

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 865**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2019 PCT/US2019/057936**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2020 WO20086893**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2019 E 19809665 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3870976**

54 Título: **Métodos para el análisis de composiciones de proteína de la cápside viral**

30 Prioridad:

**25.10.2018 US 201862750583 P**

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

**14.05.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, SHUNHAI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 968 865 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para el análisis de composiciones de proteína de la cápside viral

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos para determinar la heterogeneidad de una partícula viral, como una partícula de virus adeno-asociado (AAV), usando cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) y determinación por espectrometría de masas.

10

**ANTECEDENTES**

La terapia génica ha surgido como un tratamiento alternativo para las enfermedades genéticas. La terapia génica implica la transferencia de algo de material genético (ADN, ARN u oligonucleótidos) a las células diana. En la práctica, el gen de interés (también llamado transgén) debe administrarse a la célula mediante un vector, que porta una molécula de ADN o ARN. Se basa en la transferencia de genes funcionales para sustituir o suplementar genes defectuosos. El vector puede administrar el transgén en la célula. El método de administración varía dependiendo del tipo de tratamiento y del órgano o tejido al que vaya dirigido.

15

20

Las partículas virales han surgido como vectores para la terapia génica y el tratamiento de enfermedades. Los vectores virales, como los basados en el genoma del virus adenoasociado (AAV), ofrecen interesantes plataformas para la administración de genes. Actualmente, se han descrito 12 serotipos humanos de AAV (AAV1-12), muchos de los cuales tienen un tropismo celular y tisular distinto, creando potencialmente la opción de generar una variedad de clases diferentes de vectores a partir de este género viral.

25

Sin embargo, uno de los problemas a los que se enfrenta la adopción de vectores virales en terapia génica es la caracterización de la homogeneidad de las partículas virales. Aunque técnicas clásicas como la microscopía electrónica y las transferencias Southern pueden caracterizar la heterogeneidad de las partículas virales, como la heterogeneidad y la agregación del AAV, no ofrecen una resolución suficiente para cuantificar la homogeneidad cuando se trata de producir preparaciones de vectores virales de calidad clínica. La caracterización completa de las proteínas constituyentes de la cápside viral, como las proteínas de la cápside de los vectores de AAV, incluyendo sus secuencias y modificaciones postraduccionales (PTM), es muy recomendable para garantizar la calidad y consistencia del producto. Por tanto, se necesitan métodos para determinar la homogeneidad de las partículas virales.

30

**35 SUMARIO DE LA INVENCION**

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral, en donde el método comprende: (a) someter una muestra de partículas virales a cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) para separar los componentes proteicos de la cápside viral de las partículas virales; (b) determinar las masas de los componentes proteicos de la cápside viral para identificar los componentes proteicos separados por HILIC; y (c) determinar la abundancia relativa de los componentes proteicos de la cápside viral a partir de la separación por HILIC, determinando de este modo la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral.

40

45

En otro aspecto que no se reivindica, la presente invención proporciona un método para determinar la heterogeneidad de proteínas en una cápside de una partícula viral, en donde el método comprende: (a) someter la partícula viral a HILIC para separar los componentes proteicos de la cápside de la partícula viral; (b) determinar las masas de los componentes proteicos de la cápside de la proteína; y (c) comparar las masas determinadas de los componentes proteicos de la cápside de la partícula viral con las masas teóricas, en donde una desviación de una o más de las masas de los componentes proteicos de la cápside de la partícula viral con respecto a las masas teóricas es indicativa de la heterogeneidad de la cápside.

50

En algunas realizaciones, la partícula viral comprende una partícula de virus adeno-asociado (AAV).

55

En algunas realizaciones, los componentes proteicos de la cápside viral comprenden VP1, VP2 y VP3 de la partícula de AAV.

En algunas realizaciones, la heterogeneidad comprende uno o más serotipos mixtos, variantes de la cápside, sustituciones de aminoácidos de la cápside, cápsides truncadas o cápsides modificadas.

60

En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende una cápside AAV1, una cápside AAV2, una cápside AAV3, una cápside AAV4, una cápside AAV5, una cápside AAV6, una cápside AAV7, una cápside AAV8, una cápside AAVrh8, una cápside AAV9, una cápside AAV10, una cápside AAV11, una cápside AAV12 o una variante de las mismas.

65

En algunas realizaciones, las masas de VP1, VP2 y VP3 se comparan con masas teóricas de una o más de una cápside AAV1, una cápside AAV2, una cápside AAV3, una cápside AAV4, una cápside AAV5, una cápside AAV6, una cápside AAV7, una cápside AAV8, una cápside AAVrh8, una cápside AAV9, una cápside AAV10, una cápside AAV11, una cápside AAV12 o una variante de las mismas.

5 En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV1, una ITR de AAV2, una ITR de AAV3, una ITR de AAV4, una ITR de AAV5, una ITR de AAV6, una ITR de AAV7, una ITR de AAV8, una ITR de AAVrh8, una ITR de AAV9, una ITR de AAV10, una ITR de AAVrh10, una ITR de AAV11 o una ITR de AAV12.

10 En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside seleccionado para la transducción de células del hígado de un sujeto.

15 En algunas realizaciones, la partícula de AAV es una partícula de AAV recombinante (rAAV).

En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende un vector de AAV que codifica un transgén heterólogo.

20 En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside AAV7, AAV8 o AAV9.

En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside AAV9.

25 En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside AAV9 y es un vector viral que codifica la alfa glucosidasa lisosomal (GAA) enlazada a un anticuerpo anti-CD63.

En algunas realizaciones, la partícula viral comprende un vector viral que codifica un transgén heterólogo.

30 En algunas realizaciones, la partícula viral pertenece a una familia viral seleccionada del grupo que consiste en Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae y Herpesviridae.

35 En algunas realizaciones, la partícula viral pertenece a un género viral seleccionado del grupo que consiste en Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus, Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepadensovirus, Iteradenovirus, Penstylidensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Erythroparvovirus, Protoparvovirus, Tetraparvovirus, Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus, Lentivirus, Spumavirus, Alfabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus, Gammabaculovirus, Iltovirus, Mardivirus, Simplexvirus, Varicellovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus, Roseolovirus, Linfocriptovirus, Macavirus, Percavirus y Rhadinovirus.

40 En algunas realizaciones, el Retroviridae es el virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), spumavirus, virus Friend, virus de las células madre murinas (MSCV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia humana de células T, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia equina (VIE), virus visna-maedi; virus de la artritis-encefalitis caprina; virus de la anemia infecciosa equina; virus de la inmunodeficiencia felina (VIF); virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB); o virus de la inmunodeficiencia simia (VIS).

En algunas realizaciones, el HILIC usa una fase móvil A que comprende ácido trifluoroacético en agua.

50 En algunas realizaciones, la fase móvil A comprende aproximadamente un 0,1% de ácido trifluoroacético.

En algunas realizaciones, la cromatografía comprende una fase móvil B que comprende ácido trifluoroacético en acetonitrilo.

55 En algunas realizaciones, la fase móvil B comprende aproximadamente un 0,1% de ácido trifluoroacético.

En algunas realizaciones, la proporción de fase móvil A en la cromatografía aumenta a lo largo del tiempo.

60 En algunas realizaciones, la fase móvil A aumenta de aproximadamente un 15% a aproximadamente un 100%, durante aproximadamente 45 minutos.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

65 La Figura 1 es un modelo esquemático de un posible régimen de tratamiento para la enfermedad de Pompe que incluye el uso de un Virus adenoasociado (AAV) como vector para terapia génica.

La Figura 2A es un modelo de una cápside viral de AAV.

La Figura 2B es una representación esquemática de las proteínas de la cápside viral de un serotipo de AAV y sus masas aproximadas.

La Figura 3A es una traza UV de una separación TIC en fase inversa de proteínas de cápside de AAV de una partícula de AAV que muestra una resolución deficiente de las proteínas individuales.

La Figura 3B es una comparación de varios métodos de separación del estado de la técnica que muestran tanto una resolución deficiente como una cuantificación deficiente.

La Figura 4 es una traza UV de una separación por cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) de las proteínas de la cápside del AAV a partir de una partícula de AAV que muestra una alta resolución de las proteínas individuales y la determinación de la abundancia relativa de las proteínas individuales.

Las Figuras 5A-5D son espectros de masas de proteínas de cápside de AAV de una partícula de AAV.

La Figura 6 muestra dos trazas del análisis HILIC-UV de partículas virales AAV9 y la determinación de su estequiometría.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que ésta no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente es solamente con el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización o característica de las realizaciones pueden combinarse entre sí, y tales combinaciones se incluyen expresamente en el alcance de la presente invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en la presente, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico recitado particular, significa que el valor puede variar del valor recitado en no más del 1%. Por ejemplo, como se usa en la presente, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque en la puesta en práctica o prueba de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

### Abreviaturas usadas en la presente

MS/MS: espectrometría de masas en tándem  
 EM: espectrometría de masas  
 ITRs: Secuencias de repetición terminal invertida  
 Vector rAAV: Vector de AAV recombinante  
 HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrófila  
 GAA: Alfa glucosidasa lisosomal  
 mAb: Anticuerpo monoclonal  
 IgG: Inmunoglobulina G  
 LC: Cadena Ligera  
 HC: Cadena pesada  
 AAV: virus adenoasociado  
 PTMs: Modificaciones postraduccionales  
 TRE: terapia de sustitución enzimática

### Definiciones

"Virus adenoasociado" o "AAV": El AAV es un parvovirus no patógeno, con ADN de cadena sencilla, un genoma de aproximadamente 4,7 kb, no envuelto y tiene conformación icosaédrica. El AAV se descubrió por primera vez en 1965 como contaminante de preparados de adenovirus. El AAV pertenece al género *Dependovirus* y a la familia Parvoviridae, y requiere funciones auxiliares de herpesvirus o adenovirus para replicarse. En ausencia de virus ayudantes, el AAV puede establecer latencia integrándose en el cromosoma humano 19 en la localización 19q13.4. El genoma del AAV consiste en dos marcos de lectura abiertos (ORF), uno para cada uno de los dos genes del AAV, Rep y Cap. Los extremos del ADN del AAV tienen una repetición terminal invertida (ITR) de 145 pb, y las 125 bases terminales son palindrómicas, lo que da lugar a una estructura de horquilla en forma de T característica.

El gen Rep se transcribe a partir de los promotores p5 y p19 en cuatro proteínas Rep (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40), que desempeñan funciones importantes en el ciclo de vida del virus. Las proteínas Rep78 y Rep68 están codificadas por el ARNm transcrito a partir del promotor p5. Estas proteínas son esenciales para la replicación del ADN viral, la transcripción y el control de la integración en sitios específicos. Las dos proteínas más pequeñas Rep52 y Rep40 son generadas por el ARNm transcrito a partir del promotor p19. Estas proteínas están implicadas en la

formación de un genoma viral de cadena sencilla para el empaquetamiento y la integración viral. El gen Cap codifica tres proteínas de la cápside viral: VP1 (735 aminoácidos, ~90 kDa), VP2 (598 aminoácidos, ~72 kDa) y VP3 (533 aminoácidos, ~60 kDa), que forman la cápside viral de 60 subunidades, en una proporción de 1:1:10 (consultar las Figuras 2A y 2B). Las tres proteínas de la cápside se traducen a partir del ARNm transcrito desde el promotor p40.

Se pretende que el término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiera a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, "moléculas de anticuerpo completas"), así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "V<sub>H</sub>") y una región constante de cadena pesada (compuesta por los dominios C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>). En varias realizaciones, la cadena pesada puede ser un isotipo de IgG. En algunos casos, la cadena pesada se selecciona entre IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, la cadena pesada es de isotipo de IgG1 o IgG4, incluyendo opcionalmente una región bisagra quimérica de isotipo de IgG1/IgG2 o IgG4/IgG2. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera ("LCVR" o "V<sub>L</sub>") y una región constante de cadena ligera (C<sub>L</sub>). Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El término "anticuerpo" incluye referencias tanto a inmunoglobulinas glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase. El término "anticuerpo" incluye moléculas de anticuerpo preparadas, expresadas, creadas o aisladas por medios recombinantes, como anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para que exprese el anticuerpo. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, consultar Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003); y M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

El término anticuerpo también abarca un "anticuerpo biespecífico", que incluye una inmunoglobulina heterotetramérica que puede unirse a más de un epítipo diferente. Una mitad del anticuerpo biespecífico, que incluye una única cadena pesada y una única cadena ligera y seis CDR, se une a un antígeno o epítipo, y la otra mitad del anticuerpo se une a un antígeno o epítipo diferente. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico puede unirse al mismo antígeno, pero a epítopos diferentes o a epítopos no solapados. En algunos casos, ambas mitades del anticuerpo biespecífico tienen cadenas ligeras idénticas pero conservan la especificidad dual. Los anticuerpos biespecíficos se describen de manera general en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 2010/0331527 (30 de diciembre de 2010).

Los términos "porción de unión a antígeno" y "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "fragmento de anticuerpo"), se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), que consiste en un dominio VH, (vi) una CDR aislada, y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un conector sintético para formar una cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Otras formas de anticuerpos de cadena única, como los diacuerpos, también se engloban bajo el término "anticuerpo" (consultar, por ejemplo, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; y Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

Además, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden obtenerse usando técnicas estándar de ADN recombinante comúnmente conocidas en la técnica (consultar Sambrook et al., 1989).

Se pretende que el término "anticuerpo humano" incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAbs humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular en la CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no se pretende que incluya mAbs en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón), se han injertado en secuencias FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos recombinantemente en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. No se pretende que el término incluya anticuerpos aislados de o generados en un sujeto humano.

El término "que corresponde" es un término relativo que indica similitud de posición, propósito o estructura. Una señal espectral de masas debida a un péptido o proteína particular también se denomina señal correspondiente al péptido o proteína. En ciertas realizaciones, una secuencia peptídica particular o un conjunto de aminoácidos, como una proteína, puede asignarse a una masa peptídica correspondiente.

El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a un componente biológico (como un ácido nucleico, péptido, proteína, lípido, partícula viral o metabolito) que ha sido sustancialmente separado, producido aparte de, o purificado lejos de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se produce de manera natural o se expresa transgénicamente.

La "espectrometría de masas" es un método en el que una muestra se analiza generando iones en fase gaseosa a partir de la muestra, que luego se separan de acuerdo con su relación masa-carga ( $m/z$ ) y se detectan. Los métodos de generación de iones en fase gaseosa a partir de una muestra incluyen ionización por electropulverización (ESI), desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI), la desorción-ionización láser mejorada en superficie (SELDI), ionización química y ionización por impacto de electrones (EI). La separación de iones de acuerdo con su relación  $m/z$  puede lograrse con cualquier tipo de analizador de masas, incluyendo los analizadores de masas cuadrupolares (Q), los analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF), los analizadores de masas de sector magnético, las trampas de iones (IT) 3D y lineales, el analizador de masas orbitrap, los analizadores de resonancia de ciclotrón iónico por transformada de Fourier (FT-ICR) y combinaciones de los mismos (por ejemplo, un analizador cuadrupolar de tiempo de vuelo, o analizador Q-TOF). Antes de la separación, la muestra puede someterse a una o más dimensiones de separación cromatográfica, por ejemplo HILIC.

La espectrometría de masas en tándem o MS/MS es una técnica para descomponer iones seleccionados (iones precursores) en fragmentos (iones producto). Los fragmentos revelan entonces aspectos de la estructura química del ion precursor. En la espectrometría de masas en tándem, una vez ionizadas las muestras (por ejemplo, mediante ESI, MALDI, EI, etc.) para generar una mezcla de iones, se seleccionan los iones precursores, por ejemplo los péptidos de un digerido, de una relación masa-carga ( $m/z$ ) específica (MS1) y luego se fragmentan (MS2) para generar un ion producto para su detección. Los instrumentos típicos de MS en tándem incluyen QqQ, QTOF y trampa de iones/FTMS híbridos, etc. Un ejemplo de aplicación de la espectrometría de masas en tándem es la identificación de proteínas. El primer analizador de masas aísla los iones de un valor  $m/z$  particular que representan una única especie de péptido entre las muchas introducidas en la fuente de iones y que luego emergen de ella. Luego, esos iones se aceleran en una célula de colisión que contiene un gas inerte, como el argón, para inducir la fragmentación iónica. Este proceso se designa disociación inducida por colisión (CID) o disociación activada por colisión (CAD). A continuación, los valores  $m/z$  de los iones de los fragmentos se miden en un 2º analizador de masas para obtener información sobre la secuencia de aminoácidos. La espectrometría de masas en tándem puede usarse para identificar la secuencia de un péptido y, por tanto, proteínas de longitud total o parcial de acuerdo con los métodos divulgados en la presente. Los iones precursores pueden activarse (con un aumento de la energía interna) de muchas maneras diferentes. Los patrones de fragmentación dependen de cómo se transfiere la energía al ion precursor, la cantidad de energía transferida y cómo se distribuye internamente la energía transferida. La disociación inducida por colisión y la disociación multifotónica infrarroja son técnicas de "calentamiento lento" que aumentan la temperatura Boltzmann del ion y, por tanto, escinden preferiblemente los enlaces más débiles.

Los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" se refieren, indistintamente, a un polímero de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos o miméticos de enlaces peptídicos. Los veinte aminoácidos de origen natural y sus designaciones de una y tres letras son los siguientes: Alanina A Ala; Cisteína C Cys; Ácido aspártico D Asp; Ácido glutámico E Glu; Fenilalanina F Phe; Glicina G Gly; Histidina H His; Isoleucina I Ile; Lisina K Lys; Leucina L Leu; Metionina M Met; Asparagina N Asn; Prolina P Pro; Glutamina Q Gln; Arginina R Arg; Serina S Ser; Treonina Tr; Valina V Val; Triptófano W Trp; y Tirosina Y Tyr.

Las referencias a una masa de un aminoácido significa la masa monoisotópica o masa media de un aminoácido en una abundancia isotópica dada, como una abundancia natural. En algunos ejemplos, la masa de un aminoácido puede estar sesgada, por ejemplo, al marcar un aminoácido con un isótopo. Se espera cierto grado de variabilidad en torno a la masa media de un aminoácido para aminoácidos individuales sobre la base de la composición isotópica exacta del aminoácido. Las masas, incluyendo las masas monoisotópicas y medias de los aminoácidos, pueden obtenerse fácilmente por un experto en la técnica.

De manera similar, las referencias a una masa de un péptido o proteína significan la masa monoisotópica o la masa media de un péptido o proteína en una abundancia isotópica dada, como una abundancia natural. En algunos ejemplos, la masa de un péptido puede estar sesgada, por ejemplo, marcando uno o más aminoácidos del péptido o proteína con un isótopo. Se espera cierto grado de variabilidad alrededor de la masa media de un péptido para péptidos individuales sobre la base de la composición isotópica exacta del péptido. La masa de un péptido particular puede ser determinada por un experto en la técnica.

Un "vector", como se usa en la presente, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico que se va a administrar en una célula huésped, ya sea in vitro o in vivo.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa en la presente, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por tanto, este término incluye, pero no se limita a, ADN o ARN de cadena sencilla, doble o múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química

o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. La estructura principal del ácido nucleico puede comprender azúcares y grupos fosfato (como pueden encontrarse típicamente en el ARN o el ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos.

5 Alternativamente, la estructura principal del ácido nucleico puede comprender un polímero de subunidades sintéticas como fosforamidatos y, por tanto, puede ser un oligodeoxinucleósido fosforamidato (P-NH<sub>2</sub>) o un oligómero mixto de fosforamidato y fosfodiéster. Además, puede obtenerse un ácido nucleico de cadena doble a partir del polinucleótido de cadena sencilla producto de la síntesis química, ya sea sintetizando la cadena complementaria y apareando las cadenas en condiciones apropiadas, o sintetizando la cadena complementaria de novo usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Un "vector viral recombinante" se refiere a un vector de polinucleótidos recombinante que incluye una o más secuencias heterólogas (es decir, una secuencia de ácido nucleico que no es de origen viral).

15 Un "vector de AAV recombinante (vector rAAV)" se refiere a un vector de polinucleótidos que incluye una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico no de origen AAV) que pueden estar flanqueadas por al menos una, por ejemplo dos, secuencias AAV de repetición terminal invertida (ITR). Tales vectores rAAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula huésped que ha sido infectada con un virus ayudante adecuado (o que está expresando funciones ayudantes adecuadas) y que está expresando productos génicos AAV rep y cap (es decir, proteínas AAV Rep y Cap).

Una "partícula viral" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside viral y un genoma viral encapsulado.

25 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un ácido nucleico introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un tipo de célula diferente es un ácido nucleico heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De manera similar, una secuencia celular (por ejemplo, un gen o una porción del mismo) que se incorpora en un vector viral es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

30 Una secuencia de "repetición terminal invertida" o "ITR" son secuencias relativamente cortas que se encuentran en los extremos terminales de los genomas virales con una orientación opuesta. Una secuencia "AAV de repetición terminal invertida (ITR)" es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos terminales de un genoma AAV de cadena sencilla.

35 Se pretende que el término "cromatografía de interacción hidrófila" o HILIC incluya un proceso que emplea una fase estacionaria hidrófila y una fase móvil orgánica hidrófoba en la que los compuestos hidrófilos se retienen durante más tiempo que los compuestos hidrófobos. En ciertas realizaciones, el proceso utiliza una fase móvil de solvente miscible en agua.

40 El término "muestra", como se usa en la presente, se refiere a una mezcla de moléculas que comprende por lo menos una partícula viral, como una partícula de AAV, que se somete a manipulación de acuerdo con los métodos de la invención, incluyendo, por ejemplo, separar, analizar, extraer, concentrar, perfilar y similares.

45 El término "superficie cromatográfica", como se usa en la presente, incluye una superficie que está expuesta a una muestra o a analitos. Una superficie cromatográfica puede estar químicamente modificada, funcionalizada o activada o tener una microestructura, por ejemplo, un poro. En ciertas realizaciones, la superficie cromatográfica puede ser hidrófoba, hidrófila (polar) o iónica. En otras realizaciones, la superficie cromatográfica es completamente porosa, superficialmente porosa o no porosa.

50 El término "núcleo cromatográfico", como se usa en la presente, incluye un material cromatográfico, incluyendo pero no limitado a un material orgánico como la sílice, en forma de una partícula, un monolito u otra estructura adecuada, que forma una parte interna de los materiales de la invención. En ciertos aspectos, la superficie del núcleo cromatográfico representa la superficie cromatográfica, o representa un material encapsulado por una superficie cromatográfica, como se define en la presente. El material de la superficie cromatográfica puede estar dispuesto sobre o unido a o apareado con el núcleo cromatográfico de tal manera que sea discernible una transición discreta o distinta, o puede estar unido al núcleo cromatográfico de tal manera que se mezcle con la superficie del núcleo cromatográfico dando como resultado una gradación de materiales y sin una superficie interna discreta del núcleo. En ciertos aspectos, el material de la superficie cromatográfica puede ser el mismo o diferente del material del núcleo cromatográfico y puede mostrar propiedades físicas o fisicoquímicas diferentes de las del núcleo cromatográfico, incluyendo, entre otras, el volumen de poro, el área superficial, el diámetro medio de los poros, el contenido de carbono o la estabilidad hidrolítica del pH.

65 El término "hidrófilo", como se usa en la presente, describe la afinidad por el agua, su atracción, adsorción o absorción.

El término "hidrófobo", como se usa en la presente, describe la falta de afinidad, repulsión o incapacidad para adsorber o absorber agua.

5 "Cromatografía", como se usa en la presente, se refiere al proceso de separación de una mezcla, por ejemplo, una mezcla que contiene proteínas de la cápside viral. Implica pasar una mezcla a través de una fase estacionaria, que separa las moléculas de interés de otras moléculas de la mezcla y permite aislar una o más moléculas de interés. Un ejemplo de un método de separación cromatográfica es la cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC).

10 "Poner en contacto", como se usa en la presente, incluye juntar por lo menos dos sustancias en solución o fase sólida, por ejemplo poner en contacto una fase estacionaria de un material de cromatografía con una muestra, como una muestra que comprende partículas virales.

**Descripción general**

15 La enfermedad de Pompe es un trastorno autosómico recesivo de almacenamiento lisosomal provocado por mutaciones en el gen GAA que codifica la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA), una enzima lisosomal responsable de la hidrólisis del glucógeno en glucosa. La deficiencia de GAA provoca la acumulación de glucógeno en los lisosomas y la consiguiente disfunción celular en los músculos cardíacos, esqueléticos y lisos, así como en el sistema nervioso central. La enfermedad de Pompe puede presentarse en una fase temprana de la vida como enfermedad de Pompe de inicio infantil (IOPD) o más tarde en la infancia hasta la edad adulta como enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD). La insuficiencia respiratoria es una causa importante de muerte en ambos tipos de enfermedad de Pompe.

25 Actualmente, el único tratamiento aprobado por la Food and Drug Administration para la enfermedad de Pompe es la terapia de sustitución enzimática (ERT). Sin embargo, la GAA administrada sistémicamente no atraviesa la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, no puede tratar la patología del SNC ni las neuronas motoras respiratorias afectadas. Además, la ERT sólo corrige parcialmente las anomalías del músculo esquelético como resultado de la baja captación en las fibras musculares. En consecuencia, dos tercios de los pacientes con IOPD acaban necesitando asistencia respiratoria, y la insuficiencia respiratoria persiste entre los pacientes con LOPD.

30 La terapia génica usando vectores de virus adenoasociados (AAV) es ideal para la enfermedad de Pompe, ya que se trata de un trastorno monogénico. Una de las estrategias que se está estudiando es la combinación de sustitución enzimática con anticuerpos enlazados. En un ejemplo, se está desarrollando la alta expresión de anti-CD63::GAA del hígado mediante terapia génica para superar la respuesta inmunitaria a la enzima de sustitución que se observa en pacientes sin enzima endógena (consultar la Figura 1). Como ocurre con todos los sistemas de vectores virales, es importante asegurarse de que la composición terapéutica contiene la cantidad correcta de partículas virales correctamente formadas. Por tanto, es muy importante determinar la estequiometría y la composición proteica de las partículas virales.  
[0088]

40 Aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para determinar la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral. En realizaciones, el método incluye someter una muestra de partículas virales a cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) para separar los componentes proteicos de la cápside viral de las partículas virales, como partículas virales de interés en las que se desea obtener información sobre la cápside. En algunas realizaciones, se pone en contacto una columna HILIC con la muestra que contiene las partículas virales. En ciertas realizaciones, el método incluye determinar las masas de los componentes proteicos de la cápside viral para identificar los componentes proteicos separados por HILIC, por ejemplo, usando técnicas de espectrometría de masas, como las descritas en la presente. En realizaciones, el método incluye calcular la abundancia relativa de los componentes proteicos de la cápside viral a partir de la separación por HILIC para determinar la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral, por ejemplo usando detección ultravioleta (UV) de los componentes proteicos de la cápside viral a medida que se eluyen de la columna HILIC. Por ejemplo, puede usarse el área de un pico UV para determinar la abundancia relativa de las proteínas de la cápside y usarse para calcular la estequiometría de las proteínas de la cápside en la cápside viral (consultar la Figura 4). En otro ejemplo, se usan la altura del pico y/o la intensidad UV del pico para determinar la abundancia relativa. En algunas realizaciones, el tiempo de retención de las diferentes proteínas en la columna HILIC se determina en función de la fase móvil usada y, en análisis posteriores, puede usarse este tiempo de retención para determinar las proteínas y la abundancia relativa de las proteínas de la partícula viral sin necesidad de determinar la masa y/o la identidad de las proteínas cada vez que se realiza una determinación de la estequiometría, por ejemplo, puede desarrollarse un valor o valores estándar. Antes de esta divulgación era muy difícil resolver las diferentes proteínas de la cápside usando técnicas cromatográficas convencionales (consultar las Figuras 3A y 3B). Usando las condiciones de muestra analizadas en la presente para HILIC, se logró una buena separación para las partículas virales AAV. Además, el uso de la columna HILIC eliminó cualquier requisito de un paso de desnaturalización. En ciertas realizaciones, el método se usa para determinar el serotipo de una partícula viral. Por ejemplo, las masas de VP1, VP2 y VP3 de cada serotipo de AAV son únicas y pueden usarse para identificar o diferenciar serotipos de la cápside de AAV. Además, las proteínas de la cápside separadas pueden someterse a análisis en sentido descendente, como la determinación de la secuencia proteica y las modificaciones postraduccionales de las proteínas de la cápside,

por ejemplo con una medición de masa precisa a nivel de proteína intacta.

Aspectos de la presente divulgación que no se reivindican están dirigidos a un método para determinar la heterogeneidad de los componentes proteicos en una cápside de una partícula viral. En realizaciones, el método incluye someter la partícula viral a HILIC para separar los componentes proteicos de la cápside de la partícula viral. En realizaciones, el método incluye determinar las masas de los componentes proteicos de la cápside proteica. En algunos casos, las masas de los componentes proteicos de la cápside de la partícula viral se comparan con masas teóricas de la cápside de la partícula viral. Una desviación de una o más de las masas de los componentes proteicos de la cápside de la partícula viral indica que una o más proteínas de la cápside son heterogéneas (consultar la Figura 5A). Al contrario, ninguna desviación indicaría que las proteínas de la cápside son homogéneas (ver Figura 5B-5D). En realizaciones, la heterogeneidad se debe a uno o más serotipos mixtos, variantes de la cápside, sustituciones de aminoácidos de la cápside, cápsides truncadas o cápsides modificadas. En algunas realizaciones, la determinación de la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral y la determinación de la heterogeneidad de los componentes proteicos en una cápside de una partícula viral se realizan en la misma muestra, por ejemplo es una única prueba.

En ciertas realizaciones, la partícula viral es una partícula de virus adenoasociado (AAV) y los métodos divulgados pueden usarse para determinar la estequiometría de los componentes proteicos en una cápside de una partícula de AAV y/o la heterogeneidad de los componentes proteicos en una cápside de una partícula de AAV. En realizaciones, los componentes proteicos de la cápside proteica comprenden VP1, VP2 y VP3 de una partícula de AAV. En realizaciones, la partícula de AAV es una partícula de AAV recombinante (rAAV). En realizaciones, la partícula de AAV incluye un vector de AAV que codifica un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, una masa determinada o calculada de la presente divulgación (por ejemplo, la masa determinada o calculada de VP1, VP2 y/o VP3 de la partícula de AAV) puede compararse con una referencia, por ejemplo, una masa teórica de una VP1, VP2, y/o VP3 de uno o más serotipos de AAV (consultar, por ejemplo, las Figuras 2A y 2B). Una referencia puede incluir una masa teórica de un VP1, VP2, y/o VP3 de uno o más de cualquiera de los serotipos de AAV. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las masas de VP1, VP2, y/o VP3 se comparan con masas teóricas de una o más de una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV4, una cápside de AAV5, una cápside de AAV6, una cápside AAV7, una cápside AAV8, una cápside AAVrh8, una cápside AAV9, una cápside AAV10, una cápside de AAV11, una cápside de AAV12, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, una masa determinada o calculada (por ejemplo, la masa determinada o calculada de VP1, VP2 y/o VP3 de la partícula de AAV) puede compararse con una masa teórica de una VP1, VP2, y/o VP3 del serotipo de AAV correspondiente.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación pueden incluir determinar la heterogeneidad de las proteínas de una partícula de AAV. En algunas realizaciones, una desviación de una o más de las masas de VP1, VP2 y/o VP3 (por ejemplo, de una masa de referencia, como una masa teórica, predicha o esperada) es indicativa de la heterogeneidad de la proteína de la cápside del AAV. En algunas realizaciones, la heterogeneidad puede incluir uno o más de los siguientes elementos, sin limitación: serotipos mixtos, variantes de la cápside, sustituciones de aminoácidos de la cápside, cápsides truncadas o cápsides modificadas.

En algunas realizaciones, un método para determinar la heterogeneidad de una partícula de AAV puede incluir someter una partícula de AAV desnaturalizada a LC/MS (por ejemplo, como se describe en la presente), determinar las masas de VP1, VP2 y VP3 de la partícula de AAV, y comparar estas masas con las masas teóricas de VP1, VP2 y VP3 del serotipo AAV; así como someter fragmentos de VP1, VP2 y/o VP3 a LC/MS/MS, determinar las masas de fragmentos de VP1, VP2 y VP3 de la partícula de AAV, y comparar estas masas con masas teóricas de VP1, VP2 y VP3 del serotipo de AAV (una desviación de una o más de las masas de VP1, VP2 o VP3 son indicativas de la heterogeneidad de la cápside de AAV).

En realizaciones, la partícula de AAV incluye una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV4, una cápside de AAV5, una cápside de AAV6, una cápside de AAV7, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8, una cápside de AAV9, una cápside de AAV10, una cápside de AAV11, una cápside de AAV12 o una variante de las mismas.

En realizaciones, las masas de VP1, VP2 y VP3 se comparan con las masas teóricas de una o más de las cápsides de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o una variante de las mismas.

En realizaciones, la partícula de AAV comprende una ITR de AAV1, una ITR de AAV2, una ITR de AAV3, una ITR de AAV4, una ITR de AAV5, una ITR de AAV6, una ITR de AAV7, una ITR de AAV8, una ITR de AAVrh8, una ITR de AAV9, una ITR de AAV10, una ITR de AAV11, o una ITR de AAV12.

En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside seleccionado para la transducción de células del hígado de un sujeto. En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside de AAV7, AAV8 o AAV9, que son selectivos para la transducción de células del hígado de un sujeto.

En algunas realizaciones, la partícula de AAV es una partícula de AAV recombinante (rAAV). En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende un vector de AAV que codifica un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside de AAV7, AAV8 o AAV9. En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside de AAV9. En algunas realizaciones, la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside de AAV9 y es un vector viral que codifica alfa glucosidasa lisosomal (GAA) enlazado a un anticuerpo específico para un antígeno expresado a partir de una célula muscular (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD63).

Aunque AAV fue la partícula viral modelo para esta divulgación, se contempla que los métodos divulgados pueden aplicarse para perfilar una variedad de virus, por ejemplo, las familias, subfamilias y géneros virales. Los métodos de la presente divulgación pueden encontrar uso, por ejemplo, en la realización de perfiles de VPs para monitorizar expresiones de VP, modificaciones post-traduccionales y truncamientos y para asegurar la consistencia del producto durante la producción de VLP, para confirmar mutagénesis directa del sitio o caracterización estructural para aplicaciones de manipulación de proteínas de la cápside, y/o para monitorizar o detectar heterogeneidad de una partícula o preparación viral.

En realizaciones, el vector viral codifica un transgén heterólogo.

En realizaciones, la partícula viral pertenece a una familia viral seleccionada del grupo que consiste en Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae y Herpesviridae.

En algunas realizaciones, la partícula viral pertenece a un género viral seleccionado del grupo que consiste en Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus, Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepadensovirus, Iteradenovirus, Penstydensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Erythroparvovirus, Protoparvovirus, Tetraparvovirus, Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus, Lentivirus, Spumavirus, Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus, Gammabaculovirus, Iltovirus, Mardivirus, Simplexvirus, Varicellovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus, Roseolovirus, Linfocriptovirus, Macavirus, Percavirus y Rhadinovirus.

En algunas realizaciones, el Retroviridae es el virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), el virus de la leucemia felina (FLV), el spumavirus, virus de Friend, virus de las células madre murinas (MSCV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia humana de células T, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia equina (VIE), virus visna-maedi; virus de la artritis-encefalitis caprina; virus de la anemia infecciosa equina; virus de la inmunodeficiencia felina (VIF); virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB); o virus de la inmunodeficiencia simia (VIS).

La cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) es una variante de la NP-HPLC que puede realizarse con fases móviles parcialmente acuosas, lo que permite la separación en fase normal de péptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y muchas proteínas. El orden de elución de la HILIC es de menos polar a más polar, al contrario que en la HPLC de fase inversa.

HILIC separa los analitos basándose en las interacciones polares entre los analitos y la fase estacionaria (por ejemplo, el sustrato). El analito polar se asocia a y es retenido por la fase estacionaria polar. La fuerza de adsorción aumenta con aumentos en la polaridad del analito, y la interacción entre el analito polar y la fase estacionaria polar (con respecto a la fase móvil) aumenta el tiempo de elución. El uso de solventes más polares en la fase móvil disminuirá el tiempo de retención de los analitos, mientras que los solventes más hidrófobos tienden a aumentar los tiempos de retención.

Pueden usarse varios tipos de sustratos con HILIC, por ejemplo, para cromatografía en columna, incluyendo sustratos de sílice, amino, amida, celulosa, ciclodextrina y poliestireno. Ejemplos de sustratos útiles, por ejemplo, que pueden usarse en cromatografía en columna, incluyen: poliSulfoetil Aspartamida (por ejemplo, de PolyLC), un sustrato de sulfobetaina, por ejemplo, ZIC®-HILIC (por ejemplo, de SeQuant), POROS® HS (por ejemplo, de Applied Biosystems), POROS® S (por ejemplo, de Applied Biosystems), PoliHidroetil Aspartamida (por ejemplo, de PolyLC), Zorbax 300 SCX (por ejemplo, de Agilent), PolyGLYCOPLEX® (por ejemplo, de PolyLC), Amide-80 (por ejemplo, de Tosohaas), TSK GEL® Amide-80 (por ejemplo, de Tosohaas), Polihidroxietilo A (por ejemplo, de PolyLC), Glico-Sep-N (por ejemplo, de Oxford GlycoSciences) y Atlantis HILIC (por ejemplo, de Waters). Las columnas que pueden usarse en los métodos divulgados incluyen columnas que utilizan uno o más de los siguientes grupos funcionales: grupos carbamoilo, grupos sulfopropilo, grupos sulfoetilo (por ejemplo, poli (2-sulfoetilo aspartamida)), grupos hidroxietilo (por ejemplo, poli (2-hidroxietilo aspartamida)) y grupos ácido sulfónico aromático.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la cápside se separan en la columna HILIC y posteriormente se eluyen de la columna HILIC, por ejemplo usando un gradiente de fase móvil para resolver las proteínas de la cápside individuales, purificando y/o separando así las proteínas de la cápside de la muestra. En ciertos ejemplos, las proteínas de la cápside eluidas de la columna HILIC se separan en una o más fracciones. Tales fracciones pueden usarse para

análisis posteriores, como el análisis MS. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen identificar las proteínas de cápside presentes en una o más de las fracciones.

5 La fase móvil usada puede incluir tampones con y sin agentes de emparejamiento iónico, por ejemplo, acetonitrilo y agua. Los agentes de emparejamiento iónico incluyen formiato, acetato, TFA y sales. Pueden usarse  
 10 gradientes de los tampones, por ejemplo, si se usan dos tampones, la concentración o porcentaje del primer tampón puede disminuir mientras que la concentración o porcentaje del segundo tampón aumenta en el transcurso de la serie de cromatografía. Por ejemplo, el porcentaje del primer tampón puede disminuir de aproximadamente el 100%,  
 15 aproximadamente el 99%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45% o aproximadamente el 40% a  
 20 aproximadamente el 0%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35% o aproximadamente el 40% en el transcurso de la serie de cromatografía. Como otro  
 25 ejemplo, el porcentaje del segundo tampón puede aumentar de aproximadamente el 0%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35% o aproximadamente el 40% a  
 30 aproximadamente el 100%, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45% o  
 35 aproximadamente el 40% en el transcurso de la misma serie. En realizaciones, la proporción de fase móvil A en la cromatografía aumenta con el tiempo. Opcionalmente, la concentración o porcentaje del primer y segundo tampón puede volver a sus valores iniciales al final de la serie de cromatografía. A modo de ejemplo, el porcentaje del primer  
 40 tampón puede cambiar en cinco pasos del 85% al 63% al 59% al 10% al 85%; mientras que el porcentaje del segundo tampón en los mismos pasos cambia del 15% al 37% al 41% al 90% al 15%. Los porcentajes pueden cambiar gradualmente como un gradiente lineal o de manera no lineal (por ejemplo, por pasos). Por ejemplo, el gradiente puede ser multifásico, por ejemplo, bifásico, trifásico, etc. En realizaciones preferidas, los métodos descritos en la presente  
 45 usan un gradiente de tampón de acetonitrilo decreciente que corresponde a la polaridad creciente de la fase móvil sin el uso de agentes de emparejamiento iónico. En realizaciones, el HILIC usa una fase móvil A que comprende ácido trifluoroacético en agua. En realizaciones, la fase móvil A comprende aproximadamente un 0,1% de ácido trifluoroacético. En realizaciones, la cromatografía comprende una fase móvil B que comprende ácido trifluoroacético en acetonitrilo. En algunas realizaciones, la fase móvil B comprende aproximadamente un 0,1% de ácido trifluoroacético.

5 La temperatura de la columna puede mantenerse a una temperatura constante durante toda la serie de cromatografía, por ejemplo, usando un calentador de columna comercial. En algunas realizaciones, la columna se mantiene a una temperatura entre aproximadamente 50° C y aproximadamente 70° C, por ejemplo, entre  
 10 aproximadamente 50° C y aproximadamente 60° C, entre aproximadamente 55° C y aproximadamente 60° C, por ejemplo, a aproximadamente 50° C, aproximadamente 55° C, aproximadamente 60° C, aproximadamente 65° C, o aproximadamente 70° C. En una realización, la temperatura es de aproximadamente 60° C.

15 El caudal de la fase móvil puede variar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 100 ml/min aproximadamente. Para las propuestas analíticas, los caudales varían típicamente de 0 a 10 ml/min; para la HPLC preparativa, pueden usarse caudales superiores a 100 ml/min. Por ejemplo, el caudal puede ser de aproximadamente  
 20 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5 o aproximadamente 5 ml/min. La sustitución por una columna que tenga el mismo empaquetamiento, la misma longitud, pero un diámetro menor requiere una reducción del caudal para mantener el mismo tiempo de retención y resolución de los picos que con una columna de diámetro  
 25 más ancho. Preferiblemente, se usa un caudal equivalente a aproximadamente 1 ml/min en una columna de 4,6x100 mm y 5 µm.

30 El tiempo de ejecución puede estar comprendido entre aproximadamente 15 y aproximadamente 240 minutos, por ejemplo, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 70 minutos, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 minutos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 90 minutos, entre aproximadamente 50  
 35 y aproximadamente 100 minutos, entre aproximadamente 60 y aproximadamente 120 minutos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 80 minutos. En realizaciones, la fase móvil A aumenta de aproximadamente 15% a aproximadamente 100%, durante aproximadamente 45 minutos.

40 En algunas realizaciones, los métodos incluyen someter una partícula viral a cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS). Como se conoce en la técnica, la LC/MS utiliza cromatografía líquida para la separación física de iones y espectrometría de masas para la generación de datos espectrales de masas a partir de los iones. Tales datos espectrales de masas pueden usarse para determinar, por ejemplo, el peso molecular o la estructura, la identificación de partículas por masa, cantidad, pureza, etcétera. Estos datos pueden representar propiedades de los iones detectados, como la intensidad de la señal (por ejemplo, la abundancia) a lo largo del tiempo  
 45 (por ejemplo, el tiempo de retención), o la abundancia relativa sobre la relación masa-carga.

En algunas realizaciones, la espectrometría de masas (por ejemplo, usada en LC/MS como se describe en la presente) puede referirse a la espectrometría de masas por ionización de electropulverización (ESI-MS). La ESI-MS es conocida en la técnica como una técnica que usa energía eléctrica para analizar iones derivados de una solución que usa espectrometría de masas (consultar, por ejemplo, Yamashita, M. y Fenn, J. B. (1984). *Phys. Chem.* 88:4451-4459). Las especies iónicas (o especies neutras que se ionizan en solución o en fase gaseosa) se transfieren de una solución a una fase gaseosa mediante la dispersión en un aerosol de gotitas cargadas, seguida de la evaporación del solvente que reduce el tamaño de las gotitas cargadas y la eyección de iones de muestra de las gotitas cargadas al pasar la solución por un capilar pequeño con un voltaje relativo a tierra (por ejemplo, la pared de la cámara circundante). La ESI se realiza mezclando la muestra con ácido volátil y solvente orgánico e infundiéndola a través de una aguja conductora cargada con alto voltaje. Las gotas cargadas que son pulverizadas (o expulsadas) por el extremo de la aguja se dirigen al espectrómetro de masas, y se secan mediante calor y vacío a medida que van entrando. Después de que se hayan secado las gotas, las moléculas cargadas restantes se dirigen mediante lentes electromagnéticas al detector de masas y se analizan en masa. En una realización, la muestra eluida se deposita directamente desde el capilar en una boquilla de electropulverización, por ejemplo, el capilar funciona como cargador de la muestra. En otra realización, el propio capilar funciona como dispositivo de extracción y como boquilla de electropulverización.

Para el MALDI, las moléculas de analito (por ejemplo, proteínas) se depositan sobre objetivos metálicos y se cocrystalizan con una matriz orgánica. Las muestras se secan y se introducen en el espectrómetro de masas, y típicamente se analizan mediante detección por tiempo de vuelo (TOF). En una realización, la muestra eluida se deposita directamente desde el capilar sobre el objetivo metálico, por ejemplo, el propio capilar funciona como cargador de la muestra. En una realización, el analito extraído se deposita sobre un blanco MALDI, se añade una matriz de ionización MALDI y la muestra se ioniza y analiza, por ejemplo, mediante detección TOF.

En algunas realizaciones, se usan otros modos de ionización, por ejemplo ESI-MS, espectrometría de masas por ionización de turbopulverización, espectrometría de masas por ionización de nanopulverización, espectrometría de masas por ionización de termopulverización, espectrometría de masas por ionización de pulverización sónica, SELDI-MS y MALDI-MS. En general, una ventaja de estos métodos es que permiten purificar la muestra "justo a tiempo" e introducirla directamente en el medio de ionización. Es importante indicar que los varios modos de ionización y detección introducen sus propias limitaciones en la naturaleza de la solución de desorción usada, y es importante que la solución de desorción sea compatible con ambos. Por ejemplo, la matriz de la muestra en muchas aplicaciones debe tener una baja fuerza iónica, o residir dentro de un intervalo de pH particular, etc. En ESI, la sal en la muestra puede impedir la detección al disminuir la ionización u obstruir la boquilla. Este problema se aborda presentando el analito con poca sal y/o mediante el uso de una sal volátil. En el caso de MALDI, el analito debe estar en un solvente compatible con la formación de manchas en el objetivo y con la matriz de ionización empleada.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen someter una partícula viral de la presente divulgación, o someter fragmentos digeridos de una partícula viral desnaturalizada de la presente divulgación, a cromatografía líquida/espectrometría de masas-espectrometría de masas (LC/MS/MS). Como es conocido en la técnica, la LC/MS/MS (en la presente el término "cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem" puede usarse indistintamente) usa la cromatografía líquida para la separación física de iones y la espectrometría de masas para la generación de datos espectrales de masas a partir de los iones, donde la espectrometría de masas usa múltiples etapas de separación de masas (por ejemplo, m/z), típicamente separadas por un paso de fragmentación. Por ejemplo, los iones de interés dentro de un intervalo de m/z pueden separarse en una primera ronda de MS, fragmentarse y, a continuación, volver a separarse basándose en m/z individuales en una segunda ronda de MS. La fragmentación de iones puede incluir, sin limitación, una técnica como la disociación inducida por colisión (CID), la disociación por colisión de alta energía (HCD), la disociación por captura de electrones (ECD) o la disociación por transferencia de electrones (ETD).

En la técnica se conocen una variedad de analizadores de masas adecuados para LC/MS y/o LC/MS/MS, entre los que se incluyen, sin limitación, analizadores de tiempo de vuelo (TOF), filtros de masas cuadrupolares, TOF cuadrupolar (QTOF) y trampas de iones (por ejemplo, un espectrómetro de masas basado en la transformada de Fourier o un Orbitrap). En el Orbitrap, se usa un electrodo exterior en forma de barril a potencial de tierra y un electrodo central en forma de husillo para atrapar iones en trayectorias que giran elípticamente alrededor del electrodo central con oscilaciones a lo largo del eje central, confinadas por el equilibrio de fuerzas centrífugas y electrostáticas. El uso de tales instrumentos emplea una operación de transformación de Fourier para convertir una señal en el dominio del tiempo (por ejemplo, frecuencia) a partir de la detección de la corriente de imagen en una medida de masa de alta resolución (por ejemplo, nano LC/MS/MS). Pueden encontrarse descripciones y detalles adicionales, por ejemplo, en Scheltema, R. A. et al. (2014) *Mol. Cell Proteomics* 13:3698-3708; Perry, R. H. et al. (2008) *Mass. Spectrom. Rev.* 27:661-699; y Scigelova, M. et al. (2011) *Mol. Cell Proteomics* 10:M11 1.009431.

En algunas realizaciones, las masas de las proteínas de la cápside viral pueden determinarse, por ejemplo, basándose en datos de LC/MS y/o LC/MS/MS. En algunas realizaciones, las masas de VP1, VP2 y VP3 de una partícula de AAV, o de fragmentos de VP1, VP2 y VP3 de la partícula de AAV, pueden determinarse, por ejemplo, basándose en datos LC/MS y/o LC/MS/MS. En la técnica se conocen varios métodos para determinar la masa y/o

identidad de proteínas a partir de datos de MS. Por ejemplo, puede usarse la huella de masa peptídica para determinar la secuencia proteica a partir de datos de MS, o pueden identificarse proteínas a partir de datos de MS/MS relacionados con uno o más péptidos constituyentes. Cuando se usa MS en tándem, puede usarse el escaneo de iones producto para analizar los datos m/z relacionados con uno o más péptidos de una proteína de interés. A continuación, puede usarse software conocido en la técnica, por ejemplo, para hacer coincidir los picos identificados con picos de referencia o conocidos, para agrupar los picos en envolturas de isotómeros, etc. Los valores de masa peptídica pueden compararse con una base de datos de secuencias peptídicas conocidas. Por ejemplo, puede usarse Mascot para comparar péptidos observados con péptidos teóricos de la base de datos, por ejemplo, resultantes de la aplicación de un patrón de digestión particular a una base de datos de proteínas in silico. Otros programas informáticos adecuados pueden incluir, sin limitación, Proteome Discoverer, ProteinProspector, X! Tandem, Pepfinder, Bonics o MassLynx™ (Waters).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor. Los promotores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), el LTR del RSV, el LTR del MoMLV, el promotor de la fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor del virus simio 40 (SV40) y un promotor de CK6, un promotor de la transtiretina (TTR), un promotor de la TK, un promotor sensible a la tetraciclina (TRE), un promotor del VHB, un promotor de la hAAT, un promotor del LSP, promotores quiméricos específicos del hígado (LSP), el promotor del E2F, el promotor de la telomerasa (hTERT); el potenciador del citomegalovirus/promotor de la beta-actina de pollo/promotor de la  $\beta$ -globina de conejo (promotor CAG; Niwa et al., *Gene*, 1991, 108(2): 193-9) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1-alfa) (Kim et al., *Gene*, 1990, 91(2):217-23 y Guo et al., *Gene Ther.*, 1996, 3(9): 802-10). En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor de  $\beta$ -glucuronidasa humana o un potenciador de citomegalovirus enlazado a un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA). El promotor puede ser constitutivo, inducible o reprimible. En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un transgén heterólogo de la presente divulgación enlazado operativamente a un promotor CBA.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor retroviral LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) (opcionalmente con el potenciador del RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador del CMV), el promotor del SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa, el promotor de la 13-actina, el promotor de la fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor de la EF1a.

Los promotores inducibles permiten regular la expresión génica y pueden ser regulados por compuestos suministrados exógenamente, factores ambientales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o sólo en células replicantes. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles en una variedad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica. Los ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores suministrados exógenamente incluyen el promotor de metalotioneína (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa T7 (WO 98/10088); el promotor de ecdisona de insectos (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)), el sistema tetraciclina-represor (Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., *Science*, 268: 1766-1769 (1995), consultar también Harvey et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang et al., *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997) y Wang et al., *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son los que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, la temperatura, la fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o sólo en células replicantes.

En otra realización, se usará el promotor nativo, o un fragmento del mismo, para el transgén. El promotor nativo puede usarse cuando se desea que la expresión del transgén imite la expresión nativa. El promotor nativo puede usarse cuando debe regularse temporal o evolutivamente la expresión del transgén, o de manera específica para un tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, también pueden usarse otros elementos de control de la expresión nativa, como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak, para imitar la expresión nativa.

En algunas realizaciones, las secuencias reguladoras confieren capacidades de expresión génica específicas de tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas de tejido se unen a factores de transcripción específicos de tejido que inducen la transcripción de una manera específica de tejido. Tales secuencias reguladoras específicas de tejido (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) son bien conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones, el vector comprende un intrón. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el intrón es un intrón quimérico derivado de beta-actina de pollo y beta-globina de conejo. En algunas realizaciones, el intrón es un intrón del virus diminuto del ratón (MVM).

En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de poliadenilación (poliA). En la técnica se

conocen numerosos ejemplos de secuencias de poliadenilación, como una secuencia de poli(A) de hormona de crecimiento bovina (BGH) (consultar, por ejemplo, el número de acceso EF592533), una secuencia de poliadenilación de SV40 y una secuencia de poliadenilación de TK pA de HSV.

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar características particulares de ciertas realizaciones. Sin embargo, las características particulares descritas a continuación no deben considerarse como limitaciones al alcance de la invención, sino más bien como ejemplos a partir de los cuales los expertos en la técnica reconocerán equivalentes.

## 10 EJEMPLO

15 El siguiente ejemplo se presenta para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo elaborar y usar los métodos de la invención, y no se pretende que limite el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio a menos que se indique, la temperatura es en grados centígrados, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25° C, y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

## 20 Separación de las proteínas de la cápside de las partículas de AAV intactas

25 Para la separación de una partícula viral AAV9 intacta, se inyectó 1 µl de la muestra de AAV en una columna HILIC, como se describe en la tabla siguiente. Los resultados de la separación se muestran en la Figura 4. Como se muestra, las tres proteínas de la cápside del AAV mostraron una resolución completa entre sí.

La Tabla 1 muestra un resumen de las condiciones cromatográficas usadas para la separación de las proteínas de la cápside de AAV9 de una cápside de AAV9 intacta.

Tabla 1: Resumen de las condiciones cromatográficas

30	Sistema UPLC	ACQUITY UPLC Clase I de Waters			
	Fase móvil	A: 0,1% de TFA en agua			
		B: 0,1% de TFA en acetonitrilo			
35	Columna	ACQUITY UPLC® Glicoproteína BEH Amida 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, N° de pieza 186007963			
	Temperatura de columna	60° C ± 1° C			
	Temperatura de muestreador automático	5° C ± 2° C			
40	Gradiente	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de A	% de B
		0	0.2	15.0	85.0
		0.5	0.2	15.0	85.0
		1.0	0.2	25.0	75.0
		41.0	0.2	40.0	60.0
45		42.0	0.2	100.0	0.0
		44.0	0.2	100.0	0.0
		45.0	0.2	15.0	85.0
		55.0	0.2	15.0	85.0
50	Longitud de onda del detector	280 nm			

En comparación con la separación basada en RP, el mecanismo de retención único de la columna HILIC funcionó sorprendentemente mejor para la separación de VP (consultar las Figuras 4, 3A y 3B).

## 55 Análisis espectral de masas de proteínas de cápside de AAV separadas

60 Una de las ventajas de los métodos descritos en la presente es que no requiere preparación de la muestra. Se inyectó directamente 1 µl de la muestra en el LC-MS y se analizaron los datos resultantes. Se aplicaron los siguientes parámetros de sintonización en un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus para el análisis de masas intactas:

Voltaje de pulverización	3.5 kV
Temperatura capilar	350° C
Nivel RF de Lente S	60
Caudal de gas de la funda	40
Caudal de gas auxiliar	15
CID en origen	0.0 eV
Intervalo m/z	800-4000

5

10

Las Figuras 5A-5D muestran espectros de masas de las proteínas individuales de la cápside. Como se muestra en la Figura 5A, había heterogeneidad de proteínas en VP3.

15

Como se muestra en la Figura 6, la altura del pico puede usarse para determinar la estequiometría de las partículas de AAV intactas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral, que comprende:
- 5 someter una muestra de partículas virales a cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) para separar los componentes proteicos de la cápside viral de las partículas virales;  
determinar las masas de los componentes proteicos de la cápside viral para identificar los componentes proteicos separados por HILIC;
- 10 determinar la abundancia relativa de los componentes proteicos de la cápside viral a partir de la separación HILIC, determinando de este modo la estequiometría de los componentes proteicos de una cápside viral de una partícula viral.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la partícula viral comprende una partícula de virus adenoasociado (AAV).
3. El método de la reivindicación 2, en donde los componentes proteicos de la cápside de la proteína comprenden VP1, VP2 y VP3 de la partícula de AAV.
4. El método de la reivindicación 3, en donde las masas de VP1, VP2 y VP3 se comparan con masas teóricas de una o más de una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV4, una cápside de AAV5, una cápside de AAV6, una cápside de AAV7, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8, una cápside de AAV9, una cápside de AAV10, una cápside de AAV11, una cápside de AAV 12, o una variante de la misma.
5. El método de la reivindicación 3, en donde la partícula de AAV comprende una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV4, una cápside de AAV5, una cápside de AAV6, una cápside de AAV7, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8, una cápside de AAV9, una cápside de AAV10, una cápside de AAV11, una cápside de AAV12, o una variante de las mismas.
6. El método de la reivindicación 2, en donde la partícula de AAV es una partícula de AAV recombinante (rAAV) o un vector de AAV que codifica un transgén heterólogo.
7. El método de la reivindicación 2, en donde la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside seleccionado para la transducción de células del hígado de un sujeto.
8. El método de la reivindicación 2, en donde la partícula de AAV tiene un serotipo de cápside de AAV9 y es un vector viral que codifica alfa glucosidasa lisosomal (GAA) enlazado a un anticuerpo anti-CD63.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la partícula viral comprende un vector viral que codifica un transgén heterólogo o pertenece a una familia viral seleccionada del grupo que consiste en Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae y Herpesviridae.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la partícula viral pertenece a un género viral seleccionado del grupo que consiste en Atadenovirus, Aviadenovirus, Ictadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus, Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepadensovirus, Icteradenovirus, Penstlydensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Erythroparvovirus, Protoparvovirus, Tetraparvovirus, Alphaaretrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus, Lentivirus, Spumavirus, Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus, Gammabaculovirus, Iltovirus, Mardivirus, Simplexvirus, Varicellovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus, Roseolovirus, Linfocriptovirus, Macavirus, Percavirus y Rhadinovirus.
11. El método de la reivindicación 9, en donde el Retroviridae es virus de sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), spumavirus, virus de Friend, virus de las células madre murinas (MSCV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia humana de células T, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia equina (VIE), virus visna-maedi; virus de la artritis-encefalitis caprina; virus de la anemia infecciosa equina; virus de la inmunodeficiencia felina (VIF); virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB); o virus de la inmunodeficiencia simia (VIS).
12. El método de la reivindicación 1, en donde el HILIC usa una fase móvil A que comprende ácido trifluoroacético en agua o una fase móvil B que comprende ácido trifluoroacético en acetonitrilo.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la fase móvil A o la fase móvil B comprende aproximadamente un 0,1% de ácido trifluoroacético.

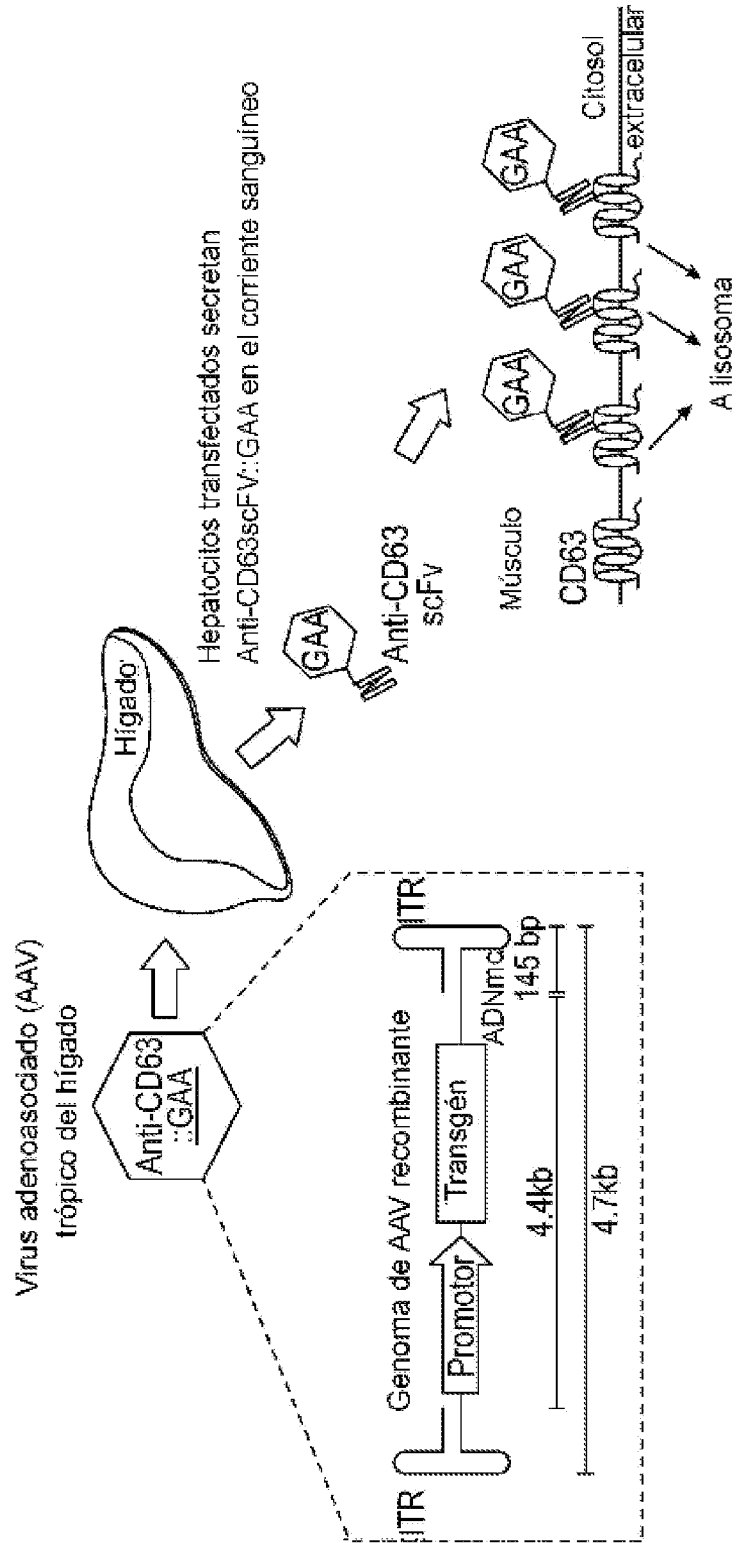


FIG. 1

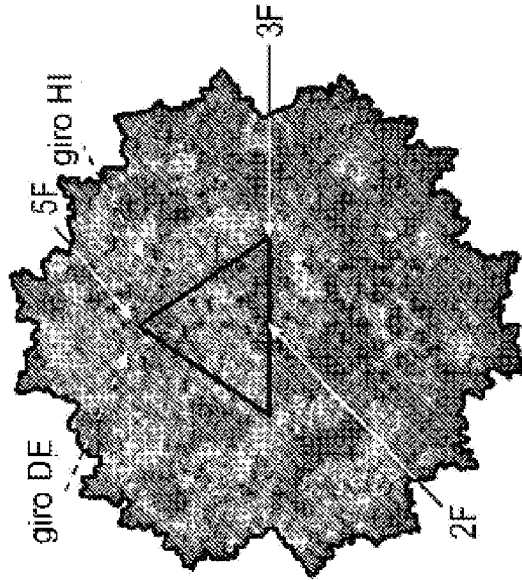


FIG. 2A

VP1	VP2	VP3
34 46 115	139 161	261 266 328 381 447 449 459 522 534 553 573 584 587 588 591 664

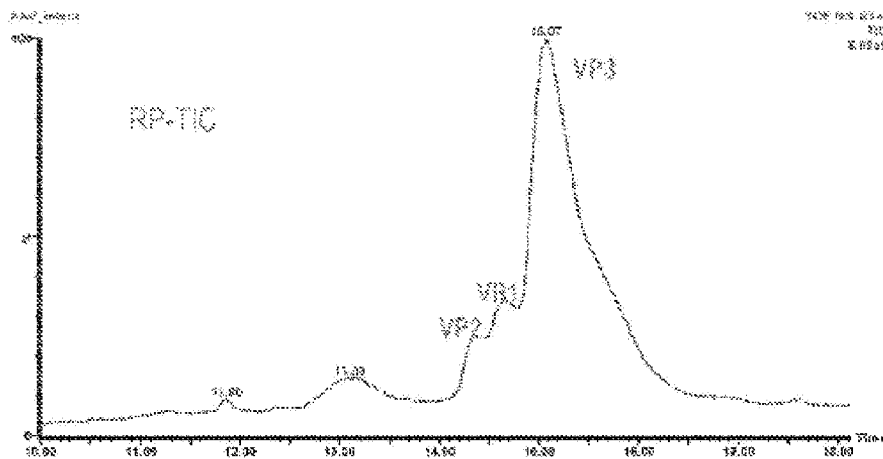
M.W.deVP1 ~ 81.5 kDa

M.W.deVP2 ~ 66.4 kDa

M.W.deVP3 ~ 59.9 kDa

FIG. 2B

FIG. 3A



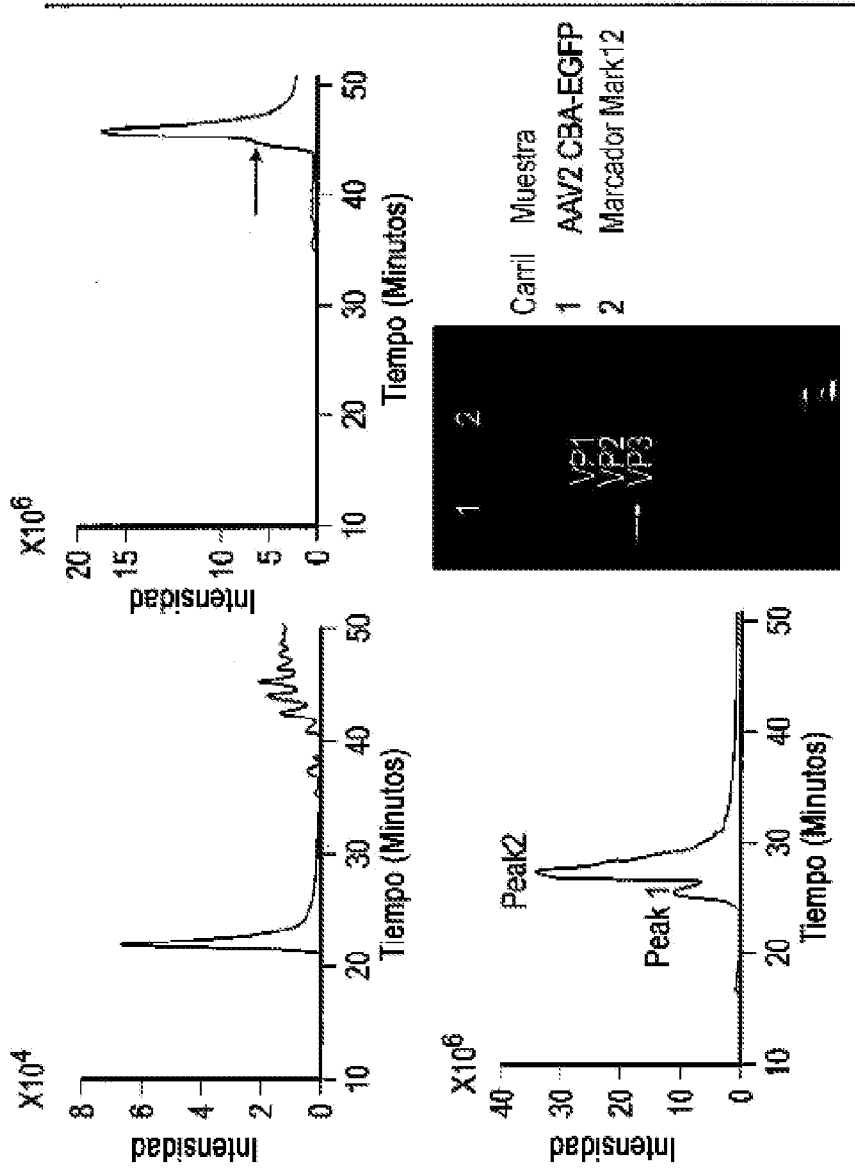


FIG. 3B

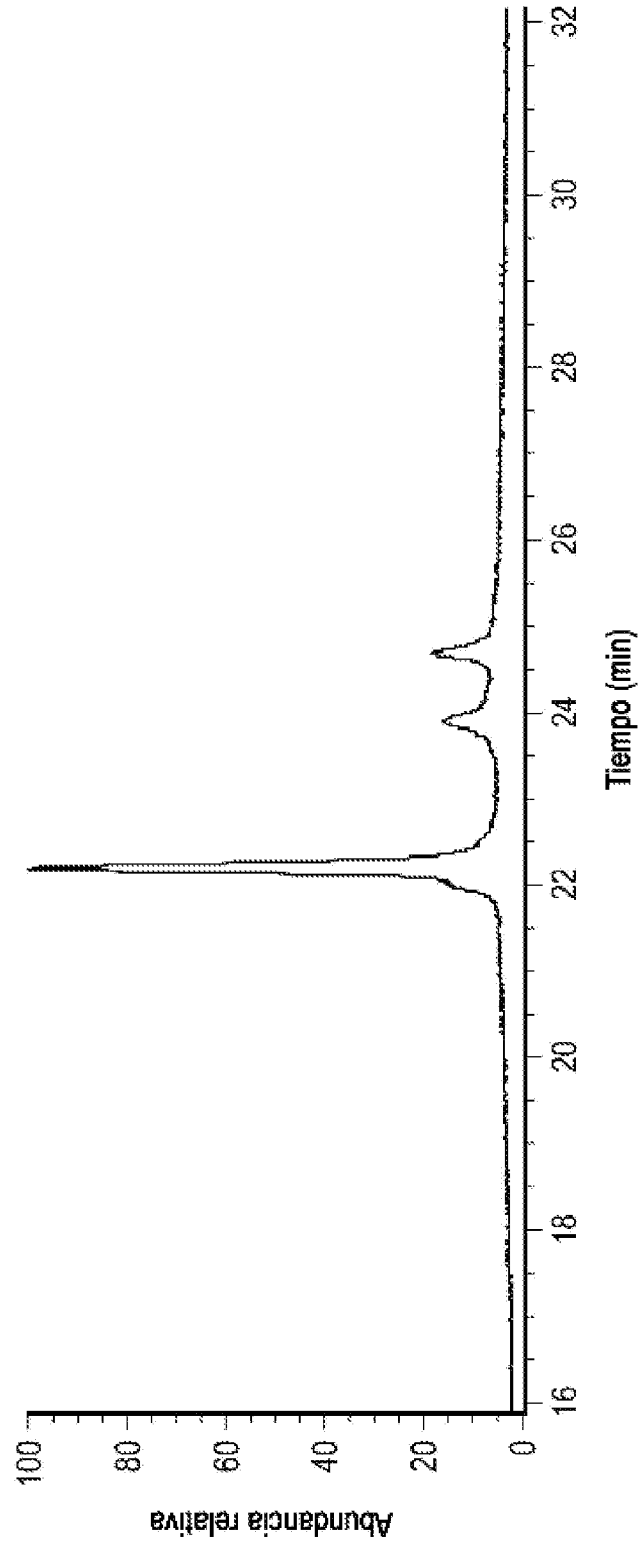


FIG. 4

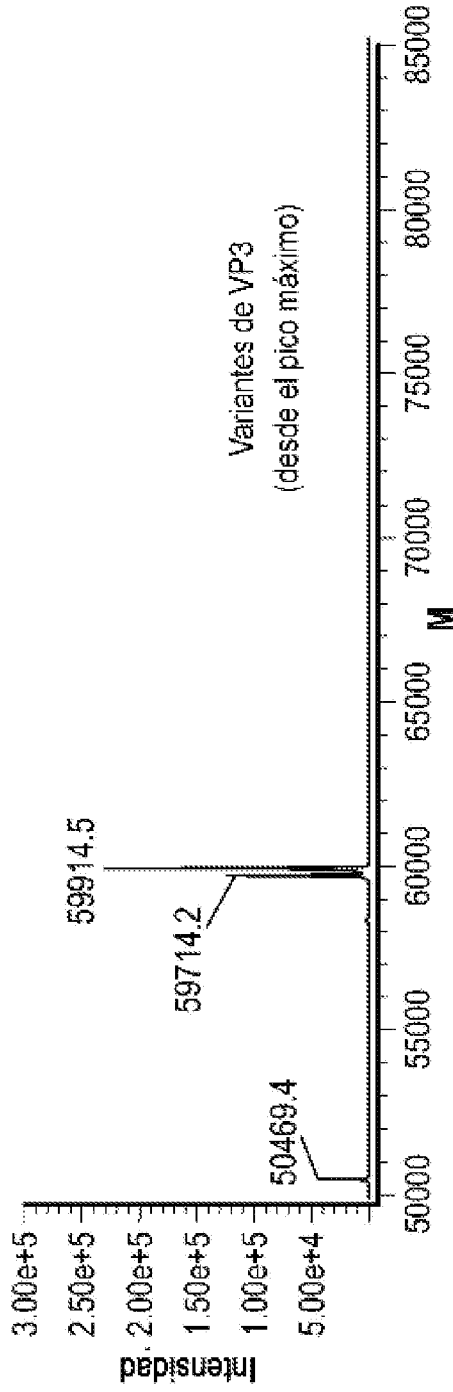


FIG. 5A

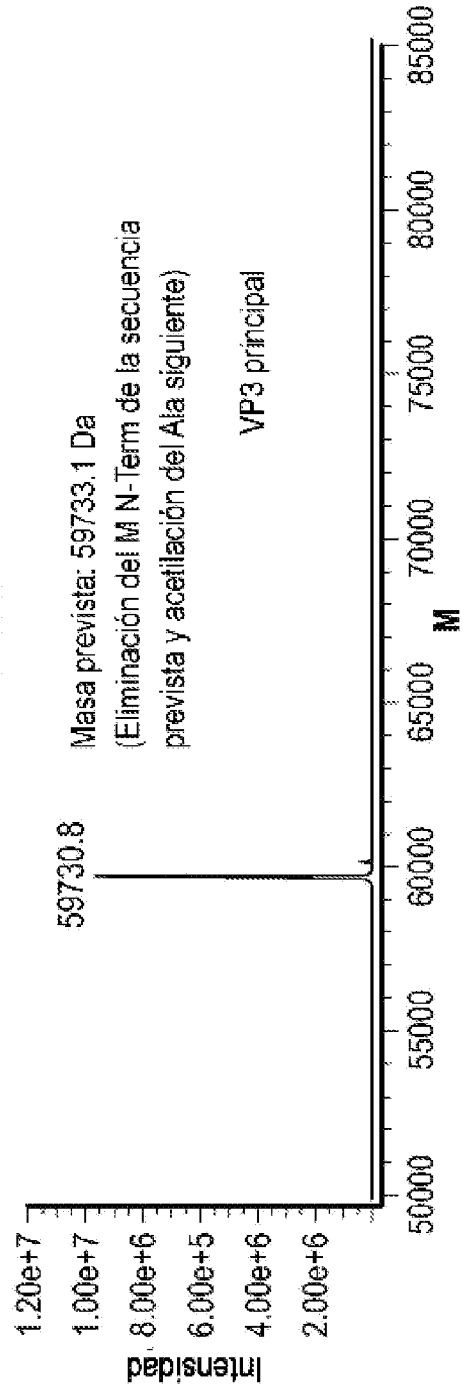


FIG. 5B

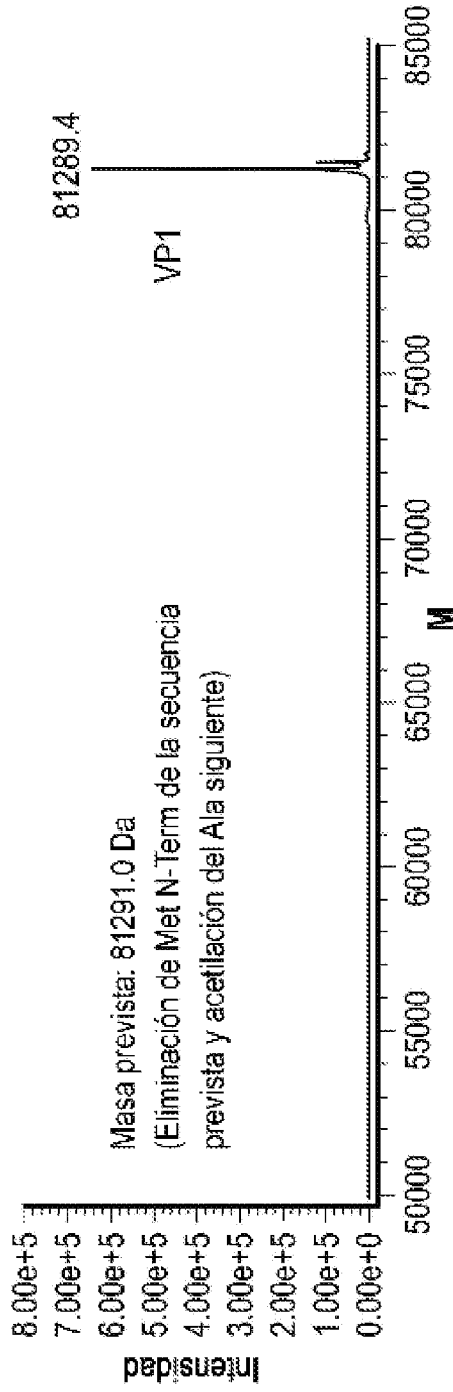


FIG. 5C

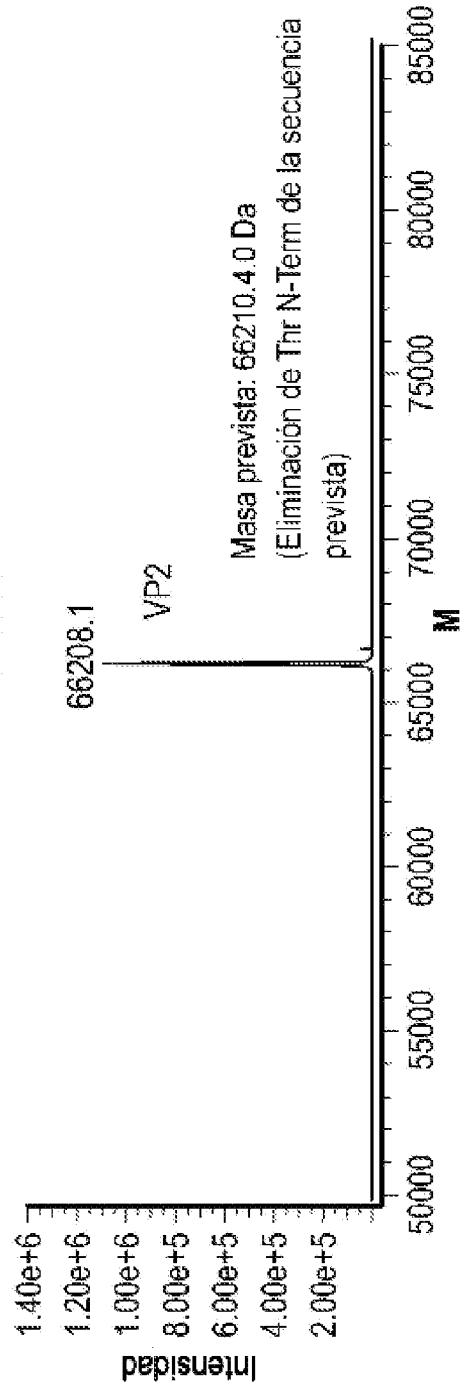


FIG. 5D

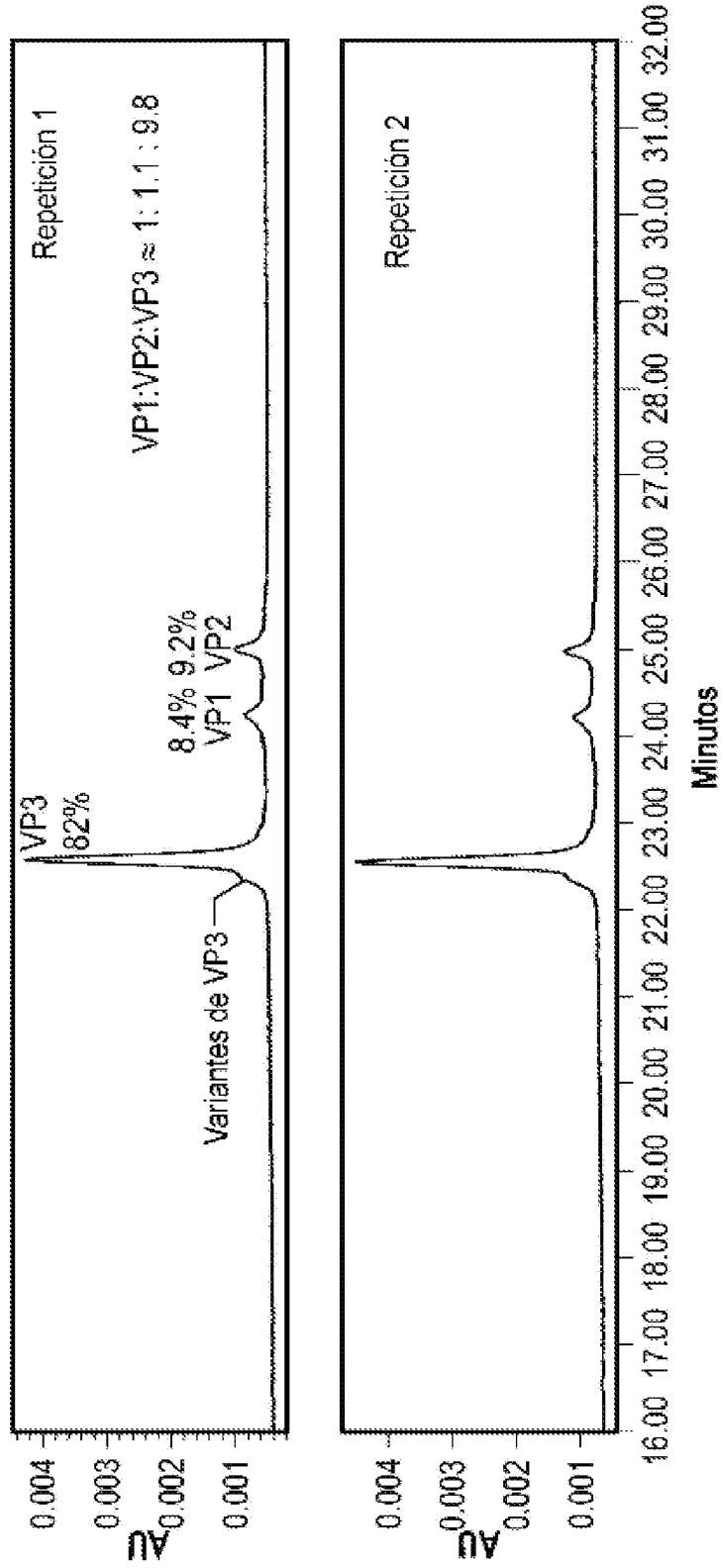


FIG. 6