

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de la cápside AAV que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de AAV VP3 de una proteína de cápside de AAV aviar (AAAV), una proteína de cápside de AAV de león marino o una proteína de cápside de AAV de escamoso,

en donde la proteína de la cápside de AAV es modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína:proteína.

2. La proteína de cápside de AAV de la reivindicación 1, en la que la proteína de cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos de región común VP1/VP2 de la proteína de cápside de AAAV, la proteína de cápside de AAV de león marino o la proteína de cápside de AAV de escamoso.

3. La proteína de cápside de AAV de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que la proteína de cápside de AAV de escamoso es una proteína de cápside de AAV de dragón barbudo.

4. La proteína de cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos de AAV no quimérica o en la que la proteína de cápside de AAV comprende una región única VP1 de una proteína de cápside de AAV de primate.

5. La proteína de la cápside de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el primer miembro del par de unión proteína: proteína está flanqueado por un primer y/o un segundo enlazador que enlaza el primer miembro de el par de unión proteína: proteína con la proteína de la cápside de AAV, y en donde cada uno del primer y/o el segundo enlazador tiene, independientemente, al menos un aminoácido de longitud.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

6. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer y el segundo enlazadores no son idénticos.
7. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer y el segundo enlazadores son idénticos y tienen 10 aminoácidos de longitud.
8. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la proteína de la cápside de AAV comprende además un segundo miembro cognado del par de unión proteína: proteína.
9. La proteína de cápside de AAV de la reivindicación 8, en donde el primer miembro y segundo miembro se unen mediante un enlace covalente.
10. La proteína de cápside AAV de la reivindicación 9, en donde el enlace covalente es un enlace isopeptídico.
11. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el primer miembro del par de unión proteína: proteína comprende SpyTag.
12. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el segundo miembro cognado comprende SpyCatcher.
13. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el segundo miembro cognado comprende KTag.
14. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es KTag y el segundo miembro cognado comprende SpyTag.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

15. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es SnoopTag y el segundo miembro cognado comprende SnoopCatcher.
16. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es isopeptag y el segundo miembro cognado comprende Pilin-C.
17. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es SpyTag002 y el segundo miembro cognado comprende SpyCatcher002.
18. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en donde el segundo miembro cognado se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento.
19. La proteína de cápside AAV de la reivindicación 18, en donde el ligando de direccionamiento es un resto de unión.
20. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el resto de unión es un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este.
21. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este se fusiona a SpyCatcher.
22. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 20 o reivindicación 21, en donde el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, se fusiona con un enlazador en el extremo C, y el enlazador se fusiona con SpyCatcher en el extremo C del enlazador.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

23. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el enlazador comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO: 49 (GSGESG).

24. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV.

25. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 24, en donde la modificación está en la posición I-444 o I-580 de la proteína de la cápside de un AAV VP1.

26. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV de escamoso.

27. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 26, en donde la proteína de AAV de escamoso es una proteína de cápside de AAV de dragón barbudo.

28. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 26 o reivindicación 27, en donde la modificación está en la posición I-573 o I-436 de la proteína de la cápside AAV VP1.

29. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV de lobo marino.

30. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 29, en donde la modificación está en una posición seleccionada del grupo que consiste en I-429, I-430, I-431, I-432, I-433, I-434, I-436, I-437, y A565 de la proteína de cápside AAV VP1 de lobo marino.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

31. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8,
 - (b) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10,
 - (c) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12,
 - (d) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14,
 - (e) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16,
 - (f) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18,
 - (g) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20,
 - (h) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22,
 - (i) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24,
 - (j) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26,
 - (k) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28,
 - (l) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30,
 - (m) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32,
 - (n) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34,
 - (o) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36,
 - (p) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las porciones de AAV VP2 y/o AAV VP3 de las secuencias de aminoácidos establecidas en cualquiera de (a)-(o).
32. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable.
33. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la etiqueta detectable comprende c-myc (SEQ ID NO: 44).
34. Una cápside de AAV que comprende la proteína de cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-33.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

35. La cápside de AAV de la reivindicación 34 en donde la cápside de AAV es un mosaico de cápside de AAV que comprende una proteína de cápside de AAV de referencia que carece del primer miembro del par de unión proteína:proteína.

36. Una partícula de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la capsida de AAV de la reivindicación 34 o la reivindicación 35.

37. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la cápside de AAV de la reivindicación 34 o la reivindicación 35.

38. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 37, en donde el gen *cap* se enlaza operativamente a un promotor.

39. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicho promotor dirige la expresión de la proteína de cápside de AAV en una célula de empaquetamiento.

40. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste de p40, SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.

41. La proteína de cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 4-33 o la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-40, en donde la proteína de la cápside del AAV comprende una región única VP1 de una proteína de la cápside del AAV de primate, en donde el AAV de primate se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 .

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

42. La proteína de cápside de AAV o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 41, en donde el AAV primate es AAV2.

43. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-42, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en

- (a) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7,
- (b) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 9,
- (c) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 11,
- (d) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 13,
- (e) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 15,
- (f) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 17,
- (g) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 19,
- (h) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 21,
- (i) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 23,
- (j) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 25,
- (k) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 27,
- (l) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 29,
- (m) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 31,
- (n) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 33,
- (o) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 35,
- (p) cualquier porción de la secuencia de nucleótidos de (a)-(o) que codifica una proteína de la cápside VP2 de AAV y/o una proteína de la cápside VP3 de AAV.

44. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 37-43, que comprende además un gen *rep* de AAV que codifica una o más proteínas Rep de AAV y se enlaza operativamente a un promotor.

45. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en p5, p19 SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

46. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 44 o la reivindicación 45, en donde las una o más proteínas Rep se seleccionan de Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.

47. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en donde las una o más proteínas Rep comprenden Rep78.

48. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en donde las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal primate.

49. Una célula de empaquetamiento para producir partículas de AAV que comprenden la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-48.

50. Un método de producción de una partícula AAV que comprende cultivar una célula de empaquetamiento según la reivindicación 49 en condiciones suficientes para la producción de partículas AAV.

51. El método de la reivindicación 50, que comprende además uno o más de los siguientes pasos:

- a. limpiar los restos celulares
- b. tratar el sobrenadante que contiene partículas AAV con Benzonasa o DNasa I y $MgCl_2$,
- c. concentración de las partículas AAV
- d. purificación de las partículas AAV, y
- e. cualquier combinación de a.-d.

52.El método de la reivindicación 51, en el que además las partículas AAV son partículas AAV autocomplementarias y/o se aíslan del sobrenadante de cultivo.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

53. La célula de empaquetamiento de la reivindicación 49 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 50-52, en el que la célula de empaquetamiento comprende además un plásmido ayudante y/o un plásmido de transferencia.

54. Una partícula AAV fabricada según el método de cualquiera de las reivindicaciones 50-53.

55. La partícula de AAV de la reivindicación 36 o la reivindicación 54, la célula de empaquetamiento de la reivindicación 49, 52 o 53, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, que comprende además la partícula de AAV o la célula de empaquetamiento comprenden un polinucleótido flanqueado por una primera secuencia de nucleótidos de una repetición terminal invertida (ITR) de AAV, que es reconocida por una o más proteínas Rep.

56. La partícula AAV, la célula de empaquetamiento o el método de la reivindicación 55, en los que el polinucleótido está comprendido en un plásmido de transferencia.

57. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de acuerdo con la reivindicación 55 o la reivindicación 56, en donde el polinucleótido está flanqueado además por una segunda secuencia de nucleótidos de ITR del mismo AAV que la primera secuencia de nucleótidos de ITR de AAV.

58. La partícula AAV, célula de empaquetamiento o método de la reivindicación 55 o la reivindicación 56, en donde el polinucleótido está flanqueado además por una segunda secuencia de nucleótidos ITR de AAV, en la que la segunda secuencia de nucleótidos ITR de AAV y la primera secuencia de nucleótidos ITR de AAV son de AAV diferentes.

59. La partícula AAV, la célula de empaquetamiento o el método de la reivindicación 57 o la reivindicación 58, en donde la segunda secuencia de nucleótidos ITR de AAV es una secuencia de nucleótidos ITR de AAV de animales primates.

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

60. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, en donde el polinucleótido de interés es un gen reportero.

61. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el gen reportero codifica 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, mCitrine, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina.

62. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de de cualquiera de las reivindicaciones 55-59, en donde el polinucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

63. La célula de empaquetamiento o un método de cualquiera de las reivindicaciones 49-53 y 55 a 62, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de referencia.

64. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) una partícula AAV

(i) según cualquiera de las reivindicaciones 36 o 54-62,

(ii) que comprende una proteína de cápside de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 1-33,

(iii) que comprende una cápside de AAV según la reivindicación 34 o la reivindicación 35

2021/37181 (NC2021/0017692)
Reivindicaciones Modificadas
Agosto 6, 2025

- (iv) que comprende una proteína de cápside de AAV codificada por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-48,
 - (v) elaborado por la célula de empaquetamiento de la reivindicación 49, o
 - (vi) fabricado según el método de cualquiera de las reivindicaciones 50-53, y
- (b) un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65. Un método *in vitro* para suministrar un polinucleótido de interés a una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con:

- (a) la partícula de AAV
 - i. de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 o 54 a 62,
 - ii. Que comprende una proteína de cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33,
 - iii. Que comprende una cápside de AAV de acuerdo con las reivindicaciones 34 o 35,
 - iv. Que comprende una proteína de cápside de AAV codificada por una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 48,
 - v. Elaborada por la célula de empaquetamiento de la reivindicación 49, o
 - vi. Fabricada de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, o
- (b) la composición de acuerdo con la reivindicación 64.

66. El método de la reivindicación 65, 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.

67. El método de la reivindicación 65 o la reivindicación 66, en donde la célula diana es una célula humana.

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas

Agosto 6, 2025

68. El método de cualquiera de las reivindicaciones 65-67, en donde el polinucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.