proteína de la cápside VP1 quimérica que comprende la región VP1-u de AAV2 enlazada operativamente a la región común VP1/VP2 del AAV, una proteína de la cápside VP2 de AAV, y una proteína de la cápside VP3 de AAV, se denota como “pAAV R2Cap AAV2/AAV.” El plásmido pRep2 Cap AAV2 VP1 de lobo marino VP2 VP3, que comprende el gen *rep* de AAV2 y un gen *cap* quimérico que codifica una proteína de la cápside VP1 quimérica que comprende la región VP1-u de AAV2 enlazada operativamente con la región común VP1/VP2 del AAV de lobo marino, la proteína de la cápside VP2 de lobo marino, y la proteína de la cápside VP3 de lobo marino, se denota como “pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino.” El plásmido pRep2 Cap AAV2 VP1 de dragón barbudo VP2 VP3, que comprende el gen *rep* de AAV2 y un gen *cap* quimérico que codifica una proteína de la cápside VP1 quimérica que comprende la región VP1-u de AAV2 enlazada operativamente con la región común VP1/VP2 del AAV de dragón barbudo, la proteína de la cápside VP2 de dragón barbudo, y la proteína de la cápside VP3 de dragón barbudo, se denota como “pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino.”

Ejemplo 2. Las inserciones de péptidos en la región VP3 de las cápsides de AAV de ave se toleran bien y pueden mediar la unión covalente de anticuerpos a partículas virales a través de SpyCatcher-SpyTag.

30 Los sitios de inserción de péptidos potenciales dentro del bucle variable aparente IV y el bucle variable VIII del AAV de ave se predijeron mediante el uso de modelado PyMol (Figura 3A) y se clonaron las construcciones de inserción de SpyTag correspondientes. Se generó cada virus como

se describió anteriormente mediante la transfección de una placa de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

	pAd auxiliar	16 µg
	pAAV-CAG-GFP	8 µg
5	pAAV R2CapX	8 µg
	Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:	
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV sin SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV G444 Enlazador6 SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV K580 Enlazador6 SpyTag	
10	o	
	pAd auxiliar	16 µg
	pAAV-CAG-GFP	8 µg
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV sin SpyTag	6.7 ug
	CON	
15	pAAV R2Cap AAV2/AAAV G444 Enlazador6 SpyTag	1.3 µg
	O	
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV K580 Enlazador6 SpyTag	1.3 µg

Las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que carecen de inserciones de SpyTag, así como también las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que presentan inserciones de SpyTag en diversas posiciones dentro de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se empaquetaron con genomas de AAV que contienen ITR2. En un esfuerzo por entender si las cápsides quiméricas de AAV2/AAAV pueden formarse con éxito y empaquetarse con genomas que contienen ITR de AAV2, se realizó PCR cuantitativa para medir el título (cantidad de genomas por mililitro o vg/ml) de las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que presentan inserciones de SpyTag con respecto a las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que carecen de inserciones de SpyTag (**Figura 3B**). Los títulos medidos demuestran que las partículas quiméricas de AAV2/AAAV pueden empaquetarse con genomas con ITR de AAV2. El título de las partículas quiméricas de AAV2/AAAV fue similar entre las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que carecían de inserciones de SpyTag y las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que presentaban inserciones de SpyTag.

A continuación, las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que carecían de inserciones de SpyTag y las partículas quiméricas de AAV2/AAAV que presentaban inserciones de SpyTag con y sin un anticuerpo marcado con SpyCatcher que se une a ASGR1. La reacción entre las proteínas VP1, VP2 y VP3 quiméricas AAV2/AAAV marcadas con SpyCatcher y las cadenas pesadas anti-ASGR1 marcadas con SpyCatcher se controló mediante transferencia Western; Las proteínas de la cápside marcadas con SpyTag que han reaccionado con el anticuerpo marcado con SpyCatcher exhiben un aumento de tamaño por SDS-PAGE. En presencia de mAb anti-ASGR1 marcado con SpyCatcher, las proteínas de la cápside quiméricas de AAV2/AAAV quiméricas marcadas con SpyTag mostraron un aumento en el tamaño aparente según la transferencia Western en comparación con las proteínas de la cápside de AAV marcadas solo con SpyTag (**Figura 3C**). Esto indicó que las partículas quiméricas de AAV2/AAAV marcadas con SpyTag pudieron formar con éxito un enlace covalente con los mAb anti-ASGR1 marcados con SpyCatcher.

Ejemplo 3. Las inserciones de péptidos en la región VP3 de las cápsides de AAV de lobo marino se toleran bien y pueden mediar la unión covalente de anticuerpos a partículas virales a través de SpyCatcher-SpyTag.

Los sitios de inserción de péptidos potenciales dentro del bucle variable aparente IV y el bucle variable VIII del AAV de lobo marino se predijeron mediante el uso de modelado PyMol (Figura 4A) y se clonaron las construcciones de inserción de SpyTag correspondientes. Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de una placa de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

pAd auxiliar	8 µg
pAAV-CAG-GFP	4 µg
pAAV R2CapX	4 µg

Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:

- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino sin SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino N429 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino P430 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino T431 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino G432 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino S433 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino T434 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino R436 Enlazador6 SpyTag

pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino D437 Enlazador6 SpyTag
pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino A565 Enlazador6 SpyTag

o

	pAd auxiliar	8 µg
5	pAAV-CMV-GFP	4 µg
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino sin SpyTag	3.3 ug
	CON	
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino G432 Enlazador6 SpyTag	0.7 µg

O

10	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino A565 Enlazador6 SpyTag	0.7 µg
----	---	--------

Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecen de inserciones de SpyTag, así como también las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentan inserciones de SpyTag en diversas posiciones dentro de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se empaquetaron con genomas de AAV que contienen ITR2. En un esfuerzo por entender si las cápsides quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino pueden formarse con éxito y empaquetarse con genomas que contienen ITR de AAV2, se realizó PCR cuantitativa para medir el título (cantidad de genomas por mililitro o vg/ml) de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentan inserciones de SpyTag con respecto a las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecen de inserciones de SpyTag (**Figura 4B, 5A**). Los títulos medidos demuestran que las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecen de inserciones de SpyTag pueden empaquetarse con genomas con ITR de AAV2. El título fue similar entre las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecían de SpyTag y las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentaban una inserción de SpyTag en las posiciones N429, P430, T431, G432, S433, R436 y D437, pero las inserciones de SpyTag en la posición T434 o la posición A565 no fueron bien toleradas por las partículas de AAV2/AAV de lobo marino y produjeron títulos deficientes.

A continuación, se incubaron las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecían de SpyTag y las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentaban inserciones de SpyTag con y sin un anticuerpo marcado con SpyCatcher que se une a HER2. La reacción entre las proteínas VP1, VP2 y VP3 quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino marcadas con SpyTag y las cadenas pesadas anti-HER2 marcadas con SpyCatcher se controló mediante transferencia Western; Las proteínas de la cápside marcadas con SpyTag que han reaccionado con

el anticuerpo marcado con SpyCatcher exhiben un aumento de tamaño por SDS-PAGE. En presencia de mAb anti-HER2 marcado con SpyCatcher, todas las proteínas de la cápside quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino marcadas con SpyTag detectable presentaron un aumento en el tamaño aparente según la transferencia Western en comparación con las proteínas de la cápside quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino marcadas solo con SpyTag (**Figura 4C, 5B**). Esto indicó que las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino marcadas con SpyTag pudieron formar con éxito un enlace covalente con los mAb anti-HER2 marcados con SpyCatcher. Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino marcadas con SpyTag con títulos medidos bajos (inserciones de SpyTag en T434 y A565) no presentaron ninguna proteína detectable en la transferencia Western (**Figura 4C, 5B**).

Ejemplo 4. Las inserciones de péptidos en la región VP3 de las cápsides de AAV de dragón barbudo se toleran bien y pueden mediar la unión covalente de anticuerpos a partículas virales a través de SpyCatcher-SpyTag.

Los sitios de inserción de péptidos potenciales dentro del bucle variable aparente IV y el bucle variable VIII del AAV de ave se predijeron mediante el uso de modelado PyMol (Figura 6A) y se clonaron las construcciones de inserción de SpyTag correspondientes. Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de una placa de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

pAd auxiliar	8 µg
pAAV-CMV-GFP	4 µg
pAAV R2CapX	4 µg

Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:

- pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo sin SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo G436 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo T573 Enlazador6 SpyTag

o

pAd auxiliar	8 µg
pAAV-CMV-GFP	4 µg
pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo sin SpyTag	3.3 µg

CON

pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo G436 Enlazador6 SpyTag	0.7 µg
--	--------

O

pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo T573 Enlazador6 SpyTag 0.7 µg

Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecen de SpyTag, así como también las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que presentan inserciones de SpyTag en diversas posiciones dentro de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se empaquetaron con genomas de AAV que contienen ITR2. En un esfuerzo por entender si las cápsides quiméricas de AAV2/de dragón barbudo pueden formarse con éxito y empaquetarse con genomas que contienen ITR de AAV2, se realizó PCR cuantitativa para medir el título (cantidad de genomas por mililitro o vg/ml) de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que presentan inserciones de SpyTag con respecto a las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecen de SpyTag (**Figura 6B**). Los títulos medidos demuestran que las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo pueden empaquetarse con genomas con ITR de AAV2. El título de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que presentaban inserciones de SpyTag fue menor que el de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecían de SpyTag.

A continuación, las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecían de SpyTag y las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que presentaban inserciones de SpyTag se incubaron con y sin un anticuerpo marcado con SpyCatcher que se une a HER2. La reacción entre las proteínas VP1, VP2 y VP3 quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo marcadas con SpyTag y las cadenas pesadas anti-HER2 marcadas con SpyCatcher se controló mediante transferencia Western; Las proteínas de la cápside marcadas con SpyTag que han reaccionado con el anticuerpo marcado con SpyCatcher exhiben un aumento de tamaño por SDS-PAGE. En presencia de mAb anti-HER2 marcado con SpyCatcher, las proteínas de la cápside quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo marcadas con SpyTag presentaron un aumento en el tamaño aparente según la transferencia Western en comparación con las proteínas de la cápside quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo marcadas solo con SpyTag (**Figura 6C**). Esto indicó que las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo marcadas con SpyTag pudieron formar con éxito un enlace covalente con los mAb anti-HER2 marcados con SpyCatcher.

Ejemplo 5. La conjugación de un anticuerpo con un péptido insertado en la cápside de AAV de ave en el residuo G444 o K580 dirige el direccionamiento específico del antígeno in vitro.

Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de una placa de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

o		
	pAd auxiliar	16 µg
	pAAV-CAG-GFP	8 µg
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino sin SpyTag	4 ug
5	CON	
	pAAV R2CapX	4 ug
Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:		
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino N429 Enlazador6 SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino P430 Enlazador6 SpyTag	
10	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino T431 Enlazador6 SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino G432 Enlazador6 SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino S433 Enlazador6 SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino R436 Enlazador6 SpyTag	
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino D437 Enlazador6 SpyTag	
15	CON O SIN	
	Plásmido de cadena pesada Vh fusionado con SpyCatcher	1.5 µg
	Plásmido de cadena ligera Vk	3 ug
Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecían de SpyTag, así como también las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentaban una inserción de		
20	SpyTag en la posición G432 dentro de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se produjeron en presencia o ausencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que codifican SpyCatcher-anti-GLP1R, un anticuerpo que se une a GLP1R y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada, SpyCatcher-Herceptina, un anticuerpo que se une a HER2 y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada, o SpyCatcher-anti-ASGR1, un	
25	anticuerpo que se une a ASGR1 y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada. Las células infectadas con partículas virales como se describió anteriormente se evaluaron mediante el análisis de citometría de flujo para monitorear la transducción. El AAV2/AAV quimérico de lobo marino que presentaba una SpyTag en G432 y conjugado con el anticuerpo que se dirige a HER2 infectó específicamente las células HER2+, y mostró poca infección de fondo de	
30	las células HER2- (Figura 8A), y el AAV2/AAAV quimérico conjugado con el anticuerpo anti-GLP1R de control que no es de direccionamiento mostró poca infección de fondo en cualquier tipo de células (Figura 8A, 8B). El AAV2/AAV quimérico de lobo marino que presentaba una SpyTag	

en G432 y conjugado con el anticuerpo que se dirige a ASGR1 infectó específicamente las células ASGR1+, y mostró poca infección de fondo de las células ASGR1- (**Figura 8B**).

Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecían de SpyTag, así como también un panel de partículas quiméricas de AAV2AAV de lobo marino que presentaban inserciones de SpyTag en varias posiciones dentro del bucle 4 previsto de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se produjeron en presencia o ausencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que codificaba SpyCatcher-Herceptina, un anticuerpo que se une a HER2 y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada. Las células infectadas con partículas virales como se describió anteriormente se evaluaron mediante el análisis de citometría de flujo para monitorear la transducción. Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que presentaban inserciones de SpyTag en muchas posiciones diferentes dentro de la cápside y se conjugaron con el anticuerpo que se dirige a HER2 infectaron específicamente las células HER2+, y las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag mostraron poca infección de fondo de las células HER2+ (**Figura 9**). Esto sugiere que múltiples sitios dentro de la cápside quimérica de AAV2/AAV de lobo marino son susceptibles de inserción de SpyTag y redireccionamiento con el uso del enfoque de anticuerpo fusionado con SpyCatcher.

Ejemplo 7. La conjugación de un anticuerpo con un péptido insertado en la cápside de AAV de dragón barbudo en el residuo G436 o T573 dirige el direccionamiento específico del antígeno in vitro.

Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de una placa de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

pAd auxiliar	8 µg
pAAV-CMV-GFP	4 µg
pAAV R2CapX	4 µg

Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:

- pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo sin SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo G436 Enlazador6 SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo T573 Enlazador6 SpyTag

o

pAd auxiliar	8 µg
pAAV-CMV-GFP	4 µg
pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo sin SpyTag	3.4 ug

CON

pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo G436 Enlazador6 SpyTag 0.6 µg

O

pAAV R2Cap AAV2/de dragón barbudo T573 Enlazador6 SpyTag 0.6 µg

5 CON O SIN 1.5 µg

Plásmido de cadena ligera Vk 3 ug

Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que carecían de SpyTag, así como también las partículas quiméricas de AAV2/AAV de dragón barbudo que presentaban inserciones de SpyTag en varias posiciones dentro de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se produjeron en presencia o ausencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que codifican SpyCatcher-Herceptina, un anticuerpo que se une a HER2 y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada, o SpyCatcher-anti-ASGR1, un anticuerpo que se une a ASGR1 y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada. Las células infectadas con partículas virales como se describió anteriormente se evaluaron mediante el análisis de citometría de flujo para monitorear la transducción. El AAV2/AAV de dragón barbudo quimérico conjugado con el anticuerpo que se dirige a HER2 infectó las células HER2+ (**Figura 10A**). El AAV2/AAV de dragón barbudo quimérico conjugado con el anticuerpo que se dirige a ASGR1 infectó específicamente las células ASGR1+, y mostró poca infección de fondo de las células ASGR1- (**Figura 10B**).

20 **Ejemplo 8. El AAV de ave y el AAV de lobo marino conjugado con anticuerpo pueden infectar las células en presencia de niveles más altos de inmunoglobulinas humanas purificadas que AAV2.**

Para investigar la sensibilidad de las partículas quiméricas de AAV2/AAAV y las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con respecto a la neutralización por parte de los anticuerpos que se encuentran en el suero humano, se realizó un ensayo de neutralización en el cual se incubaron partículas de AAV con cantidades crecientes de IgG (hIgG), preparada a partir de muestras de suero agrupadas de decenas a miles de donantes humanos y que representa una sección transversal de inmunoglobulinas en la población humana.

Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de placas de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

pAd auxiliar 16 µg

pAAV-CMV-Nanoluc 8 µg

	pAnti-hASGR1 SpyCatcher Vh	3 µg
	pAnti-hASGR1 Vk	6 µg
	CON CUALQUIERA DE:	
	pAAV R2C2 N587 Myc	7.5 µg
5	pAAV R2C2 G453 Enlazador10 SpyTag	0.5 µg
	O:	
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV sin SpyTag	5 µg
	pAAV R2Cap AAV2/AAAV K580 Enlazador6 SpyTag	3 µg
	O:	
10	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino sin SpyTag	5 µg
	pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino G432 Enlazador10 SpyTag	3 µg

El AAV2 de mosaico, las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAAV que presentaban inserciones de SpyTag dentro de la cápside, y partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino que presentaban inserciones de SpyTag dentro de la cápside, tal como se enumeró anteriormente, se produjeron en presencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que codifica SpyCatcher-anti-ASGR1, un anticuerpo que se une a hASGR1 y se fusiona con SpyCatcher en el extremo C de la cadena pesada. Las partículas se incubaron después en presencia de concentraciones crecientes de hIgG durante 30 minutos a 37 °C, después la mezcla de partículas virales e hIgG se adicionó a las células que expresan hASGR1. Las células infectadas con partículas virales como se describió anteriormente se evaluaron mediante análisis de luciferasa Nanoglo de citometría de flujo para monitorear la transducción.

La **figura 11A** muestra la actividad bruta de la luciferasa Nanoluc de las células ASGR1+ infectadas con las partículas virales en presencia de la concentración indicada de hIgG. En comparación con las partículas de mosaico de AAV2 conjugadas con los anticuerpos anti-ASGR1, se requiere una cantidad mayor de hIgG para inhibir la infección de las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAAV conjugadas con anticuerpos anti-ASGR1, y se requiere una cantidad incluso mayor de hIgG para inhibir la infección de las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino conjugadas con anticuerpos anti-ASGR1. La **figura 11B** muestra los datos de la luciferasa Nanoluc de la **figura 11A** normalizados a la condición de PBS solo (sin hIgG) para cada serotipo de AAV, con el fin de comparar los tres serotipos de AAV directamente entre sí. Se requieren concentraciones más altas de hIgG para reducir la expresión de la luciferasa Nanoluc de ambas partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAAV conjugadas con anticuerpos

anti-ASGR1 y las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino conjugadas con anticuerpos anti-ASGR1. La concentración de hIgG por pocillo requerida para inhibir la infección en 50 % (valores de IC50) para dos experimentos independientes se muestra en la **figura 11C**. Los valores de IC50 de hIgG para las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAAV conjugadas con anticuerpos anti-ASGR1 y los valores de IC50 de hIgG para las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino conjugadas con anticuerpos anti-ASGR1 son mucho mayores que los valores de IC50 de hIgG para las partículas de mosaico de AAV2 conjugadas con anticuerpos anti-ASGR1. En particular, las partículas quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino parecen no verse afectadas por los anticuerpos humanos, excepto por las concentraciones más altas de hIgG evaluadas.

Ejemplo 9. El AAV de ave puede redirigirse a ASGR1 in vivo.

Para determinar si las partículas virales conjugadas con anticuerpos específicos para ASGR1 pueden redirigirse a las células hepáticas que expresan hASGR1 in vivo, se inyectó de forma intravenosa a ratones modificados genéticamente, de manera que sus células hepáticas expresaran hASGR1 en fondo de C57BL/6, con partículas virales quiméricas de mosaico de AAV2/AAAV que presentaban un gen reportero de luciferasa de luciérnaga, y se conjugó con un anticuerpo específico para hASGR1 o un anticuerpo de control dirigido a GLP1R humano. Un ratón inyectado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sirvió como un control adicional.

Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de placas de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

AAV de ave Anti-GLP1R humano/luciferasa anti-ASGR1 humano		
pAd auxiliar		16 µg
pAAV-UbC-luciferasa de luciérnaga		8 µg
pAAV R2Cap AAV2/AAAV sin SpyTag		5 µg
pAAV R2Cap AAV2/AAAV K580 Enlazador6 SpyTag		3 µg
CON o SIN		
pAnti-hGLP1R o Anti-hASGR1 SpyCatcher Vh		2.5 µg
pAnti-hGLP1R o Anti-hASGR1 Vk		5 µg

La **figura 12** muestra la luminiscencia de los animales 33 días después de la infección, ya sea con PBS, o con las partículas virales quiméricas de mosaico de AAV2/AAAV descritas anteriormente conjugadas con anticuerpos que se dirigen a hASGR1 o hGLP1R como control no dirigido. Los animales vivos se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de

luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de espectro IVIS in vivo (PerkinElmer). La **figura 12A** muestra que la infección con los complejos quiméricos de mosaico de AAV2/AAAV-SpyTag-SpyCatcher-Vh se detectó solo en el hígado de los ratones con expresión de hASGR1 inyectados con AAV2/AAAV quimérico de mosaico redirigido a hASGR1 y no se detectó en el hígado de los ratones con expresión de hASGR1 inyectados con PBS o AAV2/AAAV quimérico de mosaico redirigido a hASGR1 de control no dirigido. La radiancia promedio de la señal de luciferasa de luciérnaga que se detectó a partir de los ratones vivos mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de espectro IVIS in vivo (PerkinElmer) se cuantificó en la **figura 12B**, y la radiancia de los órganos individuales a los que se tomaron imágenes ex-vivo luego de la disección de los ratones infectados se cuantificó en la **figura 12C**. Estas figuras demuestran que el AAV2/AAAV quimérico de mosaico transduce específicamente el hígado de ratones que expresan hASGR1 solamente cuando se conjuga con un anticuerpo específico para hASGR1.

Ejemplo 10. El AAV de lobo marino transduce el hígado y pulmón in vivo en ratones.

Para determinar si las partículas virales conjugadas con anticuerpos específicos para ASGR1 pueden redirigirse a las células hepáticas que expresan hASGR1 in vivo, se inyectó de forma intravenosa a ratones modificados genéticamente, de manera que sus células hepáticas expresaran hASGR1 en fondo de C57BL/6, con partículas virales quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino que presentaban un gen reportero de luciferasa de luciérnaga, y se conjugó con un anticuerpo específico para hASGR1 o un anticuerpo de control dirigido a GLP1R humano. Un ratón inyectado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sirvió como un control adicional. Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de placas de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

AAV de lobo marino Anti-GLP1R Humano/Luciferasa anti-ASGR1 Humano

pAd auxiliar	16 µg
pAAV-UbC-luciferasa de luciérnaga	8 µg
pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino sin SpyTag	5 µg
pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino G432 Linker10 SpyTag	3 ug
CON o SIN	
pAnti-hGLP1R o Anti-hASGR1 SpyCatcher Vh	2.5 µg
pAnti-hGLP1R o Anti-hASGR1 Vk	5 µg

La **figura 13** muestra la luminiscencia de los animales 33 días después de la infección, ya sea con PBS, o con las partículas virales quiméricas de mosaico de AAV2/AAV de lobo marino descritas anteriormente conjugadas con anticuerpos que se dirigen a hASGR1 o hGLP1R como control no dirigido. Los animales vivos se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de espectro IVIS in vivo (PerkinElmer). La **figura 13A** muestra que la infección con los complejos quiméricos de mosaico de AAV2/AAA de lobo marino-SpyTag-SpyCatcher-Vh se detectó en ratones con expresión de hASGR1 inyectados con AAV2/AAV de lobo marino quimérico redirigido a hASGR1 y el AAV2/AAV de lobo marino quimérico de mosaico redirigido a hGLP1R de control no dirigido. Esto sugiere que el AAV2/AAV de lobo marino quimérico es capaz de transducir naturalmente el hígado y otros órganos de los ratones sin la ayuda de un anticuerpo de redireccionamiento. La radiancia promedio de la señal de luciferasa de luciérnaga que se detectó a partir de los ratones vivos mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de espectro IVIS in vivo (PerkinElmer) se cuantificó en la **figura 13B**, y la radiancia de los órganos individuales a los que se tomaron imágenes ex-vivo luego de la disección de los ratones infectados se cuantificó en la **figura 13C**. Estas figuras demuestran que el AAV2/AAV de lobo marino quimérico de mosaico transduce el hígado y los pulmones de los ratones que expresan hASGR1 cuando se conjuga con un anticuerpo específico para hASGR1 o un anticuerpo de control específico para hGLP1R no dirigido.

Ejemplo 11. El AAV2AAV de lobo marino quimérico presenta algún tropismo natural en el oído interno de ratón.

Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de placas de 15 cm de células de empaquetamiento 293T con los siguientes plásmidos y cantidades:

pAd auxiliar	16 µg
pAAV-CAG-GFP	8 µg
pAAV R2Cap AAV2/de lobo marino sin SpyTag	8 µg

Para determinar si el AAV2/AAV de lobo marino quimérico tiene un tropismo natural para tejidos particulares en el ratón, se disecó el órgano de corte de un ratón neonatal, se cultivó ex vivo, luego, se usaron partículas virales de AAV2/AAV de lobo marino para infectar el cultivo. Tres días después de la infección, las células pilosas cocleares se tiñeron de rojo con Myo7a, y el virus expresó GFP como un marcador de transducción. Se observó una transducción robusta de

múltiples tipos de células (**Figura 14**), lo que sugiere que las partículas quiméricas de AAV2/AAV lobo marino son naturalmente capaces de transducir el oído interno.

Ejemplo 12. El reemplazo del epítipo B1 de las cápsides quiméricas AAV2 /AAV de lobo marino parcial o totalmente con la secuencia homóloga de AAV de lobo marino es bien tolerado y mejora la eficiencia de la transducción.

Se realizaron modificaciones dentro del epítipo B1 de quimeras de AAV2/lobo marino (**Figura 15A**) y la secuencia del epítipo B1 se reemplazó en Y730 o de I705 a H712 con una secuencia de cápside homóloga de lobo marino. Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección cinco, diez o veinte placas de 15 cm de células empaquetadoras HEK 293T con los siguientes plásmidos y cantidades por placa:

pAd auxiliar	12 µg
--------------	-------

pAAV-CMV-X	6 µg
------------	------

Las construcciones de pAAV-CMV-X incluyen:

pAAV-CMV-NanoLuc Luciferasa

pAAV-CMV-Luciferasa de luciérnaga

pAAV R2CapX	10 µg
-------------	-------

Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:

pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag

pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag/Y730F

pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag//Sin B1

Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino que carecen de inserciones de SpyTag y que contienen una modificación de la secuencia del epítipo B1 dentro de la cápside como se enumera anteriormente se empaquetaron con genomas de AAV que contienen ITR2. En un esfuerzo por entender si las cápsides quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con epítopos de B1 modificados pueden formarse con éxito y empaquetarse con genomas que contienen ITR de AAV2, se realizó PCR cuantitativa para medir el título (cantidad de genomas por mililitro o vg/ml) de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con epítipo B1 con relación a las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con modificaciones del epítipo B1 (**Figura 15B**). Los títulos medidos demuestran que las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con modificaciones del epítipo B1 pueden empaquetarse con genomas de ITR de AAV2. El título de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino fue similar entre las partículas quiméricas de AAV2/lobo marino con o sin modificaciones del epítipo B1.

Se monitoreó la presencia de VP1, VP2 y VP3 en partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con epítomos B1 modificados mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas. Los resultados indicaron que la proporción de expresión de VP1 en relación con VP2 y VP3 fue mayor en las partículas virales AAV2/AAV de lobo marino en las que el epítomo B1 había sido reemplazado por completo con la secuencia homóloga de la cápside de AAV de lobo marino que en las partículas virales AAV2/AAV de lobo marino con el epítomo B1 o una mutación Y730F en el epítomo B1 (**Figura 15C**). Esta observación se correlacionó con un aumento en la eficiencia de transducción de las células HEK 293T según lo determinado por la actividad de la luciferasa NanoLuc (**Figura 15D**).

Para determinar si el aumento en la eficiencia de transducción de las partículas de AAV2/AAV de lobo marino con el epítomo B1 reemplazado por completo con la secuencia de AAV de lobo marino se reprodujo in vivo, se inyectaron ratones C57BL/6 por vía intravenosa con partículas quiméricas de AAV2/lobo marino que portaban un gen reportero de luciferasa de luciérnaga. Un ratón inyectado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sirvió como un control adicional.

La figura 16 muestra datos de luminiscencia de animales 34 días después de la inyección con PBS o partículas virales quiméricas de AAV2/lobo marino como se describió anteriormente. Los animales vivos se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de espectro IVIS in vivo (PerkinElmer). Se cuantificó la radiancia promedio de los órganos individuales obtenidos ex vivo tras la disección de los ratones infectados. La figura muestra que los AAV2/AAV de lobo marino quiméricos transducen el hígado y los pulmones. Los AAV2/AAV de lobo marino que contienen modificaciones del epítomo B1 en el que se reemplaza por completo con una secuencia de cápside homóloga de AAV de lobo marino han expandido el tropismo hacia el corazón y la transducción ligeramente mejorada en el hígado y los pulmones.

Ejemplo 13. Se tolera bien el ajuste de la interfaz quimérica entre AAV2 y las secuencias de la cápside de AAV de lobo marino o el uso de secuencias de la cápside compuestas en su totalidad por las de AAV de lobo marino.

Se realizaron modificaciones para ajustar la interfaz quimérica entre las secuencias de la cápside de AAV2 y de lobo marino para generar transcripciones en las que las secuencias únicas de VP1 y VP2 se derivaron de AAV2 o AAV de lobo marino o una de sus combinaciones (**Figura 17**). Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de cinco, diez o veinte

placas de 15 cm de células empaquetadoras HEK 293T con los siguientes plásmidos y cantidades por placa:

	pAd auxiliar	12 µg
	pAAV-CMV-NanoLuc Luciferasa	6 µg
5	pAAV R2CapX	10 µg

Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:

- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag v2
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag v3
- 10 pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag v4
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag v5

Las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con interfaces alternativas entre las secuencias de cápside quiméricas de AAV2 y AAV de lobo marino como se enumeran anteriormente se empaquetaron con genomas de AAV que contienen ITR2. En un esfuerzo por comprender si estas cápsides quiméricas alternativas de AAV2/lobo marino pueden formarse y empaquetarse con éxito con genomas que contienen ITR de AAV2, se realizó una PCR cuantitativa para medir el título (número de genomas de vector por mililitro o vg/ml) de partículas virales purificadas del lisado o del sobrenadante (**Figura 18A**). Los títulos medidos demuestran que las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con interfaces quiméricas alternativas pueden empaquetarse con genomas con genomas ITR de AAV2. El título de las partículas quiméricas de AAV2/AAV de lobo marino con excepción de v3 fue similar entre las partículas quiméricas de AAV2/lobo marino purificadas a partir de lisado. El título de partículas de AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag v5 purificadas del medio fue ligeramente superior al título purificado del lisado. La eficiencia de transducción de las células HEK 293T determinada por la actividad NanoLuc Luciferasa de las partículas quiméricas AAV2/AAV de lobo marino fue comparable entre las ubicaciones de interfaz alternativas (**Figura 18B y 18C**).

La secuencia del epítipo B1 se modificó a una secuencia de cápside de lobo marino completamente homóloga en quimeras de AAV2/lobo marino con sitios de interfaz alternativos para determinar si las modificaciones de B1 mejorarían la transducción de manera similar como lo había hecho para AAV2/ AAV de lobo marino sin SpyTag. Se generó cada virus como se describió anteriormente mediante la transfección de cinco, diez o veinte placas de 15 cm de células empaquetadoras HEK 293T con los siguientes plásmidos y cantidades por placa:

pAd auxiliar	12 µg
pAAV-CMV-Luciferasa de luciérnaga	6 ug
pAAV R2CapX	10 µg

Las construcciones de pAAV R2CapX incluyen:

- 5 pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag/Sin B1 v2
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag/Sin B1 v3
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag/Sin B1 v4
- pAAV R2Cap AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag/Sin B1 v5

10 Para determinar si el aumento en la eficiencia de transducción de partículas de AAV2/lobo marino quiméricas alternativas de AAV con el epítipo B1 reemplazado por completo con la secuencia de AAV de lobo marino dio como resultado una transducción mejorada in vivo, se inyectaron ratones C57BL/6 por vía intravenosa con partículas quiméricas de AAV2/lobo marino portador de un gen reportero de luciferasa de luciérnaga. Un ratón inyectado con solución salina tamponada con

15 fosfato (PBS) sirvió como un control adicional.

La figura 18D muestra los datos de luminiscencia de animales 46 días después de la inyección con PBS o partículas virales quiméricas de AAV2/lobo marino como se describió anteriormente. Los animales vivos se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, se inyectaron con un sustrato de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 minutos más tarde mediante el uso del sistema de obtención

20 de imágenes de espectro IVIS in vivo (PerkinElmer). Se cuantificó la radiancia de los órganos individuales fotografiados ex vivo después de la disección de los ratones infectados. La figura muestra que los AAV quiméricos de AAV2/lobo marino transducen el hígado, los pulmones y el corazón. La capacidad de AAV2/AAV de lobo marino sin SpyTag/Sin B1 v5 (SEQ ID NO: 71) para transducir tejidos indica que, además de las partículas quiméricas de la cápside de

25 AAV2/AAV de lobo marino, una partícula de la cápside de AAV compuesta en su totalidad por cápsides de lobo marino (proteínas de la cápside no quiméricas) pueden funcionar como un vector de transferencia génica.

Si bien la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a una serie de modalidades, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse cambios en la forma y los

30 detalles de las diversas modalidades descritas en la presente descripción sin apartarse del espíritu y alcance de la invención y que las diversas modalidades descritas en la presente descripción no pretenden actuar como limitaciones en el alcance de las reivindicaciones. Aunque cualquiera de los

métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación, se describirán los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones citadas en la presente descripción se incorporan en la presente descripción como referencia para describir en su totalidad. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

10

15

20

25

30