

PRODUCCIÓN DE VECTORES ADENO-ASOCIADOS DE GRAN TAMAÑO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 62/144,862, presentada el 8 de abril de 2015, y a la solicitud provisional de Estados Unidos N° 62/220,067, presentada el 17 de septiembre de 2015, el contenido de cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

PRESENTACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO

ASCII

El contenido de la siguiente presentación en archivo de texto ASCII se incorpora aquí como referencia en su totalidad: una forma legible por ordenador (CRF) del Listado de Secuencias (nombre de archivo: 159792013240SEQLIST.txt, fecha registrada: 6 de abril de 2016, tamaño: 27 KB).

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos y líneas celulares para la producción de una partícula de virus adeno-asociado (AAV) con un genoma de AAV recombinante de gran tamaño.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los vectores AAV recombinantes (rAAV) vectores se han convertido en vehículos de suministro atractivos para la transferencia génica para enfermedades genéticas y crónicas. Una de las limitaciones para el uso de vectores rAAV ha sido su pequeña capacidad de empaquetamiento que ha obstaculizado la terapia génica en una serie de aplicaciones clínicas que requieren ADNc de gran tamaño, por ejemplo, Factor VIII (FVIII), distrofina, disferlina y regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Los primeros estudios definen el límite de empaquetamiento en 4,7 a 4,8 kb (Dong, J-Y *et al.* (1996) *Human Gene Therapy* 7:2101-2112). Estudios más recientes han confirmado un límite de genomas de vector empaquetados aproximadamente en 5,0 a 5,2 kb de tamaño para cápsides de AAV2, AAV5 o AAV8. En estos estudios, los genomas de gran tamaño (o "fragmentados") de ambas polaridades fueron suprimidos normalmente en el extremo 5' y los genomas más empaquetados no excedieron de ~5,2 kb (Lu, H. *et al.* (2008) *Human Gene Therapy* 19:648-654; Wu, Z. *et al.* (2010) *Molecular Therapy* 18:80-86; Grose, W.E. *et al.* (2012) *PLoS One* 7:e39233).

En consecuencia, existe una necesidad de mejores plataformas de producción

para vectores de gran tamaño que permiten la generación de rendimientos robustos con suficiente calidad.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Se describe en este documento un análisis exhaustivo de la producción de
5 vectores de gran tamaño por una línea celular productora plataforma. Como se describe más adelante, esta plataforma de PCL genera un mayor rendimiento de vectores de virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) de gran tamaño de mejor calidad. Los vectores de rAAV generados contienen mayor cantidad de genomas más grandes encapsidados que lo observado en el vector hecho por el método de
10 transfección triple estándar. Además las líneas celulares son estables, y los vectores contienen poco ADN aberrante, contaminante. Con la transferencia del gen *in vivo*, los vectores generan casetes de expresión completos y se obtiene como resultado la producción de proteína funcional.

La invención proporciona un método para producir una partícula de virus
15 adeno-asociado (AAV) que comprende un genoma de AAV recombinante de gran tamaño, cuyo método comprende a) cultivar una línea celular productora de AAV en condiciones que generan partículas rAAV, en donde la línea celular productora de AAV comprende i) ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV, y ii) un genoma de rAAV, en donde el genoma de rAAV es mayor que aproximadamente 4,7
20 kb; b) proporcionar funciones auxiliares de AAV; y c) recoger las partículas rAAV que comprenden genomas de rAAV de gran tamaño. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se mantienen de forma estable en la línea celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se
25 integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una o más repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende dos ITRs de AAV. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, las
30 partículas de AAV recogidas en la etapa c) comprenden genomas de rAAV mayores que aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, las partículas de AAV recogidas en la etapa c) comprenden genomas de rAAV entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb.
35 En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y

aproximadamente 5 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb, entre aproximadamente 5,2 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor que aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 8,0 kb o 9,0 kb de longitud o cualquier valor entre los mismos.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo es un transgén humano. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica Factor VIII, distrofina, disferlina o el regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR). En algunas realizaciones, el transgén heterólogo está unido operativamente a un promotor. En otras realizaciones, el promotor es el promotor de *transtiretina* de ratón (mTTR). En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende un intrón. En realizaciones adicionales, el intrón es un intrón sintético. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una señal de poliadenilación. En realizaciones adicionales, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, la partícula de rAAV comprende una cápside de un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV caprino, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, el serotipo del AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones de los métodos anteriores, las ITRs de AAV son ITRs del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV caprino, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITRs del AAV son ITRs de AAV2. En algunas realizaciones, las ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside se derivan de AAV2. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas rAAV se derivan de

diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAVrh8R. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAV8.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, la línea celular productora se deriva de células de primate. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células HeLa, 293, A549, o Perc.6. En algunas realizaciones, la línea celular productora está destinada a crecimiento en suspensión. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus o HSV. En algunas realizaciones, las partículas rAAV se recogen entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de la provisión de funciones auxiliares. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la purificación de las partículas rAAV. En algunas realizaciones, la purificación comprende una o más etapas de cromatografía. En algunos aspectos, la invención proporciona una partícula de rAAV que comprende un genoma de rAAV de gran tamaño producido por los métodos descritos aquí.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende partículas rAAV en donde al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60% o al menos aproximadamente 70% de la partícula de rAAV encapsida un genoma de rAAV de tamaño mayor que aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una o más repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende dos ITRs de AAV. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb, entre aproximadamente 5,2 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es de longitud mayor que aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8

kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 8,0 kb o 9,0 kb o cualquier valor entre los mismos.

En algunas realizaciones de las composiciones anteriores, el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo es un transgén humano. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica Factor VIII, distrofina, disferlina o el regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR). En algunas realizaciones, el transgén heterólogo está unido operativamente a un promotor. En otras realizaciones, el promotor es el promotor de *transtiretina* de ratón (mTTR). En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende un intrón. En realizaciones adicionales, el intrón es un intrón sintético. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una señal de poliadenilación. En realizaciones adicionales, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

En algunas realizaciones de las composiciones anteriores, la partícula de rAAV comprende una cápside de un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV caprino, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, el serotipo del AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones de los métodos anteriores, las ITRs de AAV son ITRs del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV caprino, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITRs del AAV son ITRs de AAV2. En algunas realizaciones, las ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside se derivan de AAV2. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAVrh8R. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAV8.

En algunas realizaciones de las composiciones anteriores, las partículas de AAV que comprenden un genoma de AAV de gran tamaño se producen en una célula productora. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células de primate. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células HeLa, 293, A549, o Perc.6. En algunas realizaciones, la línea celular productora está

destinada a crecimiento en suspensión. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus o HSV. En algunas realizaciones, las partículas rAAV se recogen entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de la provisión de funciones auxiliares.

5 En algunos aspectos, la invención proporciona un método para mejorar la expresión de un genoma de rAAV de gran tamaño, cuyo método comprende producir partículas rAAV en una línea celular productora mediante provisión de funciones auxiliares de AAV a la línea celular, en donde la línea celular productora comprende a) ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV, y b) un genoma de rAAV, en
10 donde el genoma de rAAV es de longitud mayor que aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, la expresión del genoma de rAAV de gran tamaño es aproximadamente 1,25 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,75 veces, aproximadamente 2,0 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 5 veces mayor que la
15 expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de partículas rAAV producidas por transfección transitoria. En algunas realizaciones, la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de las partículas producidas por una línea celular productora es más rápida que la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de las partículas producidas por transfección transitoria. En algunas realizaciones, la
20 cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño producido por una línea celular productora es aproximadamente 5% más rápido, aproximadamente 10% más rápido, aproximadamente 25% más rápido, aproximadamente 50% más rápido, aproximadamente 75% más rápido, o aproximadamente 90% más rápido que la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de las partículas rAAV
25 producidas por transfección transitoria.

En algunas realizaciones de la expresión mejorada de un genoma de rAAV de gran tamaño, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV y/o el genoma de rAAV se mantienen de forma estable en la línea celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el
30 genoma de rAAV se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una o más repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende dos ITRs de AAV. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y
35 aproximadamente 9,4 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre

aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre
 5 aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb, o entre aproximadamente 5,2 kb y 8,7 kb.

En algunas realizaciones de la expresión mejorada de un genoma de rAAV de gran tamaño, el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica Factor VIII, distrofina, disferlina
 10 o el regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR). En algunas realizaciones, el transgén heterólogo es un transgén humano. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo está unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es el promotor de transtiretina de ratón (mTTR). En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende un intrón. En algunas
 15 realizaciones, el intrón es un intrón sintético. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

En algunas realizaciones de la expresión mejorada de un genoma de rAAV de gran tamaño, la partícula de rAAV comprende una cápside de un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV caprino, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, el serotipo del AAV es
 20 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones, las ITRs de AAV son ITRs del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV caprino, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITRs del AAV son ITRs de AAV2. En algunas
 30 realizaciones, las ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside se derivan de AAV2. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAVrh8R. En algunas realizaciones, las
 35 partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAV8.

En algunas realizaciones de la expresión mejorada de un genoma de rAAV de gran tamaño, la línea celular productora se deriva de células de primate. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células HeLa, 293, A549, o Perc.6. En algunas realizaciones, la línea celular productora está destinada a crecimiento en suspensión. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus, HSV o baculovirus. En algunas realizaciones, las partículas rAAV se recogen entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de la provisión de funciones auxiliares. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la purificación de las partículas rAAV. En algunas realizaciones, la purificación comprende una o más etapas de cromatografía.

En algunos aspectos, la invención proporciona una línea celular para producir una partícula de virus adeno-asociado (AAV) que comprende un genoma de AAV recombinante de gran tamaño, cuya línea celular comprende a) ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV, y b) un genoma de rAAV, en donde el genoma de rAAV es de longitud mayor que aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se mantienen de forma estable en la línea celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una o más repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb, o entre aproximadamente 5,2 kb y 8,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es de longitud mayor que aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 8,0 kb, 8,7 kb o 9,0 kb o cualquier valor entre los mismos.

En algunas realizaciones de las líneas celulares, el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo es un transgén humano. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo

codifica Factor VIII, distrofina, disferlina o el regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR). En algunas realizaciones, el transgén heterólogo está unido operativamente a un promotor. En otras realizaciones, el promotor es el promotor de *transtiretina* de ratón (mTTR). En algunas realizaciones, el

5 genoma de rAAV comprende un intrón. En realizaciones adicionales, el intrón es un intrón sintético. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una señal de poliadenilación. En realizaciones adicionales, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

10 En algunas realizaciones de las líneas celulares anteriores, la partícula de rAAV comprende una cápside de un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV caprino, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón o

15 rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, el serotipo del AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones de los métodos anteriores, las ITRs de AAV son ITRs del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV caprino, AAV bovino, o AAV de

20 ratón. En algunas realizaciones, las ITRs del AAV son ITRs de AAV2. En algunas realizaciones, las ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside se derivan de AAV2. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, las partículas de AAV

25 comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAVrh8R. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAV8.

En algunas realizaciones de las líneas celulares anteriores, la línea celular productora se deriva de células de primate. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células HeLa, 293, A549, o Perc.6. En algunas realizaciones,

30 la línea celular productora está destinada a crecimiento en suspensión. En algunas realizaciones, las partículas de AAV se producen en la línea celular mediante provisión de funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus o HSV. En algunas realizaciones, partículas rAAV se recogen entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas

35 después de la provisión de funciones auxiliares.

En algunos aspectos, la invención proporciona una partícula de virus adeno-asociado (AAV) que comprende un genoma de rAAV encapsidado por una cápside de AAV, en donde el genoma de rAAV es de longitud mayor que aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una o más repeticiones

5 terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende dos ITRs de AAV. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y

10 aproximadamente 6 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb, o entre aproximadamente 5,2 kb y 8,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de de rAAV es de longitud mayor que

15 aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 8,0 kb, 8,7 o 9,0 kb o cualquier valor entre los mismos.

En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas de AAV que comprenden un genoma de rAAV de gran tamaño en donde el transgén heterólogo

20 codifica un producto transgénico terapéutico. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo es un transgén humano. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica Factor VIII, distrofina, disferlina o el regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR). En algunas realizaciones, el transgén heterólogo está unido operativamente a un promotor. En otras realizaciones, el

25 promotor es el promotor de *transtiretina* de ratón (mTTR). En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende un intrón. En realizaciones adicionales, el intrón es un intrón sintético. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende una señal de poliadenilación. En realizaciones adicionales, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de

30 crecimiento bovino.

En algunas realizaciones de las líneas celulares anteriores, la partícula de rAAV comprende una cápside de un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV

35 V708K, AAV caprino, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón o

rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, el serotipo del AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones de los métodos anteriores, las ITRs de AAV son ITRs del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV caprino, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITRs del AAV son ITRs de AAV2. En algunas realizaciones, las ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside se derivan de AAV2. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAVrh8R. En algunas realizaciones, las partículas de AAV comprenden ITRs de AAV2 y cápside de AAV8.

En algunas realizaciones de la invención, las partículas de AAV que comprenden un genoma de AAV de gran tamaño se producen en una célula productora. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células de primate. En algunas realizaciones, la línea celular productora se deriva de células HeLa, 293, A549, o Perc.6. En algunas realizaciones, la línea celular productora está destinada a crecimiento en suspensión. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus o HSV. En algunas realizaciones, las partículas rAAV se recogen entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de la provisión de funciones auxiliares.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una partícula de AAV que comprende un genoma de rAAV de gran tamaño en donde el genoma de rAAV comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano, una secuencia de poliadenilación sintética, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano, una secuencia de poliadenilación sintética de la hormona de crecimiento bovina, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el FVIII comprende una delección de todo o parte del dominio B. En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende la cápside de AAVrh8R. En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende la cápside de AAV8.

En algunos aspectos, la invención proporciona un vector rAAV que comprende un genoma de rAAV, en donde el genoma de rAAV comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII

humano, una secuencia de poliadenilación sintética, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano, una secuencia de poliadenilación sintética de la hormona de crecimiento bovina, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el FVIII comprende una delección de todo o parte del dominio B.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo con una enfermedad o trastorno que comprende administrar al individuo una partícula de AAV que comprende un genoma de rAAV de gran tamaño que codifica un transgen terapéutico en donde el transgén terapéutico es adecuado para tratar la enfermedad o el trastorno. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero (p.ej., un ser humano). En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es hemofilia A. En algunas realizaciones, el transgén terapéutico codifica factor VIII; por ejemplo, factor VIII humano, incluyendo factor VIII humano con el dominio B suprimido.

En algunas realizaciones, la invención proporciona kits que comprenden partículas de AAV que comprenden un genoma de rAAV de gran tamaño como se describe aquí.

Todas las referencias citadas aquí, incluidas las solicitudes y publicaciones de patentes, se incorporan por referencia en su totalidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1A muestra un diagrama de casetes de expresión de hFVIII, con base en el promotor de transtiretina de ratón (mTTR), que van desde 5,1 hasta 5,4 kb de tamaños del genoma del vector (como se indica). Modificación de la secuencia en sitios de unión a HNF4 (círculos abiertos) y sitios de unión a HNF3 (círculos rellenos) y se muestra su ubicación. Abreviaturas para las FIGS. 1A, 1B y 1C: ITRs, repeticiones terminales invertidas en rAAV; mTTR, promotor de transtiretina de ratón (202 o 482 pb); HI, intrón híbrido; FVIII, ADNc del FVIII humano con dominio B suprimido; syn pA, sintético (syn pA); BGH u hormona de crecimiento bovina (BGH) poli A (pA).

FIG. 1B muestra un alineamiento de las secuencias promotoras de mTTR utilizadas en los experimentos descritos aquí.

FIG. 1C niveles de FVIII a partir de casetes de expresión de mTTR-FVIII *in vivo*. Los vectores plasmídicos se inyectaron por vía intravenosa mediante inyección de gran volumen en ratones C56BL/6, y los niveles de factor VIII en plasma se midieron mediante ensayo de ELISA.

FIG. 1D muestra la estructura de la casete de expresión de 5,1 kb de FVIII . Esta case incluye repeticiones terminales invertidas (ITRs) de rAAV, promotor de transtiretina de ratón (mTTR), intrón híbrido (HI), un ADNc del FVIII humano con dominio B suprimido, y una secuencia poli A sintética.

5 FIG. 1E muestra el plásmido TriplePlay que contiene el genoma del vector FVIII, genes rep y cap, así como los genes responsables de la resistencia a los fármacos puromicina y canamicina.

FIGS. 2A y 2B muestran el análisis de transferencia Southern de ADN genómico a partir de clones seleccionados masterwall (MWs). (FIG. 2A) El plásmido TriplePlay de FVIII se cortó con SpeI que genera un fragmento lineal de 13 kb. Este se usó como control de tamaño para un plásmido TriplePlay de longitud unitaria y para patrón con número de copias integrado. (FIG. 2B) La integridad del genoma del vector integrado se analizó por digestión con BglII y HincII. Estas enzimas cortan dentro de la casete de expresión de FVIII dando como resultado fragmentos de 1,8 y 2,8 kb. En
10 ambas figuras, se proporcionan diagramas que muestran los vectores y los sitios de restricción.

FIGS. 3A y 3B muestran análisis del rendimiento y la estabilidad de la producción del vector AAVrh8R/mTTR-FVIII 5,1 kb. (FIG. 3A) Curso temporal de la producción de vectores AAVrh8R/5,1 kb. Los cultivos en el agitador se infectaron con
20 adenovirus de tipo salvaje (Ad wt), se recogieron muestras los días 2, 3 y 4, el rendimiento de vectores se cuantificó mediante qPCR en genomas de vectores por ml (VG/ml). (FIG. 3B) La estabilidad de masterwells de alta producción seleccionados. Se muestran los niveles de producción del vector rAAV para MW#287 (AAV8/5,1 kb), MW#35 (AAVrh8R/5,1 kb) y MW#163 (AAVrh8R/5,4 kb). Los masterewells se pasaron
25 hasta el pase 20 o 26 y la productividad de rAAV (DRP/ml) se cuantificó mediante qPCR.

FIGS. 4A y 4B muestra un análisis de calidad de vectores rAAVrh8R/FVIII de gran tamaño 5,1 kb. Los lotes de vectores de 5,1 kb PCL y TXN producidos se compararon por análisis AUC. AAVrh8R/5.1 kb FVIII se generó tres veces usando
30 MW#35 (FIG. 4A) y se comparó con el mismo vector producido por el método TXN (FIG. 4B). La calidad de los vectores se evaluó mediante análisis de ultracentrifugación analítica (AUC) que mide las diferencias en la masa del virus. Insertar indica % de cápsides con diferentes valores de sedimentación (S). Las cápsides vacías normalmente tienen un valor S de 63 a 66, mientras que las cápsides
35 con el genoma del vector de tamaño de tipo salvaje están típicamente al S de 100 a

103.

FIGS. 5A y 5B muestra un análisis de calidad de vectores rAAVrh8R/FVIII de gran tamaño 5,4 kb. PCL (FIG. 5A) y TXN (FIG. 5B) que produjeron lotes de vectores de 5,4 kb se compararon por análisis AUC. Insertar indica % de cápsides con diferentes valores de sedimentación (S). Los porcentajes de las cápsides vacías (64s/63s) y partículas con genomas más grandes (101S/99S) están dentro de un círculo.

FIGS. 6A y 6B muestra la caracterización de genomas de vector empaquetados en vectores rAAVrh8R/5.1 kb generados en PCL or TXN por transferencia Southern. Los genomas de vector fueron aislados a partir de viriones purificados y analizados con respecto al tamaño por electroforesis en gel alcalino, seguido por transferencia Southern utilizando sondas específicas para el vector. (FIG. 6A) Análisis Southern usando la sonda de FVIII 4,0 kb (dominios de FVIII A1, A2, A3 y C1).VG se cargaron a $1,1$ y $6,0 \times 10^9$ VG/calle y se separaron en gel alcalino al 1%. El vector FVIII de 5,1 kb generado por PCL (MW#35) o transfección triple se comparó con el vector de 4,6 kb (idéntico al vector rh8R/5,1 kb excepto que el dominio C1 se suprimió para crear el vector de tamaño normal). (FIG. 6B) La intensidad de la señal de cada tamaño VG característico se cuantificó y representó gráficamente como % de señal total en cada calle.

FIGS. 7A, 7B y 7C muestran caracterización para extremos 5' de genomas de vector empaquetados en vectores rAAVrh8R/5,1 kb generados por PCL o TXN por análisis de transferencia puntual de ADN. Lotes de vector utilizados en la fig. 5 se analizaron mediante la aplicación de diluciones seriadas al doble de cada vector a una membrana (a partir de $2,4 \times 10^9$; total de ocho concentraciones decrecientes de vectores más ningún genoma aplicado como control negativo). Cada transferencia se hibridó con la sonda de oligonucleótidos marcada en el extremo 3' específica para el centro o los extremos terminales 5' de los genomas de los vectores (polaridad más o menos). La intensidad de la señal se cuantificó y se normalizó a vector de 4,6 kb (completamente empaquetado). Se usaron tres concentraciones para generar un error típico. (FIG. 7A) Diagrama que muestra la localización de las sondas de oligonucleótidos usadas. Los valores indican la distancia en nucleótidos para los respectivos extremos 3' . (FIG. 7B) Análisis de las cadenas menos. (FIG. 7C) Análisis de las cadenas más.

FIGS. 8A, 8B, 8C y 8D muestran la caracterización de extremos 5' y 3' de genomas de vector empaquetados en vectores rAAVrh8R/5,1 kb generados en PCL o

TXN. (FIG. 8A) Diagrama que muestra la localización de las sondas de oligonucleótidos para extremos 5' y 3' de cadenas más y menos de genomas de vector usados. (FIG. 8B) Cuantificación de cadenas más y menos de genomas de vector de 5,1 kb en cada lote. El vector analizado incluído consistía en genomas de mTTR-FVIII de 4,6 kb o 5,1 kb. Se indica el método de producción de vectores (PCL 5 TXN). Todos los vectores se purificaron de manera similar. El análisis se efectuó como se describe en Fig 5 aplicando diluciones seriadas al doble de cada vector a la membrana (empezando en $3,0 \times 10^9$; total de ocho concentraciones decrecientes de vectores). Los plásmidos que contenían ADNc de FIX (control negativo) o FVIII 10 (control positivo) cDNA se usaron como controles con respecto a la especificidad de la señal. (FIG. 8C) Análisis Southern analysis usando sondas de oligonucleótidos 3' y 5' terminales para los vectores de 5,1 kb. VG se cargaron a $1,5$ y $7,5 \times 10^9$ VG/calle y se separaron en gel alcalino al 1%. Vectores FVIII de 5,1 kb generados por PCL (MW#35) o transfección triple (TXN) se compararon con vector de 4,6 kb de tamaño. 15 Se muestran marcadores de tamaño (2,7, 4,7 y 5,1 kb). Panel superior, análisis de la cadena más; Panel inferior, análisis de la cadena menos. Se muestran los oligonucleótidos usados para cada panel. Las flechas blancas indican las señales que faltan. (FIG. 8D) Cuantificación del tamaño de los genomas en cada vector. La intensidad de la señal en los paneles sondeados con sondas de oligonucleótidos en 3 20 'terminal (detecta todos los genomas empaquetados) se cuantificó por ImageJ. La intensidad de cada tamaño distinto VG ($> 4,7$ kb, $4,7$ kb y $<4,7$ kb) se cuantificó y representó gráficamente como % del total de la señal en cada calle.

FIGS. 9A, 9B y 9C muestran caracterización de los extremos 5' y 3' de genomas de vector empaquetados vectores rAAVrh8R/5,4 kb generados en PCL or 25 TXN . (FIG. 9A) Diagrama que muestra la localización de las sondas de oligonucleótidos para extremos 5' y 3' de cadenas más y menos de genomas de vector usados. (FIG. 9B) Cuantificación de cadenas más y menos de genomas de vector de 5,4 kb en cada lote por análisis de transferencia puntual. El análisis se efectuó como se describe en Fig 8. (FIG. 9C) Análisis Southern de los vectores de 5,4 30 kb utilizando sondas de oligonucleótidos 3' y 5' terminales. El experimento se efectuó como se describe en Fig 8.

FIGS. 10A y 10B muestran la eficacia del vector rAAVrh8R/5,1 kb producido por PCL *in vivo* en ratones KO con hemofilia A. El vector se administró a ratones a través de la vena de la cola a 3×10^{11} y 4×10^{10} DRP/ratón y y los niveles 35 plasmáticos de FVIII fueron analizados hasta el día 56. (FIG. 10A) Actividad de

proteína FVIII en plasma. La actividad se midió en muestras de plasma los días 7, 14, 28, 42 y 56 por el ensayo Coatest. (FIG. 10B) Tiempos de coagulación los días 28 y 56. Los tiempos de coagulación se analizaron mediante el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Cada grupo de tratamiento contiene $n = 7-10$ ratones/grupo.

5 La significación estadística se indica como sigue: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$ por ensayo de la *t* de Student.

FIGS. 11A, 11B y 11C muestran una comparación de vectores AAVrh8R/FVIII de 5,1 kb producidos por PCL y TXN *in vivo* usando ratones KO con hemofilia A. Los vectores se administraron a los ratones a través de la vena de la cola a 4×10^{10} DRP/ratón. (FIG. 11A) Actividad de proteína FVIII en plasma. La actividad se midió en las muestras los días 21, 35, 56, 70 y 84 por el ensayo Coatest. (FIG. 11B) Tiempo de coagulación plasmática el día 21. (FIG. 11C) Tiempo de coagulación plasmática el día 56. Los tiempos de coagulación plasmática se midieron por el ensayo aPTT. Los tiempos de coagulación para estirpes de ratón (129S y BALB/c) se muestran a título comparativo. (Fig.11D) Copias de genoma de vector (VG) en el hígado el día 84. Las copias de VG se cuantificaron por qPCR y se muestran como copias/500 ng de ADN en hígado total. Cada grupo de tratamiento contiene $n = 8$ ratones/grupo. La significación estadística se indica como sigue: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$ por ensayo de la *t* de Student. El método de producción del virus (PCL o TXN) se indica en cada panel.

10
15
20

FIGS. 12A, 12B y 12C muestran una comparación de vectores AAVrh8R/FVIII de 5,4 kb producidos por PCL y TXN *in vivo* usando ratones KO con hemofilia A. Los vectores se administraron a los ratones a través de la vena de la cola a 4×10^{10} DRP/ratón y se recogieron muestras de plasma los días 24 y 43 después de la administración del vector. (FIG. 12A) Actividad plasmática de FVIII. La actividad se midió los días 24 y 43 en muestras de plasma por el ensayo Coatest. (FIG. 12B) Tiempos de coagulación de plasma el día 24 por ensayo aPTT. (FIG. 12C) Las copias de genoma de vector (VG) en hígado los días 3 y 43. Los animales se sacrificaron los días 3 y 43 después de la administración del vector y las copias de VG se cuantificaron por qPCR y se muestran como copias/500 ng de ADN de hígado total. Cada grupo de tratamiento contiene $n = 6-8$ ratones/grupo. La significación estadística se indica como sigue: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$ por ensayo de la *t* de Student.

25
30

FIG. 13A muestra un diagrama para los vectores AAV2/SEAP de 5,1, 5,9 y 6,7 kb. FIG. 13B muestran los datos de masterwells (MWs) individuales con respecto al

35

rendimiento del vector en ensayos de producción relativa y específica (n=2). El rendimiento del vector se indica como DRP/ml.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se discutió aquí con detalle, los inventores han desarrollado una
 5 plataforma de línea celular productora capaz de generar un mayor rendimiento de
 vectores de mejor calidad y de gran tamaño de virus adeno-asociado recombinante
 (rAAV). Esta plataforma se ha caracterizado usando vectores de VAAr que contienen
 ADNc del factor VIII humano como una construcción a modo de ejemplo. En
 comparación con la producción utilizando el método de transfección triple estándar,
 10 esta plataforma genera vectores de rAAV con una mayor cantidad de genomas más
 grandes encapsidados. Los vectores de rAAV generados usando esta plataforma
 también eran competentes para la transferencia génica *in vivo* y dieron como resultado
 la producción del factor VIII funcional.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para la
 15 producción de una partícula de virus adeno-asociado (AAV) que contiene un genoma
 de AAV recombinante de gran tamaño. En algunas realizaciones, los métodos
 incluyen cultivar una línea celular productora de AAV en condiciones que generan
 partículas rAAV, en donde la línea celular productora de AAV contiene i) ácido
 nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV, y ii) un genoma de rAAV, en donde
 20 el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb,
 opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb; b) proporcionar funciones auxiliares
 de AAV; y c) recoger las partículas rAAV que contienen genomas de rAAV de gran
 tamaño. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor que
 aproximadamente 5 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es de longitud
 25 mayor que aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5
 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb,
 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 8,0 kb o 9,0 kb o cualquier valor entre los mismos.
 Además, se proporcionan aquí partículas rAAV que contiene un genoma de AAV
 recombinante de gran tamaño producido por los métodos de la siguiente descripción.

30 Aún más, se proporcionan aquí composiciones que incluyen partículas rAAV
 en donde al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al
 menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos
 aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente
 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos
 35 aproximadamente 60% o al menos aproximadamente 70% de las partícula de rAAV

encapsidan un genoma de rAAV mayor que aproximadamente 5 kb.

Más aún, se proporcionan aquí líneas celulares para producir una partícula de virus adeno-asociado (AAV) que contiene un genoma de AAV recombinante de gran tamaño, la línea celular incluye a) ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV, y b) un genoma de rAAV, donde el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor que aproximadamente 5 kb.

Más aún, se proporcionan aquí partículas de virus adeno-asociado (AAV) que contienen un genoma de rAAV encapsidado por una cápside de AAV, donde el genoma de rAAV está entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor que aproximadamente 5 kb.

I. Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos que se describen o se citan aquí por referencia son generalmente bien entendidos y habitualmente empleados usando metodología convencional por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow y Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley y Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology, Human Press*; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., J. Wiley y Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway et al., 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal*

Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

Un "vector," tal como se usa aquí, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico a ser entregado en una célula huésped, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" tal como se usa aquí se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Así, este término incluye, pero no está limitado a, ARN o ADN se cadena sencilla, doble o múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases purínicas o pirimidínicas, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales, o derivadas. El esqueleto del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN), o grupos fosfato o azúcar modificados o sustituidos. Alternativamente, la cadena principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y así puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido (P-NH₂) o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Además, se puede obtener un polinucleótido de cadena doble a partir del producto polinucleotídico monocatenario de síntesis química ya sea sintetizando la cadena complementaria y reasociando las cadenas en condiciones apropiadas, o sintetizando la cadena complementaria de novo usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácido, y no se limitan a una longitud mínima. Tales polímeros de restos de aminoácidos pueden contener restos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros, y multímeros de restos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de los mismos están abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, a efectos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente

conservadoras en la naturaleza), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a
5 amplificación por PCR.

Un "vector viral recombinante" se refiere a un vector de polinucleótido recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico de origen no viral). En el caso de vectores de AAV recombinantes, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una secuencia de
10 repetición terminal invertida (RTI). En algunas realizaciones, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por dos ITR.

Un "vector de AAV recombinante (vector rAAV)" se refiere a un vector polinucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico de origen distinto de AAV) que están flanqueadas por al
15 menos una o dos secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. Dichos vectores rAAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula hospedadora que se ha infectado con un virus auxiliar adecuado (o que expresa funciones auxiliares adecuadas) y que expresa productos génicos de rep y cap de AAV (es decir, proteínas Rep y Cap de
20 AAV). Cuando se incorpora un vector rAAV en un polinucleótido mayor (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido usado para clonación o transfección), entonces el vector rAAV puede denominarse "provector" que puede "rescatarse" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un vector rAAV puede
25 estar en cualquiera de varias formas, incluyendo, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, en complejo con lípidos, encapsulado dentro de liposomas y encapsidado en una partícula viral, por ejemplo, una partícula AAV. Un vector rAAV puede empaquetarse en una cápside de virus AAV para generar una "partícula viral adenoasociada recombinante (partícula rAAV)".

30 Como se usa en el presente documento, una "línea celular productora" es una línea celular estable capaz de producir partículas AAV. En algunas realizaciones, se mantienen genes de la cápside y/o replicación de AAV de forma estable en la línea celular hospedadora. En algunas realizaciones, un genoma de vector AAV que comprende una o más ITR de AAV y ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un
35 transgén heterólogo) se mantienen de forma estable en la línea celular hospedadora.

En algunas realizaciones, se mantienen de forma estable en la línea celular hospedadora genes de la cápside y/o de replicación de AAV y un genoma de vector AAV que comprende una o más ITR de AAV y ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un transgén heterólogo). En algunas realizaciones, se integran de forma estable en el

5 genoma de la línea celular hospedadora uno o más de los genes de replicación de AAV, genes de la cápside o un genoma del vector de AAV que comprende una o más ITR de AAV. Un experto en la materia entendería que un ácido nucleico mantenido de forma estable se mantiene en la línea celular hospedadora tras múltiples pases (por ejemplo, 5, 10, 15, 25, o más pases).

10 “Heterólogo” significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se comprara o en la que se traduce o incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un tipo celular diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De forma similar, una secuencia celular (por

15 ejemplo, un gen o parte del mismo) que se incorpora en un vector viral es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

El término “transgén” se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de transcribirse en ARN y opcionalmente, traducirse y/o expresarse en condiciones apropiadas. En algunos aspectos, confiere una propiedad deseada a

20 una célula en la que se introduce, o conduce de otro modo a un resultado terapéutico o de diagnóstico deseado. En otro aspecto, puede transcribirse a una molécula que medie en la interferencia de ARN, tal como en miARN, ARNip o ARNhp.

La expresión “promotor de transtiretina (TTR)” se refiere a una secuencia polinucleotídica capaz de conducir la expresión génica derivada de un gen de

25 transtiretina. En algunas realizaciones, el promotor de transtiretina puede ser de un gen de transtiretina de ratón (mTTR) (por ejemplo, transtiretina de *Mus musculus*, como se representa en GenBank Entrez Gene ID 22139). Se presentan ejemplos de promotores de TTR en la Figura 1B.

Las expresiones “partículas del genoma (gp)”, “equivalentes genómicos” o

30 “copias de genoma” como se usa en referencia a un título viral, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas de genoma en una preparación de vector particular puede medirse por procedimientos tales como los descritos en los Ejemplos en el presente documento, o, por ejemplo, en

35 Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*,

6:272-278.

La expresión “genoma de vector (vg)” como se usa en el presente documento puede referirse a uno o más polinucleótidos que comprenden un conjunto de las secuencias polinucleotídicas de un vector, por ejemplo, un vector viral. Un genoma de vector puede estar encapsidado en una partícula viral. Dependiendo del vector viral particular, un genoma de vector puede comprender ADN monocatenario, ADN bicatenario, o ARN monocatenario, o ARN bicatenario. Un vector de genoma puede incluir secuencias endógenas asociadas con un vector viral particular y/o cualquier secuencia heteróloga insertada en un vector viral particular mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, un genoma de vector de AAV recombinante puede incluir al menos una secuencia de ITR que flanquea un promotor, una secuencia de interés (por ejemplo, un transgén heterólogo), opcionalmente un intrón, y una secuencia de poliadenilación. Un genoma de vector completo puede incluir un conjunto completo de las secuencias polinucleotídicas de un vector. En algunas realizaciones, el título ácido nucleico de un vector viral puede medirse con respecto a vg/ml. Se conocen en la técnica métodos adecuados para medir esta titulación (por ejemplo, PCR cuantitativa).

La expresión “genoma de AAV recombinante de gran tamaño” puede referirse a un genoma de AAV recombinante con un tamaño (como se mide en pares de bases de nucleótidos) mayor que el límite de empaquetamiento convencional para un genoma de AAV, que se ha definido en la técnica como 4,7 a 4,8 kb (véase, por ejemplo, Dong, J-Y *et al.* (1996) *Human Gene Therapy* 7:2101-2112). En algunas realizaciones, un genoma de AAV recombinante de gran tamaño es mayor de aproximadamente 4.7 kb. En algunas realizaciones, un genoma de AAV recombinante de gran tamaño es mayor de aproximadamente 5 kb. En algunas realizaciones, un genoma de AAV recombinante de gran tamaño es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb.

Las expresiones “unidad de infección (ui),” “partícula infecciosa,” o “unidad de replicación,” como se usa en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y competentes para replicación como se mide por ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

La expresión “unidad de transducción (ut)” como se usa en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas que dan como resultado la producción de un producto transgénico

funcional como se mide en ensayos funcionales tales como los descritos en los Ejemplos del presente documento, o por ejemplo, en Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; o en Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (ensayo de LFU).

5 Una secuencia de “repetición terminal invertida” o “ITR” es una expresión que se entiende bien en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas halladas en los extremos de genomas virales que están en orientación opuesta.

 Una secuencia de “repetición terminal invertida de AAV (ITR)”, una expresión bien entendida en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos
10 que está presente en ambos extremos del genoma de AAV monocatenario nativo. Los 125 nucleótidos más externos de la ITR pueden estar presentes en una de dos orientaciones alternativas, lo que conduce a heterogeneidad entre diferentes genomas de AAV y entre los dos extremos de un único genoma de AAV. Los 125 nucleótidos más externos también contienen varias regiones más cortas de
15 autocomplementariedad (designadas regiones A, A', B, B', C, C' y D), lo que permite que se realicen pares de bases intracatenarios dentro de esta parte de la ITR.

 Una “secuencia de resolución terminal” o “trs” es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que se escinde por proteínas rep de AAV durante la replicación de ADN viral. Una secuencia de resolución terminal mutante es refractaria a escisión por
20 proteínas rep de AAV.

 Las “funciones auxiliares de AAV” se refieren a funciones que permiten que AAV se replique y empaquete por una célula hospedadora. Pueden proporcionarse funciones auxiliares de AAV en cualquiera de varias formas, incluyendo, pero sin limitación, virus auxiliar o genes de virus auxiliar que ayudan en la replicación y
25 empaquetamiento de AAV. Se conocen en la técnica otras funciones auxiliares de AAV tales como agentes genotóxicos.

 Un “virus auxiliar” para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (que es un parvovirus defectuoso) se replique y se empaquete por una célula hospedadora. Se han identificado varios de dichos virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpesvirus,
30 poxvirus tales como vaccinia y baculovirus. Los adenovirus abarcan varios subgrupos diferentes, aunque el adenovirus de tipo 5 de subgrupo C (Ad5) es el más habitualmente usado. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar, y están disponibles de depositarios tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles de depositarios tales
35 como ATCC, incluyen, por ejemplo, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-

Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) y virus de pseudorrabia (PRV). Los ejemplos de funciones auxiliares de adenovirus para la replicación de AAV incluyen funciones E1A, funciones E1B, funciones E2A, funciones VA o funciones E4orf6. Los baculovirus disponibles de depositarios incluyen virus de la polihidrosis nuclear de *Autographa californica*.

Se dice que una preparación de rAAV está “sustancialmente libre” de virus auxiliar si la relación de partículas AAV infecciosas con respecto a partículas de virus auxiliar infecciosas es de al menos aproximadamente de $10^2:1$; al menos aproximadamente $10^4:1$, al menos aproximadamente $10^6:1$; o al menos aproximadamente $10^8:1$ o más. En algunas realizaciones, las preparaciones también están libres de cantidades equivalentes de proteínas de virus auxiliar (es decir, proteínas como estarían presentes como resultado de dicho nivel de virus auxiliar si las impurezas de partículas de virus auxiliares indicadas anteriormente estuvieran presentes en forma alterada). Puede observarse en general contaminación de proteínas virales y/o celulares como la presencia de bandas de tinción de Coomassie en geles SDS (por ejemplo, la aparición de bandas distintas de las correspondientes a las proteínas de cápside de AAV VPI, VP2 y VP3).

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia” con respecto a un polipéptido de referencia o secuencia de ácido nucleico se define como el porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia polipeptídica o de ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas de software informáticos disponibles públicamente, por ejemplo, los descritos en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1987), Sup. 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1, e incluyendo software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un ejemplo de un programa de alineamiento es ALIGN Plus (Scientific y Educational Software, Pensilvania). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos

de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede como alternativa expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera: 100 por la fracción X/Y , en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento de ese programa de A y B, y en el que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A frente a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B frente a A. Para fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico dada D (que puede como alternativa expresarse como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula de la siguiente manera: 100 por la fracción W/Z , en la que W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento de ese programa de C y D, y en el que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no sea igual a la longitud de secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C.

Una molécula "aislada" (por ejemplo, ácido nucleico o proteína) o célula significa que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos (por ejemplo, alivio de síntomas, consecución de criterios de valoración clínicos y similares). Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. Con respecto a una patología, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para aliviar, estabilizar o retardar el desarrollo de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y

caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

5 Como se usa en el presente documento “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (por ejemplo, que no empeora), prevención de la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, retardo o ralentización de la
10 progresión de la enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión (bien parcial o total), bien detectable o bien indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “tratamiento profiláctico” se refiere a tratamiento, en el que se sabe o se sospecha que un individuo tiene o está en riesgo de tener un trastorno, pero no presenta síntomas o presenta síntomas mínimos del trastorno. Un individuo que se somete a tratamiento profiláctico puede tratarse antes de la aparición de síntomas.

20 Como se usa en el presente documento, un agente “terapéutico” (por ejemplo, un polipéptido, ácido nucleico o transgén terapéutico) es uno que proporciona un resultado clínico beneficioso o deseado, tal como los resultados clínicos ejemplares descritos anteriormente. Como tal, un agente terapéutico puede usarse en un tratamiento como se ha descrito anteriormente.

25 Como se usa en el presente documento, “valor de distribución de coeficiente diferencial” o “C(S)” es una variante de la distribución de soluciones de ecuación de Lamm para describir distribuciones de partículas en sedimentación; por ejemplo, durante la ultracentrifugación.

30 Como se usa en el presente documento, “unidades de Svedberg” se refiere a una unidad para la velocidad de sedimentación. La velocidad de sedimentación para una partícula y forma dadas mide lo rápido que la partícula se sedimenta. Una unidad de Svedberg es equivalente a 10^{-13} segundos. Por ejemplo, se usan con frecuencia unidades de Svedberg para reflejar la velocidad a la que una molécula viaja bajo la fuerza centrífuga de una centrífuga.

35 Como se usa en el presente documento, “condiciones de velocidad de sedimentación” o “condiciones de velocidad de sedimentación límite” pueden referirse

a cualquier condición experimental en la que una solución de muestra se somete a análisis de velocidad de sedimentación. La velocidad de sedimentación permite el estudio de partículas sobre una amplia serie de condiciones de pH y fuerza iónica y a temperaturas de 4 a 40 °C. La velocidad a la que el límite de sedimentación se mueve es una medida del coeficiente de sedimentación de la especie en sedimentación. El coeficiente de sedimentación depende del peso molecular (las partículas mayores sedimentan más rápido) y también de la forma molecular. La anchura mínima del límite de sedimentación está relacionada con el coeficiente de difusión de la molécula; la presencia de múltiples especies con coeficientes de sedimentación similares provocarán que el límite sea más amplio de lo esperado basándose solamente en la difusión. Las condiciones de velocidad de sedimentación pueden incluir sin limitación cualquier condición relacionada con la velocidad de rotor, distancia entre la muestra y el centro del rotor, la temperatura, el disolvente, la muestra, el tampón, el tiempo de ultracentrifugación, el intervalo de tiempo para la detección, características de ventana óptica y de sector, instrumentación de AUC (incluyendo ultracentrífuga y aparato de detección), diálisis en equilibrio de disolvente de referencia y algoritmos de análisis de datos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “equilibrio de sedimentación de gradiente de densidad analítico” se refiere a métodos para medir la densidad de flotación de una partícula, o usando diferencias en la densidad de flotación para separar diferentes especies de partículas. Estos métodos pueden usar, por ejemplo, técnicas de equilibrio de sedimentación AUC. En estos métodos, una solución de partícula (sin limitación, una solución de un polipéptido, polinucleótido o cápsides virales) puede someterse a ultracentrifugación en un solvato en gradiente, tal como un gradiente de cloruro de cesio o sulfato de cesio, hasta que se obtenga el equilibrio con el solvato. En equilibrio, la solución de partícula se concentrará, o se acumulará en la posición en el gradiente en la que la densidad de la partícula es igual a la del solvato. La posición de bandas puede usarse para calcular la densidad de partículas, o puede extraerse una banda para aislar una única especie de partícula.

Como se usa en el presente documento, el “algoritmo SEDFIT” es un algoritmo que permite analizar datos hidrodinámicos tales como velocidad de sedimentación (Schuck (2000) *Biophys. J.*, 78:1606-19). En el algoritmo SEDFIT, se crea una cuadrícula de coeficientes de sedimentación a través de un intervalo esperado. Los límites de sedimentación se simulan usando soluciones a la ecuación de Lamm para cada coeficiente de sedimentación, suponiendo una forma de partícula y relación de

fricción de disolvente constantes.

Como se usa en el presente documento, la expresión “estadístico F” o “relación F” se refiere al nivel de confianza. Este parámetro controla la cantidad de regularización usada. Tiene un significado diferente para diferentes intervalos: de 0 a 0,5, no se usa regularización. Los valores de 0,5 a 0,999 corresponden a probabilidades P (niveles de confianza). A partir de estos P valores, el aumento de chi cuadrado deseado permite calcular la restricción de parsimonia de la regularización con estadísticos F. Un valor de 0,51 provocará muy poca regularización; los valores de 0,68 a 0,90 corresponderían a niveles de confianza usados frecuentemente (habitualmente, con 50 exploraciones o más el aumento de chi cuadrado correspondiente a una probabilidad de 0,7 es del orden de 0,1 %), mientras que los valores cercanos a 0,99 provocarían regularización muy alta. La relación de estos valores con probabilidades puede examinarse usando la calculadora de estadísticos F. Si se introducen números > 1 , se toman directamente como relaciones de chi cuadrado (ya que no hay probabilidades > 1). Por ejemplo, un valor de 1,1 dará como resultado regularización con 10 % de aumento de chi cuadrado.

La referencia a “aproximadamente” un valor del parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro en sí mismo. Por ejemplo, la descripción que se refiere a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”.

Como se usa en el presente documento, la forma singular de los artículos “un” y “el” incluye referencias plurales a no ser que se indique otra cosa.

Se entiende que aspectos y realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen “que comprende”, “que consiste” y/o “que consiste esencialmente en” aspectos y realizaciones.

III. Partículas virales

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a partículas de virus adenoasociados (AAV) que contienen un genoma de AAV recombinante (rAAV) de gran tamaño (por ejemplo, como se produce por los métodos y/o las líneas celulares desvelados en el presente documento). Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a partículas de virus adenoasociados (AAV) que contienen un genoma de rAAV entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6.7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor de aproximadamente 5 kb encapsidado por una cápside AAV. En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende un vector de rAAV. En algunas

realizaciones, el vector de rAAV contiene un genoma de rAAV entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor de aproximadamente 5 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV está entre aproximadamente 5 kb y

5 aproximadamente 7,0 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor de aproximadamente cualquiera de of 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 7,1 kb, 7,2 kb, 7,3 kb, 7,4 kb, 7,5

10 kb, 7,6 kb, 7,7 kb, 7,8 kb, 7,9 kb, 8,0 kb, 8,1 kb, 8,2 kb, 8,3 kb, 8,4 kb, 8,5 kb, 8,6 kb, 8,7 kb, 8,8 kb, 8,9 kb, 9,0 kb, 9,2 kb, 9,3 kb o 9,4 kb de longitud o cualquier valor entre medias.

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico heterólogo (por

15 ejemplo, un transgén heterólogo) flanqueado por una o dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. El ácido nucleico está encapsidado en la partícula AAV. La partícula AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende la secuencia o las secuencias codificantes de interés (por ejemplo, un transgén heterólogo) unidas operativamente a componentes en la

20 dirección de la transcripción, secuencias de control incluyendo secuencias de inicio y terminación de la transcripción, formando de este modo un casete de expresión. El casete de expresión está flanqueado en el extremo 5' y 3' por al menos una secuencia de ITR de AAV funcional. Por "secuencia de ITR de AAV funcional" se entiende que la secuencia de ITR actúa como se pretendía para el rescate, la replicación y el

25 empaquetamiento del virión de AAV. Véase Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; y Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16, todas las cuales se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia. Para practicar algunos aspectos de la invención, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para

30 encapsidación y las estructuras físicas para infección por el rAAV. No es necesario que las ITR de AAV para uso en los vectores de la invención tengan una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre (por ejemplo, como se describe en Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801), y pueden alterarse mediante la inserción, supresión o sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV puede derivar de cualquiera de varios

35 serotipos de AAV. Se conocen en la actualidad más de 40 serotipos de AAV y

continúan identificándose nuevos serotipos y variantes de serotipos existentes. Véase Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; y Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810. El uso de cualquier serotipo de AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un

5 vector de rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV, incluyendo sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón o similares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el serotipo de AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9,

10 AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en las ITR de AAV son ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón o similares. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de AAV2.

15 En realizaciones adicionales, las partículas rAAV comprenden una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV4, una cápside de AAV5, una cápside de AAV6 (por ejemplo, una cápside de AAV6 de tipo silvestre, o una cápside de AAV6 variante tal como ShH10, como se describe en la publicación de PG de Estados Unidos 2012/0164106), una cápside de AAV7, una

20 cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8, una cápside de AAVrh8R, una cápside de AAV9 (por ejemplo, una cápside de AAV9 de tipo silvestre, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la publicación de PG de Estados Unidos 2013/0323226), una cápside de AAV10, una cápside de AAVrh10, una cápside de AAV11, una cápside de AAV12, un mutante de la cápside de tirosina, un mutante de la

25 cápside de unión a heparina, una cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAAV2/2-7m8, una cápside de AAV DJ (por ejemplo, una cápside de AAV-DJ/8, una cápside de AAV-DJ/9, o cualquier otra de las cápsides descritas en la publicación de PG de Estados Unidos 2012/0066783), una cápside de AAV2 N587A, una cápside de AAV2 E548A, una cápside de AAV2 N708A, una cápside de AAV V708K, una

30 cápside de AAV de cabra, una cápside quimérica de AAV1/AAV, una cápside de AAV bovina, una cápside de AAV de ratón, una cápside de rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descrita en la patente de Estados Unidos N.º: 8.283.151 o Publicación Internacional N.º: WO/2003/042397. En algunas realizaciones, una proteína de la cápside mutante mantiene la capacidad de formar una cápside de AAV. En algunas

35 realizaciones, la partícula rAAV comprende cápside mutante de tirosina AAV5 (Zhong

L. *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832). En realizaciones adicionales, la partícula rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los Clados A-F (Gao, *et al.*, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381). En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una proteína de la cápside de AAV1 o un mutante de la misma. En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una proteína de la cápside de AAV2 o un mutante de la misma. En algunas realizaciones, el serotipo de AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10 o AAVrh10. En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una cápside de AAV de serotipo 1 (AAV1). En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una cápside de AAV de serotipo 2 (AAV2). En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una cápside de AAVrh8R o mutante de la misma.

Se usan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana particulares o para dirigirse a tipos celulares específicos dentro de un tejido diana particular (por ejemplo, tejido de hígado o del SNC). Una partícula rAAV puede comprender proteínas virales y ácidos nucleicos virales derivados del mismo serotipo o diferentes serotipos (por ejemplo, un serotipo mixto). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una partícula rAAV puede comprender proteínas de la cápside de AAV1 y al menos una ITR de AAV2 o puede comprender proteínas de la cápside de AAV2 y al menos una ITR de AAV1. Cualquier combinación de serotipos de AAV para producción de una partícula rAAV se proporciona en el presente documento como si cada combinación se hubiera indicado expresamente en el presente documento. En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas rAAV que comprenden una cápside de AAV1 y un vector de rAAV de la presente divulgación (por ejemplo, un casete de expresión que comprende un ácido nucleico heterólogo), flanqueado por al menos una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas rAAV que comprenden una cápside de AAV2. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside derivan de AAV2. En otras realizaciones, la ITR deriva de AAV2, y la cápside deriva de AAVrh8R.

Aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a composiciones que incluyen partículas rAAV, en las que al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 % o al menos aproximadamente el 70 %, al menos

aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % de las partículas rAAV encapsidan un genoma de rAAV entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, las partículas rAAV encapsidan un genoma mayor de aproximadamente 5 kb. En algunas realizaciones, las partículas rAAV encapsidan un genoma mayor de aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 8,0 kb o 9,0 de longitud o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 5'. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 3'. Se conocen en la técnica métodos para ensayar el tamaño de un genoma de rAAV e incluyen sin limitación transferencia de Southern y ultracentrifugación analítica, como se describe posteriormente.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente divulgación contienen partículas rAAV, en las que al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % de las partículas rAAV encapsidan un genoma de rAAV mayor de aproximadamente 4,7 kb, mayor de aproximadamente 5,0 kb, mayor de aproximadamente 5,1 kb, mayor de aproximadamente 5,2 kb, mayor de aproximadamente 5,3 kb, mayor de aproximadamente 5,4 kb, mayor de aproximadamente 5,5 kb, mayor de aproximadamente 5,6 kb, mayor de aproximadamente 5,7 kb, mayor de aproximadamente 5,8 kb, mayor de aproximadamente 5,9 kb, mayor de aproximadamente 6,0 kb, mayor de aproximadamente 6,5 kb, mayor de aproximadamente 7,0 kb, mayor de aproximadamente 7,5 kb, mayor de aproximadamente 8,0 kb, mayor de aproximadamente 8,5 kb, mayor de aproximadamente 9,0 kb, o mayor de aproximadamente 9,4 kb. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del

extremo 5'. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 3'.

En algunas realizaciones de la invención, las partículas virales recombinantes en la composición están altamente purificadas, convenientemente tamponadas y concentradas. En algunas realizaciones, las partículas virales se concentran hasta al menos aproximadamente 1×10^7 vg/ml a aproximadamente 9×10^{13} vg/ml o cualquier concentración entre medias.

Como se describe en el presente documento, una técnica para caracterizar una preparación de partículas virales (por ejemplo, una o más propiedades relacionadas con un tamaño y/o integridad de genoma de vector) es mediante el uso de transferencia de Southern. Por ejemplo, como se describe en más detalle en los ejemplos posteriores, una preparación de partículas rAAV (opcionalmente purificadas como se describe en el presente documento) pueden tratarse con DNasa para retirar cualquier ácido nucleico no encapsidado, tratarse con un agente para detener la digestión con DNasa (por ejemplo, EDTA), digerirse con una proteinasa, después someterse a extracción de ADN para retirar genomas de vector empaquetado. Los genomas de vector pueden después separarse usando electroforesis, reticularse en una membrana y explorarse con una o más sondas marcadas que hibridan específicamente con el genoma del vector. El tamaño de los fragmentos de ADN que se marcan por hibridación con la sonda marcada (por ejemplo, en comparación con uno o más marcadores de tamaño específicos) indica el tamaño del genoma del vector. Además, pueden usarse una o más sondas que hibridan con segmentos conocidos del genoma del vector (por ejemplo, extremos 5' o 3'). Si una o más de estas sondas no consiguen hibridar con un genoma del vector, esto indica que el genoma o los genomas del vector de la preparación pueden truncarse o suprimirse de otro modo, de modo que son más cortos que su tamaño completo predicho. Ya que se sabe que se produce empaquetamiento de genomas de AAV comenzando desde los extremos 3' (King, J.A. *et al.* (2001) *EMBO J.* 20:3282-3291), los vectores de gran tamaño pueden carecer de secuencia en los extremos 5' de cadenas menos y más cuando el tamaño del genoma supera 4,7 kb. En algunas realizaciones, las partículas virales comprenden genomas de rAAV de gran tamaño mayores de aproximadamente 5,0 kb en los que los genomas virales encapsidados en las partículas rAAV comprenden extremos 5' y 3' relativamente intactos; por ejemplo, como se mide por hibridación con sondas específicas para los extremos 5' y/o 3'. La hibridación puede medirse por métodos conocidos en la técnica tales como, pero sin limitación, análisis

de transferencia de Southern o PCR. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 5'. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 3'.

Ultracentrifugación analítica

5 Como se describe en el presente documento, una técnica para caracterizar una preparación de partículas virales (por ejemplo, una o más propiedades relacionadas con el tamaño y/o la integridad del genoma del vector) es mediante el uso de ultracentrifugación analítica (AUC). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la AUC se usa para evaluar la integridad de genoma del vector de partículas virales
10 adenoasociadas recombinantes (rAAV) en preparaciones de partículas rAAV para distinguir partículas virales con genomas completos, intactos, cápsides virales vacías y partículas virales con genomas virales variantes (por ejemplo, truncados, agregados, impurezas y similares). Puede encontrarse descripción adicional del uso de ultracentrifugación analítica para caracterizar partículas virales (por ejemplo, AAV) en
15 la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º de serie 62/105.714, "Analytical Ultracentrifugation for Characterization of Recombinant Viral Particles," presentada el 20 de enero de 2015, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

La ultracentrifugación analítica es un medio para evaluar el peso molecular y
20 las propiedades hidrodinámicas y termodinámicas de una proteína u otra macromolécula. Heterogeneidad de una proteína o macromolécula por velocidad de sedimentación sobre una serie de condiciones incluyendo concentración, temperatura, fuerza iónica y pH. Por ejemplo, una proteína puede analizarse en una formulación clínicamente relevante. Se proporciona uso de ultracentrifugación analítica para
25 caracterizar preparaciones de adenovirus en Berkowitz, SA y Philo JS, (2007) Anal. Biochem., 362:16-37.

El análisis de AUC se refiere a métodos cuantitativos para caracterizar las propiedades biofísicas de partículas (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y cápsides virales) midiendo su migración a través del disolvente en un campo
30 centrífugo. El análisis de AUC se ha caracterizado bien durante muchas décadas y es altamente versátil. Debido a que el análisis de AUC se basa en información hidrodinámica y termodinámica de primer principio, la AUC puede aplicarse para determinar las propiedades biofísicas de muchos tipos de partículas a través de una amplia serie de concentraciones y tamaños de partículas. El análisis de AUC
35 típicamente abarca dos tipos básicos de experimentos: velocidad de sedimentación y

equilibrio de sedimentación. El análisis de equilibrio de sedimentación proporciona propiedades termodinámicas de partículas que pueden usarse para medir características tales como estequiometría y constantes de asociación. La velocidad de sedimentación proporciona propiedades hidrodinámicas de partículas que pueden usarse para medir características tales como tamaño, forma y concentración. Una característica del análisis de AUC de preparaciones virales es que las mismas condiciones de ensayo pueden usarse para analizar diferentes preparaciones de partículas virales independientemente de la secuencia de nucleótidos del genoma viral o el serotipo de la cápside.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren al uso de análisis de velocidad de sedimentación para caracterizar propiedades de cápsides virales. En algunas realizaciones, el análisis de velocidad de sedimentación usa una celda de velocidad de ultracentrífuga con dos sectores en equilibrio de diálisis (uno para una muestra experimental y uno para una muestra de referencia solamente con disolvente), conteniendo cada uno dos ventanas ópticas que permiten que la luz pase a través del compartimento. La ultracentrifugación aplica una velocidad angular a la celda y conduce a rápida sedimentación de las partículas de soluto hacia el fondo del sector. A medida que se produce sedimentación, se agota el soluto cerca del menisco en la parte superior de la celda, creando un límite de sedimentación entre la región agotada y el soluto en sedimentación. La velocidad de movimiento o migración del límite de sedimentación se mide tomando mediciones que comparan las propiedades de la muestra y sectores de referencia en intervalos temporales específicos (para velocidad de sedimentación, estos intervalos están típicamente en el orden de minutos). Si están presentes múltiples especies de soluto, esto puede conducir a la formación de múltiples límites de sedimentación, correspondientes cada uno a una especie resoluble.

Se conocen en la técnica varios métodos para detectar ópticamente un límite de sedimentación y medir su velocidad de movimiento o migración (para referencia, véase Cole *et al.* (2008) *Methods Cell Biol.*, 84:143-79). En algunas realizaciones, los sectores de referencia y muestra pueden ensayarse usando detección de absorbancia. En este método de detección, la absorbancia a una longitud de onda particular puede medirse para la muestra y los sectores de referencia en diferentes posiciones radiales dentro de cada sector. Como alternativa, puede medirse el ciclo temporal de absorbancia en una única posición radial. La ley de Beer proporciona una relación matemática entre la absorbancia y el coeficiente de extinción de un soluto.

En algunas realizaciones, los sectores de referencia y de muestra pueden ensayarse usando detección de interferencias (por ejemplo, detección de interferencias de Rayleigh). En el método de detección de interferencia de Rayleigh, el sistema óptico de interferencia contiene dos ranuras paralelas. Se divide un único haz de luz coherente de modo que pase a través de ambas ventanas, y después los dos haces vuelven a fusionar. Cuando estas dos ondas de luz se fusionan, forman un patrón de interferencia de franjas de luz y oscuridad alternantes. Si la muestra y las muestras de referencia tuvieran un índice refractario idéntico, las franjas de interferencia resultantes serían perfectamente rectas. El aumento de la concentración de soluto aumenta el índice refractario de la solución, retardando de este modo el haz de luz de la muestra y provocando un desplazamiento de la franja vertical. Midiendo este desplazamiento de franja, se puede medir la concentración de soluto en la muestra. A diferencia de la detección de absorbancia, que mide los valores absolutos para la muestra y la referencia, la detección de interferencia mide una diferencia relativa entre la muestra y la referencia. Sin embargo, la detección de interferencia produce picos integrados y son directamente proporcionales a la concentración, y pueden usarse para tipos de muestras que no absorben significativamente. Para una referencia sobre el uso de óptica de interferencia de Rayleigh con AUC, véase Furst (1997) *Eur. Biophys. J.* 35:307-10.

Puede usarse medición de la velocidad a la que el límite de sedimentación se mueve para derivar muchas propiedades físicas de partículas de soluto. La velocidad de movimiento del límite determina el coeficiente de sedimentación, que se basa en la masa y la forma (coeficiente de fricción) de la partícula. El coeficiente de sedimentación de una partícula, s , se refiere a la relación de su velocidad con respecto a la aceleración aplicada a ella por un campo centrífugo. Los coeficientes de sedimentación se expresan en unidades de Svedberg, S (una unidad de Svedberg es equivalente a 10^{-13} segundos). El coeficiente de sedimentación de una partícula o solución de partículas depende de sus propiedades, por ejemplo el peso molecular (corregido con respecto a flotabilidad) y las propiedades del disolvente.

El cambio en el límite de concentración de un soluto a lo largo del tiempo durante ultracentrifugación puede determinarse usando la ecuación de Lamm (Schuck (2000) *Biophys. J.*, 78:1606-19). Brevemente, la ecuación de Lamm calcula el cambio en el límite de concentración de un soluto a lo largo del tiempo en respuesta a las fuerzas en competición de sedimentación (que concentra el soluto) y difusión (que dispersa el soluto), teniendo en cuenta la celda en forma de sector y el campo

centrífugo generado por el rotor. La ecuación de Lamm puede expresarse como:

$$\text{Ecuación 1: } \partial c / \partial t = D [(\partial^2 c / \partial r^2) + 1/r(\partial c / \partial r)] - s\omega^2 [r(\partial c / \partial r) + 2c]$$

en la que c es la concentración de soluto, D representa la constante de difusión de soluto, s representa el coeficiente de sedimentación, ω representa la velocidad angular del rotor, r es el radio y t es el tiempo.

Ajustando los datos de AUC sin procesar a soluciones de la ecuación de Lamm, es posible determinar características de soluto tales como el coeficiente de sedimentación y el cambio en la distribución de concentración. Por ejemplo, los valores determinados experimentalmente para la velocidad de cambio de un límite de sedimentación pueden modelarse usando la ecuación de Lamm para derivar el coeficiente de sedimentación, la masa molecular o la concentración del soluto que forma el límite. Pueden usarse varios programas conocidos en la técnica, tales como SEDFIT (Schuck (2000) Biophys. J., 78:1606-19), para modelar la ecuación de Lamm para datos de AUC. Estos programas también pueden aplicar la ecuación de Lamm a soluciones que contengan múltiples solutos o múltiples límites de sedimentación.

Un ejemplo de un programa adecuado para la determinación de características del soluto es el algoritmo SEDFIT. En algunas realizaciones, el algoritmo SEDFIT puede usarse para calcular un valor de distribución de coeficiente diferencial, o C(S), usando datos de AUC de una solución que contiene una mezcla de especies de partículas (para referencia, véase Schuck (2000) Biophys. J., 78:1606-19). En el algoritmo SEDFIT, se crea una cuadrícula de coeficientes de sedimentación a través de un intervalo esperado. Se estimulan límites de sedimentación usando soluciones a la ecuación de Lamm para cada coeficiente de sedimentación, suponiendo forma de partícula y relación de fricción de disolvente constantes. Después se ajustan los datos de AUC reales a estas soluciones de Lamm para derivar el valor de distribución de coeficiente diferencial o C(S). Muchos otros programas útiles para analizar datos de AUC pueden encontrarse en Cole y Hansen (1999) J. Biomol. Tech. 10:163-76.

En algunas realizaciones, se generan partículas virales en células hospedadoras adecuadas y se purifican. En algunas realizaciones, las partículas virales se purifican por cromatografía de afinidad. Se conocen en la técnica métodos para purificar partículas AAV. Por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo de una proteína de la cápside viral o ligando de unión de una proteína de la cápside viral inmovilizado en un medio de cromatografía.

En algunas realizaciones, se realiza análisis de ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (SV-AUC) usando una ultracentrífuga analítica que es

capaz de caracterizar una muestra en su estado nativo en condiciones de solución biológicamente relevantes (por ejemplo, ProteomeLab™ XL-I (Beckman Coulter)). Cuando se usa el ProteomeLab™ XL-1, la muestra se carga en el sector de muestra de una celda de velocidad de dos sectores, se carga un control de vehículo (por ejemplo, PBS sin viral recombinante) en el sector de referencia correspondiente. La muestra se coloca en el rotor de cuatro orificios y se permite que se equilibre en el instrumento hasta que se mantiene una temperatura de aproximadamente 20 °C y un vacío completo durante aproximadamente una hora. En una realización ejemplar, se realiza centrifugación de velocidad de sedimentación a aproximadamente 20.000 RPM, aproximadamente 20 °C, y aproximadamente 0,003 cm de ajuste de etapa radial, sin retardo y sin repeticiones. Como se indica posteriormente, pueden usarse diferentes parámetros para la centrifugación. En algunas realizaciones, se usa absorbancia (260 nm) y/u óptica de interferencia (por ejemplo, óptica de interferencia de Rayleigh) para registrar simultáneamente la concentración radial en función del tiempo hasta que el componente de sedimentación más pequeño se aparta de la ventana óptica. En algunas realizaciones, la concentración radial se registra hasta que la especie en sedimentación con la menor densidad sale del sector. En algunas realizaciones, la sedimentación se supervisa hasta que las partículas virales recombinantes con la menor densidad se sedimentan al fondo de un sector de una ultracentrífuga. Un sector puede ser una parte de una ultracentrífuga; por ejemplo, una celda de velocidad ultracentrífuga. En algunas realizaciones, un sector puede ser una parte de una ultracentrífuga en la que se detectan muestras. En algunas realizaciones, la ultracentrifugación utiliza una ultracentrífuga que comprende una celda de velocidad ultracentrífuga. En algunas realizaciones, se supervisa hasta que las partículas virales recombinantes sedimentan al fondo de una celda de velocidad ultracentrífuga. En algunas realizaciones, la sedimentación se supervisa hasta que las partículas virales recombinantes con la menor densidad sedimentan y salen de la ventana óptica. En algunas realizaciones, la concentración radial se registra durante al menos aproximadamente cualquiera de 0,5 horas, 0,75 horas, 1,0 horas, 1,5 horas, 2,0 horas, 3,0 horas, 4,0 horas o 5,0 horas. En algunas realizaciones, la concentración radial se registra durante aproximadamente 1,2 horas. La optimización de las condiciones de procesamiento puede incluir, por ejemplo, continuar el procesamiento hasta que toda la especie en sedimentación se sedimenta completamente en el fondo del sector, con la temperatura mantenida constante a 20 °C y una velocidad entre 18.000 rpm y 20.000 rpm. Como se observa posteriormente, pueden usarse otras temperaturas y

velocidades.

El porcentaje de cápside completa se determina analizando una multitud de exploraciones (por ejemplo, 75) de cada método de detección usando el modelo de distribución de C(S) de tamaño continuo SEDFIT. Se aplica regularización de segunda

5 (2ª) derivada al ajuste. En algunas realizaciones, el nivel de confianza del estadístico F es aproximadamente 0,68. En algunas realizaciones, el nivel de confianza del estadístico F es más de aproximadamente cualquiera de 0,68, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 o 0,99 o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, se mantienen constantes los siguientes parámetros C(S): resolución de

10 aproximadamente 200S a aproximadamente 5000S, S mín es de aproximadamente 1S a aproximadamente 100S, S máx es de aproximadamente 100S a aproximadamente 5000S, y la relación de fricción es aproximadamente 1,0 o se deja flotar hasta un valor determinado por un software de centrifugación. En algunas realizaciones, la resolución es aproximadamente cualquiera de 200S, 300S, 400S,

15 500S, 600S, 700S, 800S, 900S, o 1000S o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, la resolución es aproximadamente 200S. En algunas realizaciones, la Smáx es aproximadamente cualquiera de 100S, 200S, 300S, 400S, 500S, 600S, 700S, 800S, 900S, o 1000S o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, Smáx es aproximadamente 200S. En algunas realizaciones, la relación de fricción se

20 deja flotar hasta un valor determinado por software de centrifugación. En algunas realizaciones, la relación de fricción es de aproximadamente 1,0. En algunas realizaciones, se aplican restas de ruido invariante radial (IR) e invariante temporal (IT). En algunas realizaciones, se permite que la posición del menisco flote, dejando que el software elija la posición óptima. En algunas realizaciones, se permite que la

25 relación de fricción flote, permitiendo que el software elija la posición óptima. El modelo ajusta los datos a la ecuación de Lamm, y la distribución de tamaños resultante es una "distribución de coeficientes de sedimentación" que parece un cromatograma con el área bajo cada pico proporcional a la concentración en unidades de Franjas o unidades de DO₂₆₀. El coeficiente de sedimentación (en unidades de

30 Svedberg) y la concentración relativa (en unidades de DO) se determinan para cada componente en la distribución. En algunas realizaciones, los múltiples procesamiento de AUC son ensayos independientes, y en cada análisis se supervisan los siguientes atributos para asegurar la calidad de los resultados: bondad de ajuste (rmsd), la relación de DO_{260 nm}/ señal de interferencia en franjas (relación A260/IF) para cada

35 pico, la uniformidad de coeficientes de sedimentación para cada especie entre

procesamientos, y la calidad general de las exploraciones.

En algunas realizaciones de la invención, se usan coeficientes de extinción para calcular la concentración molar y el valor de porcentaje real en el pico de vector intacto de datos de absorbancia. Pueden calcularse coeficientes de extinción de absorbancia molar para ambas cápsides vacías ($\epsilon_{260/\text{cápside}}=3,72\text{e}6$) y vector intacto ($\epsilon_{260/\text{vector}}=3,00\text{e}7$) basándose en fórmulas publicadas (Sommer *et al.* (2003) *Mol Ther.*, 7:122-8). Los coeficientes de extinción están disponibles para picos de cápside vacía y vector intacto. Los valores de C(S) pueden determinarse usando el algoritmo SEDFIT descrito en Schuck (2000) *Biophys. J.*, 78:1606-19. La concentración molar tanto de vector intacto como de cápside vacía puede calcularse usando la ley de Beer y el porcentaje de cápside completa se calcula a partir de estos valores. En algunas realizaciones, los valores se presentan con respecto al porcentaje de cápside completa.

En algunas realizaciones, no es posible determinar empíricamente el coeficiente de extinción de especies particulares de partículas virales recombinantes (por ejemplo, partículas virales con genomas fragmentados de tamaño y secuencia desconocidos). Puede establecerse una relación entre el valor S y el tamaño del genoma analizando preparaciones de vectores virales recombinantes con genomas virales encapsidados de tamaño de nucleótidos conocido y se determina un valor S correspondiente como se describe en el presente documento. Los valores S calculados pueden representarse para generar una curva patrón con la que pueden compararse especies virales recombinantes de tamaño de genoma o peso molecular desconocidos para determinar el peso molecular de la especie desconocida.

En algunos aspectos, una preparación de partículas virales recombinantes (por ejemplo, partículas rAAV) se caracteriza por a) someter la preparación a ultracentrifugación analítica en condiciones de velocidad de sedimentación límite en las que la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa en intervalos temporales (por ejemplo, una o más veces), b) representar el valor de distribución de coeficiente de sedimentación diferencial (C(s)) frente al coeficiente de sedimentación en unidades de Svedberg (S), c) integrar el área bajo cada pico en la distribución de C(s) para determinar la concentración relativa de cada pico, en la que cada pico representa una especie de partícula viral recombinante. En algunas realizaciones, la especie de partícula viral recombinante identificada incluye, pero sin limitación: partículas virales recombinantes completas que comprenden genomas virales recombinantes intactos, partículas de cápsides virales recombinantes vacías y

partículas virales recombinantes que comprendían genomas virales recombinantes variantes. En algunas realizaciones los genomas variantes son más pequeños que el genoma viral recombinante intacto (por ejemplo, genomas truncados). En algunas realizaciones, los genomas variantes son mayores que el genoma viral recombinante intacto (por ejemplo, agregados, recombinantes, etc.). En algunas realizaciones, una preparación de partículas virales recombinantes (por ejemplo, partículas rAAV) se caracteriza por a) someter la preparación a ultracentrifugación analítica en condiciones de velocidad de sedimentación límite en las que la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa a intervalos temporales (por ejemplo, una o más veces), b) representar el valor de distribución de coeficientes de sedimentación diferencial $C(s)$ frente al coeficiente de sedimentación en unidades de Svedberg (S), c) identificar especies de partículas virales recombinantes en la preparación por presencia de picos en la representación correspondiente a un valor S, en el que el tamaño del genoma de una especie particular de partículas virales recombinantes se calcula comparando el valor S de la especie con una curva patrón generada por valores S de partículas virales recombinantes que comprenden genomas virales encapsidados de diferente tamaño conocido. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además integrar el área bajo cada pico en la distribución de $C(S)$ para determinar la concentración relativa de cada especie de partículas virales recombinantes. En algunas realizaciones, la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa en un intervalo temporal. En algunas realizaciones, la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa en más de un intervalo temporal.

En algunas realizaciones, la sedimentación de partículas recombinantes virales (por ejemplo, partículas rAAV) se supervisa midiendo la densidad óptica o absorbancia a aproximadamente 260 nm. Se conocen en la técnica medios para medir la absorbancia. En algunas realizaciones, una ultracentrífuga usada para AUC se equipa con medio para medir la absorbancia. En otras realizaciones, la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa por interferencia. En algunas realizaciones, la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa por interferencia de Rayleigh. Se conocen en la técnica medios para medir la interferencia (Furst (1997) *Eur. Biophys. J.* 35:307-10). En algunas realizaciones, una ultracentrífuga usada para AUC se equipa con medios para medir la interferencia. En algunas realizaciones, la sedimentación de partículas virales recombinantes se supervisa tanto por absorbancia como por interferencia. En algunas realizaciones, la absorbancia y/o la interferencia se miden usando un patrón de referencia. En algunas

realizaciones, el patrón de referencia coincide con la solución de la preparación viral recombinante con la excepción de que el viral recombinante no está presente. Por ejemplo, la preparación viral recombinante puede comprender viral recombinante en un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato. En este ejemplo, el patrón de referencia puede ser solución salina tamponada con fosfato sin partículas virales recombinantes.

En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales durante la ultracentrifugación se determina supervisando la sedimentación de partículas virales continuamente durante la ultracentrifugación. Está dentro de la competencia del experto en la materia optimizar los parámetros de AUC para diferentes tipos de partículas virales. En algunas realizaciones, se realiza adquisición de datos para partículas rAAV con una velocidad de AUC de entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 20.000 rpm. En algunas realizaciones, se realiza análisis de datos de para partículas rAAV con una $S_{\min}$ de aproximadamente 1S y una $S_{\max}$ de aproximadamente 1000S. En algunas realizaciones, se realiza análisis de datos para partículas rAAV con una resolución de aproximadamente 200S a aproximadamente 1.000S. En algunas realizaciones, la resolución es aproximadamente cualquiera de 200S, 300S, 400S, 500S, 600S, 700S, 800S, 900S o 1000S o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, la resolución es de aproximadamente 200S. En algunas realizaciones, se realiza análisis de datos para partículas rAAV con un $S_{\max}$ de aproximadamente cualquiera de 100S, 200S, 300S, 400S, 500S, 600S, 700S, 800S, 900S o 1000S o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, $S_{\max}$ es de aproximadamente 200S a aproximadamente 5000S. En algunas realizaciones, $S_{\max}$ es aproximadamente 200S. En algunas realizaciones, se aplican restas de ruido invariante radial (IR) e invariante temporal (IT). En algunas realizaciones, se permite que la posición del menisco flote dejando que el software elija la posición óptima. En algunas realizaciones, se permite que la relación de fricción flote, dejando que el software elija la posición óptima. En algunas realizaciones, el análisis de datos para partículas rAAV se mantiene constante en 1. En algunas realizaciones, se permite que el análisis de datos para partículas rAAV flote usando el comando FIT con un valor optimizado usando regresión no lineal.

Con respecto a partículas virales recombinantes (por ejemplo, partículas rAAV), en algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de viral recombinante durante la ultracentrifugación se determina supervisando (por ejemplo, explorando) la sedimentación de partículas virales recombinantes una vez en más de

aproximadamente cada 15 segundos, 30 segundos, 45 segundos, 1 minuto (60 segundos), 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos. Las exploraciones pueden adquirirse continuamente sin retardo tan rápido como permitan

5 lo sistemas ópticos. Las exploraciones de interferencia son rápidas, y una exploración individual se completa en ~10-15 segundos, mientras que las exploraciones de absorbancia requieren ~60 segundos. Cuando se usa detección doble la velocidad de adquisición de exploración para ambos se determina por el sistema de absorbancia. En algunas realizaciones de la invención, se usan más de aproximadamente 5, 10, 15,

10 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 exploraciones para supervisar la sedimentación de partículas virales recombinantes durante la ultracentrifugación. En algunas realizaciones, se requiere un mínimo de 30 exploraciones para análisis, y las exploraciones se recogen hasta que el proceso de sedimentación está completo. En algunas realizaciones, el proceso de sedimentación

15 puede describirse típicamente por entre 40 y 75 exploraciones. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales recombinantes se determina basándose en aproximadamente 75 exploraciones. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales recombinantes se determina basándose en aproximadamente 55 exploraciones a aproximadamente 75

20 exploraciones. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales recombinantes se determina basándose en aproximadamente 55 exploraciones a aproximadamente 60 exploraciones. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales recombinantes se determina basándose en aproximadamente 60 exploraciones a aproximadamente 75 exploraciones. En algunas

25 realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales recombinantes se determina basándose en aproximadamente 60 exploraciones a aproximadamente 70 exploraciones. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de partículas virales recombinantes se determina basándose en múltiples ultracentrifugaciones (procesamientos). En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación de

30 partículas virales recombinantes se determina basándose en cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más procesamientos de ultracentrifugación. En algunas realizaciones, las velocidades de sedimentación se usan para determinar los valores de $C(S)$ usando el algoritmo SEDFIT. En algunas realizaciones, se aplica una regularización de segunda derivada a un nivel de ajuste con un nivel de confianza de

35 estadístico F de aproximadamente 0,68. En algunas realizaciones, los siguientes

parámetros C(S) se mantienen constantes: resolución 100S a aproximadamente 200S, S mín. es aproximadamente 1, S máx. es aproximadamente 200S a 300S, y la relación de fricción es de aproximadamente 1,0 a 1,2S. En algunas realizaciones, se aplican restas de ruido invariante radial (IR) e invariante temporal (IT).

5 En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación límite de partículas virales recombinantes (por ejemplo, partículas rAAV) en una preparación de partículas virales recombinantes se determina por ultracentrifugación de la preparación de partículas virales recombinantes en más de aproximadamente cualquiera de 5.000 rpm; 10.000 rpm; 15.000 rpm; 20.000 rpm; 25.000 rpm; 30.000 rpm; 35.000 rpm; 10 40.000 rpm; 45.000 rpm; o 50.000 rpm o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones de la invención, la velocidad de sedimentación límite de partículas virales recombinantes en una preparación de partículas virales recombinantes se determina por ultracentrifugación de la preparación de partículas virales recombinantes a aproximadamente 20.000 rpm. En algunas realizaciones de la invención, la velocidad de sedimentación límite de partículas virales recombinantes en 15 una preparación de partículas virales recombinantes se determina por ultracentrifugación de la preparación de partículas virales recombinantes de aproximadamente 15.000 rpm a aproximadamente 20.000 rpm.

En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación límite de partículas 20 virales recombinantes en una preparación de partículas virales recombinantes (por ejemplo, partículas rAAV) se determina por ultracentrifugación de la preparación de partículas virales recombinantes a aproximadamente o más de 4 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, o 30 °C o cualquier temperatura entre medias. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación límite de partículas virales recombinantes en una 25 preparación de partículas virales recombinantes se determina por ultracentrifugación de la preparación de partículas virales recombinantes a aproximadamente 20 °C. En algunas realizaciones, la velocidad de sedimentación límite de partículas virales recombinantes en una preparación de partículas virales recombinantes se determina por ultracentrifugación de la preparación de partículas virales recombinantes de 30 aproximadamente 15 °C a aproximadamente 20 °C.

Partículas virales con expresión potenciada

En algunos aspectos, la invención proporciona partículas virales que comprenden genomas de vectores de gran tamaño con expresión potenciada. En algunas realizaciones, los genomas de rAAV de gran tamaño presentan expresión 35 potenciada cuando se empaquetan en partículas AAV usando una línea celular

productora en comparación con partículas AAV preparadas por transfección transitoria de células. En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para potenciar la expresión de un genoma de rAAV de gran tamaño, comprendiendo el método producir partículas rAAV en una línea celular productora proporcionando funciones

5 auxiliares de AAV a la línea celular, en el que la línea celular productora comprende a) ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV, y b) un genoma de rAAV, en el que el genoma de rAAV es mayor de aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, la expresión del genoma de rAAV de gran tamaño es aproximadamente 1,25 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,75 veces,

10 aproximadamente 2,0 veces, aproximadamente 2,25 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,25 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 3,75 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,25 veces, aproximadamente 4,5 veces, aproximadamente 4,75 veces, o aproximadamente 5 veces mayor que la

15 expresión del genoma de rAAV de gran tamaño cuando se produce por transfección transitoria. En algunas realizaciones, la expresión potenciada de un genoma de rAAV de gran tamaño es cinética de expresión más rápida en comparación con la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de partículas AAV producidas por transfección transitoria. En algunas realizaciones, la cinética de expresión más rápida

20 es un aumento más rápido de la expresión del genoma de rAAV de gran tamaño a lo largo del tiempo después del suministro de una partícula AAV que comprende un genoma de rAAV de gran tamaño a una célula. En algunas realizaciones, la cinética de expresión más rápida es un tiempo más rápido para alcanzar niveles de expresión máximos o de estado estacionario del genoma de rAAV de gran tamaño después del

25 suministro de una partícula AAV que comprende el genoma de rAAV de gran tamaño a una célula en comparación con niveles de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño después del suministro de una partícula AAV que comprende el genoma de rAAV de gran tamaño de partículas rAAV preparadas por transfección transitoria. En algunas realizaciones, la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño

30 producido por una línea celular productora es aproximadamente cualquiera de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % más rápida que la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de partículas rAAV producidas por transfección transitoria. En algunas realizaciones, el genoma del vector de gran tamaño es mayor

35 de aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb,

5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 7,1 kb, 7,2 kb, 7,3 kb, 7,4 kb, 7,5 kb, 7,6 kb, 7,7 kb, 7,8 kb, 7,9 kb, 8,0 kb, 8,1 kb, 8,2 kb, 8,3 kb, 8,4 kb, 8,5 kb, 8,6 kb, 8,7 kb, 8,8 kb, 8,9 kb, 9,0 kb, 9,2 kb, 9,3 kb o 9,4 kb de longitud o cualquier valor entre medias.

5 *Transgenes heterólogos*

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula AAV recombinante que comprende un genoma de vector de gran tamaño que comprende un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un transgén heterólogo) flanqueado por una o dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. El ácido nucleico se encapsula en la partícula AAV. En algunas realizaciones, un genoma de rAAV de la presente divulgación contiene una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén heterólogo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un genoma de rAAV de la presente divulgación contiene dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. En ciertas realizaciones, un genoma de rAAV de la presente divulgación contiene dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén heterólogo. En algunas realizaciones, el genoma del vector es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma del vector es mayor de aproximadamente 5 kb. En algunas realizaciones, el genoma del vector es de entre aproximadamente 5 kb y aproximadamente 7 kb, entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, o entre aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, el genoma del vector es mayor de aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 7,1 kb, 7,2 kb, 7,3 kb, 7,4 kb, 7,5 kb, 7,6 kb, 7,7 kb, 7,8 kb, 7,9 kb, 8,0 kb, 8,1 kb, 8,2 kb, 8,3 kb, 8,4 kb, 8,5 kb, 8,6 kb, 8,7 kb, 8,8 kb, 8,9 kb, 9,0 kb, 9,2 kb, 9,3 kb o 9,4 kb de longitud o cualquier valor entre medias.

En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico. En algunas realizaciones, el producto transgénico terapéutico es un polipéptido terapéutico. Un polipéptido terapéutico puede proporcionar, por ejemplo, un polipéptido y/o actividad enzimática que está ausente o presente a un nivel reducido en una célula u organismo. Como alternativa, un polipéptido terapéutico puede proporcionar un polipéptido y/o actividad enzimática que contrarrestan indirectamente un desequilibrio en una célula u organismo. Por ejemplo, un polipéptido terapéutico para un trastorno relacionado con la acumulación de un metabolito

causada por una deficiencia en una enzima metabólica o actividad puede proporcionar una enzima o actividad metabólica ausente, o puede proporcionar una enzima o actividad metabólica alternativa que conduce a la reducción del metabolito. Un polipéptido terapéutico también puede usarse para reducir la actividad de un polipéptido (por ejemplo, uno que se sobreexpresa, se activa por una mutación de ganancia de función o cuya actividad está desregulada de otro modo) actuando, por ejemplo, como un polipéptido negativo dominante.

En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica el Factor VIII. En algunas realizaciones, el Factor VIII es una secuencia codificante de Factor VIII humano, incluyendo sin limitación cualquier secuencia codificante expresada por un gen de Factor VIII humano. El gen de Factor VIII humano (por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 2157) también se conoce como *AHF*, *F8*, *F8B*, *F8C*, *HEMA*, *FVIII*, y *DXS1253E*. En algunas realizaciones, el Factor VIII tiene la secuencia de aminoácidos del Factor VIII humano (por ejemplo, como se representa por el N.º de referencia de GenBank AAA52484). Puede usarse un transgén heterólogo que codifica el Factor VIII, por ejemplo, para expresar el Factor VIII en un individuo que padece hemofilia A, un trastorno de coagulación ligado a X, recesivo, asociado con una deficiencia en el Factor VIII. Se sabe que el Factor VIII participa en la coagulación sanguínea como parte de la ruta de coagulación sanguínea intrínseca y se expresa normalmente por las células sinusoides del hígado y células endoteliales por todo el cuerpo.

En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica distrofina. En algunas realizaciones, la distrofina es una secuencia codificante de distrofina humana, incluyendo sin limitación cualquier secuencia codificante expresada por un gen de distrofina humana. El gen de distrofina humana (por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 1756) también se conoce como *DMD*, *BMD*, *CMD3B*, *MRX85*, *DXS142*, *DXS164*, *DXS206*, *DXS230*, *DXS239*, *DXS268*, *DXS269*, *DXS270* y *DXS272*. En algunas realizaciones, la distrofina tiene la secuencia de aminoácidos de distrofina humana (por ejemplo, como se representa por el N.º de referencia de GenBank AAA53189). Puede usarse un transgén heterólogo que codifique distrofina, por ejemplo, para expresar distrofina en un individuo que padece distrofia muscular de Becker o Duchenne, distrofias musculares ligadas a X, recesivas, asociadas con mutaciones en distrofina. La distrofia muscular de Becker es un trastorno menos grave provocado por mutaciones de pérdida de función en distrofina, mientras que la distrofia muscular de Duchenne se asocia con pérdida más grave de función o mutaciones nulas (por ejemplo, mutaciones sin sentido o desplazamiento de fase) en distrofina. Se sabe que

la distrofina actúa en el complejo de distrofina-glucoproteína (DGC), que se requiere para conectar la F-actina de células musculares con la matriz extracelular, estabilizando de este modo el sarcolema durante la contracción y la relajación muscular.

5 En algunas realizaciones, el transgén heterólogo codifica regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), también conocido como subfamilia de casete de unión a ATP C, miembro 7. En algunas realizaciones, el CFTR es una secuencia codificante de CFTR humana, incluyendo sin limitación cualquier secuencia codificante expresada por un gen de CFTR humano. El gen de CFTR
10 humano (por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 1080) también se conoce como *CF*, *MRP7*, *ABC35*, *ABCC7*, *CFTR/MRP*, *TNR-CFTR* y *dj760C5.1*. En algunas realizaciones, CFTR tiene la secuencia de aminoácidos de CFTR humano (por ejemplo, como se representa por el N.º de referencia de GenBank NP_000483). Puede usarse un transgén heterólogo que codifica CFTR, por ejemplo, para expresar
15 CFTR en un individuo que padece fibrosis quística, un trastorno recesivo, autosómico, asociado con mutaciones en CFTR que afecta a los pulmones, el páncreas, el intestino y muchos otros órganos. Se sabe que CFTR actúa como un canal de iones abierto por ATP implicado en el transporte de iones Cl⁻. La ausencia de suficiente función de CFTR conduce a múltiples patologías; un ejemplo es que el transporte de
20 iones a través de las células epiteliales se altera, lo que conduce a absorción de agua celular aumentada y el espesamiento y la acumulación patológicos de moco en los pulmones y otros tejidos.

En algunas realizaciones, el producto transgénico terapéutico es un ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, un ácido nucleico terapéutico puede
25 incluir sin limitación un ARNip, un ARNhp, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una DNazima. Como tal, un ácido nucleico terapéutico puede codificar un ARN que cuando se transcribe de los ácidos nucleicos del vector puede tratar un trastorno interfiriendo con la traducción o transcripción de una proteína anómala o en exceso asociada con el trastorno. Por ejemplo, el transgén heterólogo puede codificar
30 un ARN que trata un trastorno mediante eliminación o reducción altamente específica de ARNm, que codifica las proteínas anómalas y/o en exceso. Las secuencias de ARN terapéuticas incluyen ARNi, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y/o ribozimas (tales como ribozimas de cabeza de martillo y en horquilla) que pueden tratar trastornos mediante la eliminación o reducción alternante específica de ARNm
35 que codifica las proteínas anómalas y/o en exceso.

En algunas realizaciones, el transgén heterólogo es un transgén humano. En algunas realizaciones, el transgén heterólogo se une con un promotor. En algunas realizaciones, el transgén (por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo descrito en el presente documento) se une operativamente con un promotor. Los promotores
 5 ejemplares incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el promotor de GUSB, el LTR de VSR, el LTR de MoMLV, el promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK), un promotor de virus de simio 40 (SV40) y un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAAT, un
 10 promotor de LSP, promotores específicos de hígado quiméricos (LSP), el promotor de E2F, el promotor de la telomerasa (hTERT), el potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β -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
 15 realizaciones, el promotor comprende un promotor de β -glucuronidasa humana o un potenciador de citomegalovirus ligado a un promotor de β -actina de pollo (CBA). El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de transtiretina de ratón.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor
 20 de LTR de virus de sarcoma de Rous (VSR) (opcionalmente con el potenciador de VSR), el promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) [véase, por ejemplo, Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521-530 (1985)], el promotor de SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de 13-actina, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK), y el promotor de EF1a (Invitrogen).

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden regularse por compuestos proporcionados de forma exógena, factores ambientales tales como temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o en células en replicación solamente. Están disponibles promotores inducibles
 30 y sistemas inducibles de una diversidad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia. Los ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores proporcionados de forma exógena incluyen el promotor de metalotioneína de oveja inducible por zinc (MT), el promotor
 35 de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el

sistema promotor de polimerasa T7 (documento WO 98/10088); el promotor de insectos de ecdisona (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), el sistema reprimible por tetraciclina (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), véase 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 más de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son los que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación de la célula particular, o en células en replicación solamente.

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

En algunas realizaciones, las secuencias reguladoras transmiten capacidades de expresión génica específicas de tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas de tejido se unen con factores de transcripción específicos de tejido que inducen transcripción de una manera específica de tejido. Por ejemplo, puede desearse expresión específica de tejido en el hígado, los pulmones, el musculo, el intestino, el páncreas y/u otros tejidos. Se conocen bien en la técnica secuencias reguladoras específicas de tejido apropiadas (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el promotor es un promotor de transtiretina de ratón (mTTR), que se sabe que conduce la expresión génica en el hígado.

En algunas realizaciones, el genoma de rAAV incluye un intrón. En algunas realizaciones, el intrón es un intrón híbrido.

En algunas realizaciones, el genoma de rAAV incluye una señal de poliadenilación. Muchas señales de poliadenilación se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, la poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética. En otras realizaciones, la poliadenilación es una señal de poliadenilación de hormona del

crecimiento bovina (BGH). Para una descripción más detallada de la señal de poliadenilación de BGH, véase, por ejemplo, Goodwin, E.C. y Rottman, F.M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:16330-16334.

En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas AAV que comprenden un genoma de AAV de gran tamaño, en el que el genoma de AAV comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR202, un intrón híbrido, un transgén de Factor VIII con el dominio B suprimido, una señal de poliadenilación sintética y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el genoma de AAV de gran tamaño comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR202opt, un intrón híbrido, un transgén de Factor VIII con el dominio B suprimido, una señal de poliadenilación sintética y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el genoma de AAV de gran tamaño comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR482, un intrón híbrido, un transgén de Factor VIII con el dominio B suprimido, una señal de poliadenilación sintética y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el genoma de AAV de gran tamaño comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de mTTR482, un intrón híbrido, un transgén de Factor VIII con el dominio B suprimido, una señal de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina y una ITR de AAV2.

Los elementos del genoma de rAAV descritos anteriormente (por ejemplo, un promotor, un intrón y una señal de poliadenilación) pueden estar presentes solos o en cualquier combinación con un transgén heterólogo de la presente divulgación. El genoma de rAAV puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión de un transgén heterólogo, por ejemplo, un promotor, un ácido nucleico heterólogo, una ITR, un elemento de unión a ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, intrón, una señal de poliadenilación (poliA), y/u origen de replicación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el genoma de rAAV contiene un transgén heterólogo y uno o más elementos seleccionados de un promotor de la presente divulgación, un intrón de la presente divulgación y una señal de poliadenilación de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV puede incluir al menos una secuencia de ITR que flanquea un transgén heterólogo y uno o más elementos seleccionados de un promotor de la presente divulgación, un intrón de la presente divulgación, y una señal de poliadenilación de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, el vector de rAAV de gran tamaño es un vector de rAAV autocomplementario, por ejemplo, uno que comprende un genoma autocomplementario recombinante (la expresión "autocomplementario" puede usarse indistintamente en el presente documento). Se describen partículas virales de AAV

con genomas autocomplementarios y métodos de uso de genomas de AAV autocomplementarios en las patentes de Estados Unidos N.º 6.596.535; 7.125.717; 7.465.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Un rAAV que comprende un genoma autocomplementario formará rápidamente una molécula de ADN bicatenaria en virtud de sus secuencias parcialmente complementarias (por ejemplo, cadenas codificantes y no codificantes complementarias de un transgén). En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, en el que la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracatenarios con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte de o toda su longitud.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico heteróloga y una segunda secuencia de ácido nucleico heteróloga se unen por una ITR mutada (por ejemplo la ITR derecha). En algunas realizaciones, la ITR comprende la secuencia

polinucleotídica 5'-

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
CCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCG – 3' (SEQ ID NO: 24). La ITR mutada comprende una supresión de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma viral de AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma viral en la ITR mutada y como tal, un genoma viral recombinante que comprende lo siguiente en orden 5' a 3' se empaquetará en una cápside viral: una ITR de AAV, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga que incluye secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV. En algunas realizaciones, el genoma del vector de scAAV es mayor de aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb o 7,0 kb o cualquier valor entre medias.

IV. Métodos para producir partículas virales

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para producir una partícula de virus adenoasociado (AAV) que contiene un genoma de AAV recombinante de gran tamaño. En algunas realizaciones, los métodos incluyen cultivar una línea celular productora de AAV en condiciones para generar partículas rAAV, en

las que la línea celular productora de AAV comprende i) ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV, y ii) un genoma de rAAV, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb; b) que proporciona funciones auxiliares de AAV; y

5 c) recoger las partículas rAAV que contienen genomas de rAAV de gran tamaño. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico mantenido en forma estable que codifica genes rep y cap de AAV. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprendía un genoma de rAAV mantenido de forma estable, en el que el genoma de rAAV es de entre

10 aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico mantenido de forma estable que codifica genes rep y cap de AAV, y un genoma de rAAV mantenido de forma estable, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente

15 aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV integrados de forma estable en el genoma de la línea celular. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprendía un genoma de rAAV integrado de forma estable en el genoma de la línea celular, en el que el genoma de rAAV es de entre

20 aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y un genoma de rAAV integrado de forma estable en el genoma de la línea celular, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente

25 aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones de las realizaciones anteriores, el genoma de rAAV es mayor de aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 7,1 kb, 7,2 kb, 7,3 kb, 7,4 kb, 7,5 kb, 7,6 kb, 7,7 kb, 7,8 kb, 7,9 kb, 8,0 kb, 8,1 kb, 8,2 kb, 8,3 kb,

30 8,4 kb, 8,5 kb, 8,6 kb, 8,7 kb, 8,8 kb, 8,9 kb, 9,0 kb, 9,2 kb, 9,3 kb o 9,4 kb de longitud o cualquier valor entre medias. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 5'. En algunas realizaciones, el genoma de AAV empaquetado no contenía un truncamiento del extremo 3'.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a líneas celulares para

35 producir una partícula de virus adenoasociado (AAV) que comprende un genoma de

AAV recombinante de gran tamaño, incluyendo la línea celular a) ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV, y b) un genoma de rAAV, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico mantenido de forma estable que codifica genes rep y cap de AAV. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprendía un genoma de rAAV mantenido de forma estable, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico mantenido de forma estable que codifica genes rep y cap de AAV y un genoma de rAAV mantenido de forma estable, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV integrados de forma estable en el genoma de la línea celular. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprendía un genoma de rAAV integrado de forma estable en el genoma de la línea celular, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb. En algunas realizaciones, la línea celular productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y un genoma de rAAV integrado de forma estable en el genoma de la línea celular, en el que el genoma de rAAV es de entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es mayor de aproximadamente cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, 7,0 kb, 7,1 kb, 7,2 kb, 7,3 kb, 7,4 kb, 7,5 kb, 7,6 kb, 7,7 kb, 7,8 kb, 7,9 kb, 8,0 kb, 8,1 kb, 8,2 kb, 8,3 kb, 8,4 kb, 8,5 kb, 8,6 kb, 8,7 kb, 8,8 kb, 8,9 kb, 9,0 kb, 9,2 kb, 9,3 kb o 9,4 kb de longitud o cualquier valor entre medias.

Se conocen en la técnica numerosos métodos para la producción de vectores de rAAV, incluyendo transfección, producción de líneas celulares estables y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV,

híbridos de herpesvirus-AAV (Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) e híbridos de baculovirus-AAV. Los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus rAAV requieren todos: 1) células hospedadoras adecuadas, 2) función de virus auxiliar adecuada, 3) genes rep y cap de AAV y productos génicos; 4) un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico terapéutico) flanqueado por al menos una secuencia de ITR de AAV (por ejemplo, un genoma de vector de rAAV de gran tamaño); y 5) medio y componentes de medio adecuados para apoyar la producción de rAAV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora adecuada es una célula hospedadora de primate. En algunas realizaciones, la célula hospedadora adecuada es una línea celular derivada de ser humano tal como células HeLa, A549, 293 o Perc.6. En algunas realizaciones, la función de virus auxiliar adecuada se proporciona por adenovirus de tipo silvestre o mutante (tal como adenovirus sensible a temperatura), virus del herpes (VHS), baculovirus, o una construcción plasmídica que proporciona funciones auxiliares. En algunas realizaciones, los productos génicos de rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV. En general, pero no obligatoriamente, el producto génico de rep de AAV es del mismo serotipo que las ITR del genoma de vector de rAAV siempre que los productos génicos de rep puedan actuar para replicar y empaquetar el genoma de rAAV. Pueden usarse medios adecuados conocidos en la técnica para la producción de vectores de rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH incluyendo medio de Eagle modificado (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), formulaciones adaptadas tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 6.566.118, y medio Sf-900 II SFM como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.723.551, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, particularmente con respecto a formulaciones de medios adaptados para su uso en la producción de vectores de AAV recombinantes. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan por adenovirus o VHS. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan por baculovirus y la célula hospedadora es una célula de insecto (por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)).

Un método para producir partículas rAAV es el método de triple transfección. Brevemente, puede transfectarse un plásmido que contiene un gen rep y un gen de la cápside, junto con un plásmido adenoviral auxiliar (por ejemplo, usando el método de fosfato de calcio) en una línea celular (por ejemplo, células HEK-293), y puede recogerse virus y purificarse opcionalmente. Como tal, en algunas realizaciones, la

partícula rAAV se produjo por triple transfección de un ácido nucleico que codificaba el vector de rAAV, un ácido nucleico que codificaba rep y cap de AAV, y un ácido nucleico que codificaba funciones de virus auxiliar de AAV en una célula hospedadora, en el que la transfección de los ácidos nucleicos a las células hospedadoras genera una célula hospedadora capaz de producir partículas rAAV.

En algunas realizaciones, pueden producirse partículas rAAV por un método de línea celular productora, tal como el método de línea celular productora ejemplar proporcionado posteriormente (véase también Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269; publicación de PG de Estados Unidos n.º US2004/0224411; y Liu, X.L. *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6:293-299). Brevemente, una línea celular (por ejemplo, una línea celular HeLa, 293, A549 o Perc.6) puede transfectarse de forma estable con un plásmido que contiene un gen rep, un gen de la cápside, y un genoma de vector de gran tamaño que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga de promotor. Las líneas celulares pueden explorarse para seleccionar un clon candidato para producción de rAAV, que puede después expandirse a un biorreactor de producción e infectarse con un virus auxiliar (por ejemplo, un adenovirus o VHS) para iniciar la producción de rAAV. El virus puede recogerse posteriormente, el adenovirus puede inactivarse (por ejemplo, por calor) y/o retirarse, y las partículas rAAV pueden purificarse. Como tal, en algunas realizaciones, la partícula rAAV se produjo por una línea celular productora que comprendía uno o más de ácido nucleico que codificaba el vector de rAAV, un ácido nucleico que codificaba rep y cap de AAV, y un ácido nucleico que codificaba funciones de virus auxiliares de AAV. Como se describe en el presente documento, el método de línea celular productora puede ser ventajoso para la producción de partículas rAAV con un genoma de gran tamaño, en comparación con el método de triple transfección.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se mantiene de forma estable en la línea celular productora. En algunas realizaciones, se introduce ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV en uno o más plásmidos en una línea celular para generar una línea celular productora. En algunas realizaciones, el rep de AAV, cap de AAV, y genoma de rAAV se introducen en una célula en el mismo plásmido. En otras realizaciones, el rep de AAV, cap de AAV y genoma de rAAV se introducen en una célula en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, una línea celular transfectada de forma estable con un plásmido mantiene el plásmido durante múltiples pases de la línea celular (por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o más de 50 pases de la

célula). Por ejemplo, el plásmido o los plásmidos pueden replicar a medida que se replica la célula, o el plásmido o los plásmidos pueden integrarse en el genoma de la célula. Se ha identificado una diversidad de secuencias que permiten que el plásmido se replique de forma autónoma en una célula (por ejemplo, una célula humana) (véase por ejemplo, Krysan, P.J. *et al.* (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:1026-1033). En algunas realizaciones, el plásmido o los plásmidos pueden contener un marcador seleccionable (por ejemplo, un marcador de resistencia a antibiótico) que permite la selección de células que mantienen el plásmido. Los marcadores seleccionables habitualmente usados en células de mamífero incluyen sin limitación blasticidina, G418, higromicina B, zeocina, puromicina, y derivados de los mismos. Se conocen en la técnica métodos para introducir ácidos nucleicos en una célula e incluyen sin limitación transducción viral, transfección catiónica (por ejemplo, usando un polímero catiónico tal como DEAE-dextrano o un lípido catiónico tal como lipofectamine), transfección con fosfato cálcico, microinyección, bombardeo de partículas, electroporación y transfección de nanopartículas (para más detalles, véase, por ejemplo, Kim, T.K. y Eberwine, J.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397:3173-3178).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora. En algunas realizaciones, se introduce ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV en uno o más plásmidos en una línea celular para generar una línea celular productora. En algunas realizaciones, el rep de AAV, cap de AAV, y genoma de rAAV se introducen en una célula en el mismo plásmido. En otras realizaciones, el rep de AAV, cap de AAV y genoma de rAAV se introducen en una célula en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, el plásmido o los plásmidos pueden contener un marcador seleccionable (por ejemplo, un marcador de resistencia a antibiótico) que permite la selección de células que mantienen el plásmido. Se conocen en la técnica métodos para la integración estable de ácidos nucleicos en una diversidad de líneas celulares hospedadoras (véase ejemplos posteriores para una descripción más detallada de una línea celular productora ejemplar creada por integración estable de ácidos nucleicos). Por ejemplo, puede usarse selección repetida (por ejemplo mediante el uso de un marcador seleccionable) para seleccionar células que tengan integrado un ácido nucleico que contenga un marcador seleccionable (y genes cap y rep de AAV y/o un genoma de rAAV). En otras realizaciones, pueden integrarse ácidos nucleicos de una manera específica de sitio en una línea celular para generar una línea celular productora. Se

conocen en la técnica varios sistemas de recombinación específicos de sitio, tales como FLP/FRT (véase, por ejemplo, O’Gorman, S. *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355), Cre/loxP (véase, por ejemplo, Sauer, B. y Henderson, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5166-5170), y phi C31-att (véase, por ejemplo, Groth, A.C. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5995-6000).

En algunas realizaciones, la línea celular productora deriva de una línea celular de primate (por ejemplo, una línea celular de primate no humana, tal como una línea celular Vero o FRhL-2). En algunas realizaciones, la línea celular deriva de una línea celular humana. En algunas realizaciones, la línea celular productora deriva de células HeLa, 293, A549, o PERC.6® (Crucell). Por ejemplo, antes de la introducción y/o el mantenimiento/integración estables de ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV de gran tamaño en una línea celular para generar una línea celular productora, la línea celular es una línea celular HeLa, 293, A549 o PERC.6® (Crucell), o un derivado de la misma.

En algunas realizaciones, la línea celular productora se adapta para crecimiento en suspensión. Como se conoce en la técnica, las células dependientes de anclaje no pueden crecer típicamente en suspensión sin un sustrato, tal como perlas microtransportadoras. La adaptación de una línea celular para crecer en suspensión puede incluir, por ejemplo, cultivar la línea celular en un cultivo en centrifugación con una pala de agitación, usando un medio de cultivo que carece de iones de calcio y magnesio para evitar el apelmazamiento (y opcionalmente un agente antiespumante), usando un recipiente de cultivo recubierto con un compuesto siliconado, y seleccionar células en el cultivo (en lugar de en grandes grupos o en los laterales del recipiente) en cada pase. Para descripción adicional, véase, por ejemplo, documento de preguntas frecuentes de ATCC (disponible en www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx) y referencias citadas en el mismo.

En algunos aspectos, se proporciona un método para producir cualquier partícula rAAV como se desvela en el presente documento que comprende (a) cultivar una célula hospedadora en una condición en la que se producen partículas rAAV, en el que la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en el que cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación y/o encapsidación de AAV; (ii) un provector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico heterólogo como se describe en el presente documento flanqueado por al menos una ITR de AAV, y (iii)

una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas rAAV producidas por la célula hospedadora. En algunas realizaciones, dicha al menos una ITR de AAV se selecciona del grupo que consiste en IRT de serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el serotipo de AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10 o AAVrh10. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, dicha proteína de encapsidación se selecciona del grupo que consiste en proteínas de la cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, o cápside de AAV de ratón rAAV2/HBoV1 o mutantes de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína de encapsidación es una proteína de la cápside de AAV5 que incluye proteínas de la cápside de AAV5 que tienen mutaciones de la cápside de tirosina. En algunas realizaciones, la proteína de encapsidación es una proteína de la cápside de AAV5 incluyendo proteínas de la cápside de AAV5 que tienen mutaciones de la cápside de tirosina y la ITR es una ITR de AAV2. En realizaciones adicionales, la partícula rAAV comprende proteínas de la cápside de un solo tipo de AAV de los clados A-F. En algunas realizaciones, el serotipo de AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, o AAVrh10. En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una cápside de serotipo 1 de AAV (AAV1). En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En algunas realizaciones, la partícula rAAV comprende una cápside de AAVrh8R o mutante de la misma. En algunas realizaciones, las partículas rAAV comprenden una cápside de AAV1 y un genoma recombinante que comprende ITR de AAV2, una ITR de AAV2 mutante y ácido nucleico que codifica un transgén/ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En ciertas realizaciones, las ITR de AAV son IRT de AAV2. En algunas realizaciones, la ITR deriva de AAV2, y la cápside deriva de AAV2. En algunas realizaciones, la ITR deriva de AAV2, y la cápside deriva de AAVrh8R.

Los medios de cultivo de producción de rAAV adecuados de la presente

invención pueden complementarse con suero o proteínas recombinantes derivadas de suero a un nivel de 0,5 %-20 % (v/v o p/v). Como alternativa, como se conoce en la técnica, pueden producirse vectores de rAAV en condiciones sin suero que pueden también denominarse medio sin productos derivados de animales. Un experto en la materia puede apreciar que los medios comerciales o adaptados diseñados para apoyar la producción de vectores de rAAV también pueden complementarse con uno o más componentes de cultivo celular conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación glucosa, vitaminas, aminoácidos y/o factores de crecimiento, para aumentar el título de rAAV en cultivos de producción.

10 Pueden cultivarse cultivos de producción de rAAV en diversas condiciones (sobre un intervalo de temperaturas amplio, durante diversos periodos de tiempo y similares) adecuadas para la célula hospedadora particular que se utilice. Como se conoce en la técnica, los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de unión que pueden cultivarse en recipientes dependientes de unión
15 adecuados tales como, por ejemplo, frascos rotatorios, filtros de fibra hueca, microvehículos y biorreactores de lecho empaquetado o lecho fluidificado. Los cultivos de producción de vectores de rAAV también pueden incluir células hospedadoras adaptadas para suspensión tales como células HeLa, 293 y SF-9, que pueden cultivarse de diversas maneras incluyendo, por ejemplo, matraces rotatorios,
20 biorreactores de tanque agitado y sistemas desechables tales como el sistema de bolsa Wave.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a recoger las partículas rAAV que contienen genomas de rAAV de gran tamaño. Pueden recogerse partículas de vector de rAAV de la invención de cultivos de producción de rAAV por lisis de las
25 células hospedadoras del cultivo de producción o mediante recogida del medio gastado del cultivo de producción, siempre que las células se cultiven en condiciones que se conocen en la técnica que provocan liberación de partículas rAAV a los medios de células intactas, como se describe más completamente en la patente de Estados Unidos n.º 6.566.118). También se conocen en la técnica métodos adecuados para
30 lisar células e incluyen por ejemplo múltiples ciclos de congelación/descongelación, sonicación, microfluidificación y tratamiento con productos químicos, tales como detergentes y/o proteasas.

En algunas realizaciones, las partículas AAV recogidas contienen genomas de rAAV mayores de aproximadamente 5,0 kb. En algunas realizaciones, las partículas
35 rAAV recogidas contienen genomas de rAAV mayores de aproximadamente

cualquiera de 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, 6,3 kb, 6,4 kb, 6,5 kb, 6,6 kb, 6,7 kb, 6,8 kb, 6,9 kb, o 7,0 kb, 8,0 kb o 9,0 kb de longitud o cualquier valor entre medias de longitud. En algunas realizaciones, las partículas rAAV recogidas contienen genomas de rAAV

5 entre cualquiera de aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 8,0 kb, aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 7,5 kb, aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 7,0 kb, aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 6,5 kb, aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 6,0 kb,

10 aproximadamente 5,0 kb y aproximadamente 5,5 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,0 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 7,5 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 7,0 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 6,5 kb, aproximadamente 5,2 kb y

15 aproximadamente 6,0 kb, aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 5,5 kb, aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 8,0 kb, aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 7,5 kb, aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 7,0 kb, aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 6,5 kb,

20 aproximadamente 5,5 kb y aproximadamente 6,0 kb, aproximadamente 6,0 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 6,0 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 6,0 kb y aproximadamente 8,0 kb, aproximadamente 6,0 kb y aproximadamente 7,5 kb, aproximadamente 6,0 kb y aproximadamente 7,0 kb, aproximadamente 6,0 kb y aproximadamente 6,5 kb, aproximadamente 6,5 kb y

25 aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 6,5 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 6,5 kb y aproximadamente 7,5 kb, aproximadamente 6,5 kb y aproximadamente 7,0 kb, aproximadamente 7,0 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 7,0 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 7,0 kb y aproximadamente 8,0 kb, aproximadamente 7,0 kb y aproximadamente 7,5 kb,

30 aproximadamente 7,5 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 7,5 kb y aproximadamente 8,5 kb, aproximadamente 7,5 kb y aproximadamente 8,0 kb, aproximadamente 8,0 kb y aproximadamente 9,0 kb, aproximadamente 8,0 kb y aproximadamente 8,5 kb, o aproximadamente 8,5 kb y aproximadamente 9,0 kb. En algunas realizaciones, las partículas rAAV recogidas contienen genomas de rAAV

35 entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, opcionalmente

aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6,7 kb o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb.

En algunas realizaciones, se recogen partículas rAAV de entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de proporcionar funciones auxiliares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se recogen partículas rAAV aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, o aproximadamente 96 horas después de proporcionar funciones auxiliares. En algunas realizaciones, se recogen partículas rAAV aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas, aproximadamente 48 horas y aproximadamente 84 horas, aproximadamente 48 horas y aproximadamente 72 horas, aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, aproximadamente 60 horas y aproximadamente 96 horas, aproximadamente 60 horas y aproximadamente 84 horas, aproximadamente 60 horas y aproximadamente 72 horas, aproximadamente 72 horas y aproximadamente 96 horas, aproximadamente 72 horas y aproximadamente 84 horas, o aproximadamente 84 horas y aproximadamente 96 horas después de proporcionar funciones auxiliares.

En una realización adicional, las partículas rAAV se purifican. El término “purificado” como se usa en el presente documento incluye una preparación de partículas rAAV desprovistas de al menos algunos de los otros componentes que pueden estar presentes también cuando las partículas rAAV aparecen de forma natural o de las que se preparan inicialmente. Por lo tanto, por ejemplo, pueden prepararse partículas rAAV aisladas usando una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla fuente, tal como un lisado de cultivo o sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento puede medirse de diversas maneras, tal como, por ejemplo, mediante la proporción de partículas resistentes a DNasa (DRP) o copias de genoma (gc) presentes en una solución, o mediante infectividad, o puede medirse en relación con una segunda sustancia, potencialmente interferente, presente en la mezcla fuente, tal como contaminantes, incluyendo contaminantes de cultivo de producción o contaminantes en proceso, incluyendo virus auxiliares, componentes de medios y similares.

En algunas realizaciones, el cultivo de producción de rAAV recogido se clarifica para eliminar los residuos de células hospedadoras. En algunas realizaciones, el cultivo de producción recogido se clarifica por filtración mediante una serie de filtros de profundidad incluyendo, por ejemplo, un filtro Millipore Millistak + HC Pod de calidad DOHC, un filtro Millipore Millistak + HC Pod de calidad A1HC, y un filtro de 0,2 µm

Opticap XL10 filtro de membrana hidrófila SHC Millipore Express. También puede conseguirse clarificación mediante una diversidad de otras técnicas convencionales conocidas en este campo, tales como centrifugación o filtración a través de cualquier filtro de acetato de celulosa de 0,2 μm o mayor tamaño de poro conocido en la técnica.

5 En algunas realizaciones, el cultivo de producción de rAAV recogido se trata adicionalmente con Benzonase® para digerir cualquier ADN de alto peso molecular presente en el cultivo de producción. En algunas realizaciones, la digestión con Benzonase® se realiza en condiciones convencionales conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, una concentración final de 1-2,5 unidades/ml de Benzonase®
10 a una temperatura que varía de ambiental a 37 °C durante un periodo de 30 minutos a varias horas.

Pueden aislarse o purificarse partículas rAAV usando una cualquiera o más de las siguientes etapas de purificación: centrifugación en equilibrio; filtración de intercambio aniónico de flujo continuo; filtración de flujo tangencial (TFF) para
15 concentrar las partículas rAAV; captura de rAAV por cromatografía de apatita; inactivación por calor de virus auxiliar; captura de rAAV mediante cromatografía de interacción hidrófoba; intercambio de tampón mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC); nanofiltración; y captura de rAAV mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de
20 afinidad. En algunas realizaciones, la purificación comprende una o más etapas de cromatografía (por ejemplo, una o más de las etapas de cromatografía descritas anteriormente). Estas etapas pueden usarse solas, en diversas combinaciones, o en diferentes órdenes. En algunas realizaciones, el método comprende todas las etapas en el orden que se describe posteriormente. Se encuentran métodos para purificar
25 partículas rAAV, por ejemplo, en Xiao *et al.*, (1998) *Journal of Virology* 72: 2224-2232; Patente de Estados Unidos n.º 6.989.264 y 8.137.948; y documento WO 2010/148143.

En algunas realizaciones, la partícula rAAV está en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la partícula rAAV está en una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se
30 conocen bien en la técnica, los excipientes farmacéuticamente aceptables son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz y pueden proporcionarse como soluciones o suspensiones líquidas, como emulsiones, o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de uso. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o
35 consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen pero sin

limitación agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, sustancias tamponantes de pH y tampones. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico adecuado para suministro a un tejido diana que pueden administrarse sin toxicidad indebida. Los

5 excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos de TWEEN, y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse en los mismos sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos

10 orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Está disponible un análisis exhaustivo de excipientes farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o

15 sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares. También pueden emplearse soluciones salines y soluciones de dextrosa acuosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender además ingredientes adicionales, por ejemplo, conservantes, tampones, agentes de tonicidad,

20 antioxidantes y estabilizantes, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes de aumento de la viscosidad y similares. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden envasarse en dosificaciones unitarias individuales o en formas de dosificaciones múltiples. Las composiciones se formulan en general como solución estéril y sustancialmente isotónica.

25 **V. Métodos de Tratamiento**

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un individuo que lo necesite que comprenden administrar al individuo partículas AAV. Las partículas AAV pueden administrarse a un tejido particular de interés, o pueden administrarse de forma sistémica. En algunas

30 realizaciones, puede administrarse por vía parenteral una cantidad eficaz de las partículas AAV. Las vías de administración parenterales pueden incluir sin limitación intravenosa, intraósea, intra-arterial, intracerebral, intramuscular, intratecal, subcutánea, intracerebroventricular y así sucesivamente. En algunas realizaciones, puede administrarse una cantidad eficaz de partículas AAV mediante una vía de

35 administración. En algunas realizaciones, puede administrarse una cantidad eficaz de

partículas AAV mediante una combinación de más de una vía de administración. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones el individuo es un ser humano.

Se administra una cantidad eficaz de partículas AAV que comprenden un
 5 genoma de AAV de gran tamaño, dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, cuando un bajo porcentaje de transducción puede conseguir el efecto terapéutico deseado, entonces el objetivo de tratamiento es generalmente alcanzar o exceder este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede conseguirse mediante transducción de solamente aproximadamente 1 a 5 % de
 10 las células diana del tipo tisular deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 20 % de las células del tipo tisular deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 50 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 80 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 95 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 99 % de las células del tipo
 15 tisular deseado. Como guía, el número de partículas administrado por inyección está en general entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{14} partículas, entre aproximadamente 1×10^7 and 1×10^{13} partículas, entre aproximadamente 1×10^9 and 1×10^{12} partículas o aproximadamente 1×10^9 partículas, aproximadamente 1×10^{10} partículas, o aproximadamente 1×10^{11} partículas. La composición de rAAV
 20 puede administrarse por una o más administraciones, bien durante el mismo procedimiento o bien separadas por días, semanas, meses o años. Puede usarse una o más de cualquiera de las vías de administración descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, pueden usarse múltiples vectores para tratar al ser humano.

25 Se conocen en la técnica métodos para identificar células transducidas por partículas virales de AAV; por ejemplo, puede usarse inmunohistoquímica o el uso de un marcador tal como proteína verde fluorescente potenciada para detectar la transducción de partículas virales; por ejemplo, partículas virales que comprende una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos.

30 En algunas realizaciones las partículas virales de AAV que comprenden un genoma de AAV de gran tamaño se administran a más de una localización simultáneamente o secuencialmente. En algunas realizaciones, múltiples inyecciones de partículas virales de rAAV no se separan en más de una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas.

35 En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de tratamiento de

una enfermedad o un trastorno en un individuo que comprende administrar una partícula AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño, en los que el genoma de AAV de gran tamaño comprende un transgén adecuado para tratar la enfermedad o el trastorno. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar la hemofilia A con una partícula AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño que codifica un transgén de Factor VIII (por ejemplo, un transgén de factor VIII humano). En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar distrofia muscular con una partícula AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño que codifica un transgén de distrofina (por ejemplo, un transgén de distrofina humana). En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar la disferlinopatía con una partícula AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño que codifica un transgén de disferlina (por ejemplo, un transgén de disferlina humana). En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar fibrosis quística con una partícula AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño que codifica un transgén de CFTR (por ejemplo, un transgén de CFRT humano). La invención no se limita, sin embargo, a enfermedades o trastornos que requieran la expresión de un transgén mayor de lo que cabe en un genoma de vector de AAV de 4,8 kb. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona partículas AAV que comprenden un genoma de AAV que comprende uno o más transgenes heterólogos en los que la combinación de transgén heterólogo y factores regulares (promotores, potenciadores, intrones, etc.) da como resultado un genoma de AAV mayor de aproximadamente 5,0 kb.

VI. Kits

En algunas realizaciones, la invención comprende kits que comprenden las partículas AAV que comprenden genomas de gran tamaño de la invención. En algunas realizaciones, los kits comprenden además un dispositivo para suministro (por ejemplo, administración parenteral) de composiciones de partículas rAAV. En algunas realizaciones, las instrucciones para su uso incluyen instrucciones de acuerdo con uno de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las instrucciones se imprimen en una etiqueta proporcionada con (por ejemplo, fijada a) un recipiente. En algunas realizaciones, las instrucciones para su uso incluyen instrucciones para tratar una enfermedad o un trastorno.

En algunas realizaciones, el kit comprende un único fluido (por ejemplo, un fluido farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad eficaz del vector). En algunas realizaciones, el kit comprende 2 o más fluidos. Un fluido puede incluir un

diluyente, tampón, excipiente o cualquier otro líquido descrito en el presente documento o conocido en la técnica adecuado para suministrar, diluir, estabilizar, tamponar o de otro modo transportar una partícula AAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el sistema comprende uno o más tampones, por ejemplo, una
 5 solución de pH tamponada acuosa. Los ejemplos de tampones pueden incluir sin limitación, fosfato, citrato, Tris, HEPES y otros tampones de ácidos orgánicos.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente. Los recipientes adecuados pueden incluir, por ejemplo, viales, bolsas, jeringas y frascos. El recipiente puede estar hecho de uno o más de un material tal como vidrio, metal o plástico. En
 10 algunas realizaciones, el recipiente se usa para contener una composición de rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el recipiente puede contener también un fluido y/u otro agente terapéutico.

EJEMPLOS

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes
 15 ejemplos. No deberían, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son para fines ilustrativos solamente y que a la luz de los mismos se les sugerirán a expertos en la materia diversas modificaciones o cambios y deben incluirse dentro del espíritu y ámbito de la presente solicitud y el alcance de las
 20 reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Generación de líneas células productoras con vectores de FVIII de gran tamaño de 5,1 kb y 5,4 kb

Como se ha analizado anteriormente existe la necesidad de una plataforma capaz de producir vectores de rAAV que tengan genomas de gran tamaño con altos
 25 rendimientos, producto uniforme y genomas de alta calidad. Este ejemplo describe la generación de una plataforma de línea celular productora (PCL) que es particularmente ventajosa para producir vectores de rAAV con genomas que contienen grandes construcciones (por ejemplo, más de 5 kb).

Métodos

30 Construcción de plásmido pTP para vectores de FVIII de 5,1 y 5,4 kb de gran tamaño

Se generaron casetes de expresión de FVIII en plásmidos basados en pUC57 y consistían en promotor de transtiretina de ratón (mTTR) (Costa, RH *et al.*, *Mol Cell Biol* 1986, 6:4697-4708.) (Secuencia central de 202 pb con y sin secuencia
 35 potenciadora de 100 pb), intrón híbrido (Jiang, H. *et al.*, *Blood* 2006 108:107-115),

ADNc de FVIII con dominio B humano suprimido con codones optimizados, poliA sintético o de BGH y secuencias repetidas terminales invertidas de rAAV2. Estas generaron vectores de rAAV con tamaños de genoma de vector que variaban de 5,1 a 5,4 kb (**FIG. 1A**).

5 Se ensayaron vectores plasmídicos con casetes de expresión de FVIII con respecto a la producción de FVIII *in vivo* por inyección de alto volumen en ratones C57BL/6 normales. Para generar líneas celulares productoras (PCL) para vector de AAVrh8R/5,1 kb FVIII, se digirió un plásmido TriplePlay, pAFTGEN-SEAP-caprh8R, con BglII y sus extremos se hicieron romos. El genoma de vector de FVIII con ITR de AAV2 5' y 3' flanqueantes se escindieron de pUC57-mTTR-hFVIIIco (pITR-mTTR-hFVIIIISQco-SpA) usando sitios PvuI y SapI. El fragmento romo PvuI/SapI de 5,5 kb se ligó con el plásmido TriplePlay para generar el plásmido con vector de FVIII de 5,1 kb y gen *cap* de AAVrh8R. Se generó una construcción similar que contenía gen *cap* de AAV8. Se preparó un plásmido TriplePlay con gen *cap* de AAVrh8R y vector de 5,4 kb reemplazando una región de poliA sintética con poliA de hormona del crecimiento bovina (BGH). Los clones resistentes a kanamicina resultantes se transfectaron a células Huh7 para ensayar la producción de proteínas de FVIII.

La cuantificación de los niveles de FVIII en medio por ensayo de ELISA convencional confirmó la producción de FVIII a partir de plásmidos TriplePlay. Se ensayó la generación de vectores de rAAV a partir de plásmidos TriplePlay seleccionados (pTGEN/AAVrh8R/mTTRhFVIII o pTGEN/AAV8/mTTRhFVIII) mediante co-transfección de pAdhelper en células 293. Se recogieron lisados celulares y se realizó qPCR con cebador/sonda de FVIII para cuantificar la cantidad de genomas empaquetados.

25 Se encuentran cebadores y sondas usados en los Ejemplos presentados en el presente documento en la Tabla 1.

Generación de líneas celulares productoras para vectores de FVIII de 5,1 kb y 5,4 kb

Se transfectó pTGEN/AAVrh8R/mTTR-hFVIII (con vector de 5,1 o 5,4 kb) o plásmido pTGEN/AAV8/mTTR-hFVIII con Lipofectamina y reactivo Plus en células HeLaS3. Las células se sembraron en placas de 60 × 96 pocillos y las placas se lavaron y se alimentaron semanalmente. Después de selección, las placas se puntuaron con respecto a crecimiento de colonias. Se recogieron pocillos maestros (MW) y se transfirieron una placa de 24 pocillos y se recogieron basándose en el tamaño en una placa de 24 pocillos.

A continuación los pocillos maestros se sembraron en placas de 96 pocillos para exploración de producción relativa (RP) y los MW positivos para producción de vectores de exploraciones de RP se ensayaron después con respecto al nivel de producción específico (SP); por ejemplo, mediante producción de vector por qPCR (Martin, J. *et al.*, 2013 *Hum. Gene Ther. Meth.* 24:253-269).

Caracterización de ADN genómico de líneas celulares productoras con vectores de FVIII de 5,1 kb y 5,4 kb

Se analizó ADN genómico con respecto a números de copias de secuencias de vector, rep y puromicina por qPCR usando cebadores y sondas específicos para cada secuencia. Adicionalmente, se analizó el tamaño y la integridad del plásmido “TriplePlay” integrado mediante transferencia de Southern. Para esto, se digirió ADN genómico con SpeI (de corte único en el plásmido Tripleplay) para determinar el tamaño del plásmido TriplePlay integrado y con BglII/HincII para buscar integridad del casete de expresión de vector. La digestión con BglII/HincII corta dentro del promotor de mTTR, ADNc de FVIII y poliA sintético generan fragmentos de 1,8 y 2,8 kb. Se procesó ADN genómico digerido y plásmido TriplePlay (con adiciones de ADN genómico y usado como marcadores de número de copia y tamaño) en gel de agarosa 0,8 %. Se transfirió ADN a membrana de nylon y se exploró con fragmento de NcoI de FVIII marcado con DIG.

Caracterización de producción de vector de AAV/mTTR-hFVIII a partir de líneas celulares productoras

Se analizaron MW seleccionados con respecto a producción de vector de rAAV. Para comparación, los vectores de FVIII de 5,1 y 5,4 kb se prepararon por el método de producción de transfección triple transfectando el plásmido pUC57-mTTR-hFVIIIco a células 293. Las células se recogieron, se lisaron y se realizó purificación comparable al método de línea celular productora. Se cuantificaron muestras de ambos métodos con respecto a copias de genomas del vector por qPCR y se calcularon las recuperaciones de virus y los rendimientos. Los lotes de vector se caracterizaron por análisis por SDS-PAGE de cápsides, análisis de AUC y para tamaños de genoma empaquetado (véase posteriormente).

Caracterización de genomas de vector de rAAV/mTTR-hFVIII generados a partir de líneas celulares productoras

Se extrajeron genomas de vector empaquetado (VG) a partir de cápsides purificadas de la siguiente manera. Se incubó virus con 110 U de DNase (Promega) a 37 °C durante 1 h. Se añadió EDTA para detener la digestión seguido de incubación

con digestión con proteinasa K con presencia de N-lauril sarcosilo a 50 °C durante 45 min. Se extrajo ADN dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 14.000 rpm a 4 °C durante 10 min. El ADN se precipitó con etanol al 100 % y acetato sódico T 3 M a -80 °C durante 1 h, centrifugado durante 1 h. Se resuspendió ADN y el sedimento en TE.

Para análisis de Southern, se separaron los genomas por electroforesis en gel alcalino 1 % en tampón de ejecución consistente en NaOH 30 mM y EDTA 1 mM. Las muestras se transfirieron y se reticularon en una membrana Hybond (Amersham), se exploraron con diversos fragmentos específicos para casete de expresión de FVIII. Estos incluyeron un fragmento NheI-XcmI de 4,0 kb que contenía todos los dominios de FVIII excepto C2. Adicionalmente, se usaron diversas sondas oligonucleotídicas específicas de cadena de 25 a 30 unidades. Las sondas mayores se marcaron con el sistema de Marcaje Directo AlkPhos (Amersham). Las sondas oligonucleotídicas se marcaron en el extremo 3' usando el Kit de Marcaje de Extremo 3' DIG Oligo (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para análisis de transferencia puntual de ADN, los VG se desnaturalizando en tampón TE pH 7,0 calentando a 100 °C durante 5 min seguido de un enfriamiento de 5 min en hielo y aplicación manual a membrana de nylon usando una pipeta multicanal. El ADN se fijó a la membrana mediante reticulación de UV. Se llevó a cabo hibridación para cada sonda oligonucleotídica marcada con DIG a 50 °C durante 6 h en tampón Easy Hyb seguido de lavados de alta rigurosidad, una etapa de bloqueo (30 min), detección con fragmentos Fab anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina (30 min), lavados adicionales, reacción con sustrato CDP-Star (5 minutos) y exposición a película de rayos X de acuerdo con instrucciones del kit de marcaje de Extremo 3' (Roche). La densidad de señal en transferencias de Southern y puntuales se cuantificó usando software ImageJ (disponible en rsb.info.nih.gov/ij).

Tabla 1. Cebadores y sondas

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
Cuantificación de genoma del vector de FVIII		
Cebador Directo de FVIII A1	GACGTGGTGCGCTTCGA	5
Cebador Inverso de FVIII A1	GGGCGTAATCCCAGTCCTCT	6
Sonda de FVIII A1	AAGCGTGGCCAAGAAGCACCCC	7

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
Cuantificación del gen de Ampicilina ^R		
Cebador Directo de Amp	GTTGCCATTGCTACAGGCATC	8
Cebador Inverso de Amp	ACTCGCCTTGATCGTTGGG	9
Sonda de Amp	FAM-ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC-TAMRA	10
Cuantificación del gen de Puromicina ^R		
Cebador Directo de Puromicina	GGACCGCCACATCGAGC	11
Cebador Inverso de Puromicina	CCCCGCTTCGACGCT	12
Sonda de Puromicina	FAM-TCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCAC-TAMRA	13
Cuantificación del gen Rep		
Cebador Directo de Rep	GACCAGGCCTCATACATCTCCTT	14
Cebador Inverso de Rep	GGCAGCCTTGATTTGGGA	15
Sonda de Rep	FAM-AATGCGGCCTCCAACCTCGCG-TAMRA	16
Cuantificación del gen de E6		
Cebador Directo de E6	CAACACGGCGACCCTACAA	17
Cebador Inverso de E6	TCCAATACTGTCTTGCAATATACACAGG	18
Sonda de E6	FAM-TGCACGGAACCTGAACACTTCACTGCAAG-TAMRA	19
Análisis de genoma de vector		
Oligo n.º 4768 (+)	CCGTCGTGAATAGCCTGGACCCTC	20
Oligo n.º 4924 (+)	ATCTGTGTGTTGTTTTTTGTGTGCGGC	21
Oligo n.º 3342 (-)	AATCCCAGTCCTCTTCCTCGGCGGCGATA	22
Oligo n.º 4900 (-)	AGTATCGGAACACTCGCTCTACGAAATGT	23

Evaluación de vector de AAV/mTTR-hFVIII generado a partir de líneas celulares productoras *in vivo*

Se evaluaron vectores de rAAV en ratones KO para hemofilia A machos (C56BL/6, 129S-F8 ^{tm1Kaz} [gen neo en exón 16]) a las 8-12 semanas de edad (Jackson Laboratories). Se administraron vectores (4, 10 y 30 × 10¹⁰ DRP/ratón) por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Se recogió sangre mediante seno retro-orbital en tubos de citrato sódico y se almacenó plasma congelado hasta su análisis. Se analizaron muestras de plasma con respecto a los niveles de actividad de FVIII usando ensayo de Coatest (Diapharma) de acuerdo con el protocolo del fabricante (modificado para un formato de 96 pocillos). Los valores se midieron como % de actividad de FVIII presente en plasma normal y se convirtió a ng/ml (100 % de FVIII = 150 ng de FVIII/ml). Algunas muestras también se ensayaron con respecto al tiempo de tromboplastina parcial (PTT, IDEXX). Los niveles de proteína de FVIII se cuantificaron por ELISA convencional (Enzyme Research Laboratories) usando plasma humano normal agrupado (Innovative Research) como patrón.

Se recogieron muestras de hígado al final de cada estudio. Se homogeneizaron hígados (50-400 mg) en 1 ml de RLTplus con 10 µl de β-mercaptoetanol y 0,64 cm de perlas de circonio de 1 mm se homogeneizaron con batidora de perlas-16. Se colocó una parte del homogeneizado en Trizol (para ARN) o ADN Stat-60 (para ADN). Se purificó ARN usando el protocolo Trimega seguido de purificación con una columna de centrifugación (Promega Z3100) de acuerdo con el fabricante. El ARN se eluyó con agua sin nucleasa y se centrifugó durante 1 min a 15.000 × g. Se usó ARN para generar ADNc (Invitrogen). Se purificó ADN mediante columnas de extracción de ADN Purelink (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron posteriormente tanto ADNc como ADN para cuantificar ARNm de FVIII y copias de genoma del vector, respectivamente, por qPCR usando cebadores y sondas específicos para la región A2 de FVIII (Tabla 1).

Resultados

Para generar una plataforma de PCL para producción de vectores de rAAV de gran tamaño, se construyeron casetes nuevos para expresión de FVIII. Estos casetes se flanquearon por ITR de AAV y variaban de genomas de vector de 5,1 a 5,4 kb (**FIG. 1A**). Cada casete incluía un promotor derivado del promotor de mTTR, y se construyeron diferentes variantes de mTTR para examinar sus efectos sobre la expresión (véase alineamiento y explicación de variantes proporcionadas en la **FIG. 1B**).

Todos estos casetes de expresión en el contexto de plásmidos produjeron FVIII cuando se ensayaron *in vivo* en ratones (**FIG. 1C**). Las modificaciones en los sitios de unión a HNF3 y HNF4 mostrados en las **FIGS. 1A y 1B** aumentaron la producción de FVIII sobre el promotor de mTTR central ("202") pero modificaciones adicionales tales como potenciador de mTTR y poliA de BGH no (**FIG. 1C**). La **FIG. 1D** muestra un diagrama del casete de expresión de FVIII. La **FIG. 1E** muestra el diseño para el plásmido TriplePlay.

Los casetes de expresión con mTTR central (5,1 kb) y casete de expresión con potenciador, mTTR y poli A de BGH (5,4 kb) se usaron para ensayo posterior de producción de PCL para vectores de FVIII de gran tamaño después de generar un plásmido de TriplePlay para cada uno. Los resultados de ELISA de FVIII confirmaron que los plásmidos de TriplePlay/FVIII transfectados produjeron FVIII *in vitro* cuando se transfectaron en células Huh7. Los plásmidos de FVIII también fueron capaces de generar rAAV en experimentos de empaquetamiento a pequeña escala.

En resumen, se generaron modificaciones de promotor de mTTR que aumentaron la expresión del promotor de mTTR central *in vivo*. Todos los plásmidos TriplePlay expresaron FVIII *in vitro* y fueron capaces de generar virus en experimentos de empaquetamiento a pequeña escala.

Para generar las líneas celulares productoras con un vector de mTTR-FVIII de 5,1 kb de gran tamaño, se analizaron los MW para niveles de producción de rAAVrh8R/FVIII. De estos, se identificaron los altos productores, medianos productores y bajos productores. Como tal, se mostró que podrían generarse PCL para los vectores de rAAV/mTTR-FVIII de gran tamaño.

Ejemplo 2: Caracterización de ADN genómico para línea celular productora con vector mTTR-FVIII

Para evaluar copias integradas del plásmido TriplePlay y la integridad del casete de expresión de FVIII descrito en el ejemplo 1, se seleccionaron MW que contenían vector AAVrh8R/5,1 kb, AAVrh8R/5,4 kb o AAV8/5,1 kb FVIII para análisis de ADN genómico.

En el MW alto productor (MW n.º 35), el análisis de Southern reveló aproximadamente 50 copias del vector en el genoma de la línea celular mientras que el medio que producía MW n.º 272 tenía menos de 10 copias de cada uno por Southern (**Figura 2A**).

También se analizaron MW productores altos y medios con respecto a producción de AAVrh8R/5,1 kb, AAVrh8R/5,4 kb o AAV8/5,1 kb con mTTR-FVIII por

qPCR (Tabla 2). Se determinaron los números de copias para FVIII, genes de rep y puroR usando cebadores/ sondas específicos para cada uno y los números de copias se normalizaron al gen E6 presente en células HeLaS3 (11 copias por genoma de HeLaS3). En el MW alto productor (MW n.º 35), el análisis de qPCR reveló aproximadamente 59-67 copias de vector, rep y puromicina (Tabla 2) mientras que el productor mediano MW n.º 272 tenía de 15 a 18 copias de cada uno por qPCR (Tabla 2). Estos valores eran ligeramente mayores en comparación con los resultados obtenidos por Southern pero tenían un orden de clasificación similar (**Figura 2A**). Para comparación, se empaquetó un vector de tamaño normal (4,3 kb) que expresaba SEAP en cápsides AAV2 o AAV8 y se analizó.

Tabla 2. Análisis genómico de MW seleccionados con respecto a copias de plásmido TriplePlay integrado

Línea celular	Pocillo maestro	Copias/célula			Nivel de producción
		FVIII (dt)	REP (dt)	PUROMICINA (dt)	
AAVrh8R/FVIII 5,1 kb	MW n.º 35	67 (2)	65 (0)	59 (1)	H
AAVrh8R/FVIII 5,1 kb	MW n.º 272	15	16	18	M
AAVrh8R/FVIII 5,1 kb	MW n.º 418	229	195	260	H
AAVrh8R/FVIII 5,4 kb	MW n.º 61	235 (13)	256 (1)	196 (12)	M
AAVrh8R/FVIII 5,4 kb	MW n.º 163	253 (40)	265 (1)	237 (5)	H
AAV8/FVIII 5,1 kb	MW n.º 287	270 (38)	294 (6)	266 (13)	H
AAV8/FVIII 5,1 kb	MW n.º 342	101 (5)	126 (2)	108 (4)	H
AAVrh8R/FVIIIopt 5,1 KB	MW n.º 14	1362 (48)	1499 (22)	1343 (42)	H
AAVrh8R/FVIIIopt 5,1 KB	MW n.º 27	77 (4)	82 (3)	73 (73)	M
AAV2/SEAP	control (MW n.º 156 SEAP)	0	73 (1)	70 (2)	H
	HeLaS3	0	0	0	

El análisis de transferencia de Southern de ADN genómico digerido con una enzima de restricción (SpeI) que se ha predicho que corta solamente una vez en el plásmido Tripleplay/FVIII mostró una generación de una banda de ~13 kb que migraba de forma similar al plásmido Tripleplay/FVIII linealizado añadido a ADN genómico. Por

lo tanto, todos los clones contenían el plásmido entero integrado en el genoma de HeLaS3.

Como se muestra en la **Figura 2A**, todos los MW tenían también diversos tamaños de bandas de bajo número de copias (de una copia) que representaban el ADN genómico que flanqueaba los sitios de integración. Aunque 272 (productor mediano) y 35 (productor alto) tenían un patrón indicativo de un único sitio de integración (solamente se observaron dos fragmentos flanqueantes), MW418 tenía múltiples fragmentos flanqueantes así como fragmento mayor (aproximadamente $2 \times 14 = 24$ kb), lo que representaba potencialmente un tándem de orientaciones directa e inversa del plásmido integrado. Este hecho, junto con los múltiples patrones de integración, sugiere que MW418 era una mezcla de clones.

Como se muestra en la **Figura 2B**, se analizó la integridad de genoma de vector de FVIII digiriendo con enzimas (HincII, BglII) que escindían dentro del casete de expresión de FVIII. Se observaron fragmentos de tamaño correcto basándose en resultados similares obtenidos con digestión del plásmido TriplePlay original en comparación con el control. Estos resultados demostraron que no se produjo ningún reordenamiento del vector tras la integración. Se realizó un análisis similar para líneas celulares productoras con un vector de 5,4 kb así como para un vector de 5,1 kb con cápsides de AAV8 y se obtuvieron resultados comparables. En resumen, no se observó ningún reordenamiento o supresión en secuencias de vectores de 5,1 o 5,4 kb integrados en el ADN genómico aislado de las líneas celulares productoras lo que indica que es factible la generación de una línea celular productora que contenga genomas de vector de AAV de gran tamaño.

Ejemplo 3: Producción de vector de gran tamaño usando líneas celulares productoras y análisis de vector

A continuación se examinó la producción de vector de rAAV usando la línea celular MW35 descrita anteriormente. El clon productor alto para vector de AAVrh8R/5,1 kb FVIII (MW35) se ensayó con respecto a la producción de vector de rAAV en cultivos a pequeña escala. Se vio producción de rAAV máxima en los días 3 y 4 y se mantuvieron los niveles de alta producción durante el aumento de escala del cultivo (**Figura 3A**).

Esto se demuestra además por los resultados mostrados en la Tabla 3 posterior. La producción por MW n.º 35 se aumentó de escala para comparar los niveles de producción de vector. Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de vector en sedimento celular (célula) y medio de cultivo (CM). Se muestra el vector de

AAV2/SEAP de tamaño normal para comparación.

Tabla 3. Producción de vector de AAVrh8R/5,1 kb por MW n.º 35

FVIII MW n.º 35	SP: VG/ml	Célula (%)	CM (%)
20 ml (4×10^6 células)	$2,41 \times 10^{10}$	39	61
250 ml (5×10^7 células)	$2,64 \times 10^{10}$	45	55
1000 ml (2×10^8 células)	$3,17 \times 10^{10}$	35	64
MW156 (SEAP): 20 ml	$4,15 \times 10^{10}$	NT	NT

Para el serotipo de vector usado, el vector se detectó igualmente en sedimento celular y medio de cultivo. Ambos MW 35 y 418 fueron estables durante varios pases. MW35 mantuvo un alto nivel de producción ($\geq 1 \times 10^{10}$ DRP/ml) del pase 5 hasta pase 20 (**Figura 3B**). De forma similar, MW418 (clasificado como productor mediano) mantuvo un nivel de producción mediano estable ($\geq 1 \times 10^9$ drp/ml) desde el pase 5 hasta el pase 21. También se demostró producción de vector estable para MW287 que generó un vector de 5,1 kb con diferente serotipo de cápside (AAV8) (**Figura 3B**).

Estos datos demuestran que puede obtenerse producción alta y estable de vectores de gran tamaño, independientemente de serotipo de cápside, similar a lo que se había mostrado previamente para vectores de tamaño normal (Martin, J. *et al.* (2013) *Molecular Therapy* 21:2205-2216). Se obtuvo también producción de vector robusta con PCL con el vector de mTTR-FVIII de 5,4 kb así como para PCL con el vector de 5,1 kb con cápsides de AAV8, que producían resultados comparables.

A continuación se aumentó de escala la producción de vectores usando pocillos maestros altos productores (MW n.º 35 para AAVrh8R/5,1 kb FVIII, MW n.º 287 para AAV8/5,1 kb FVIII y MW n.º 163 para AAVrh8R/5,4 kb FVIII) para evaluar el rendimiento y la calidad de los vectores (**Tabla 4** y **Figura 4A**). La producción de vectores se comparó con el vector generado por el método de triple transfección (**Tabla 4** y **Figura 4B**). Se incluyeron tres lotes de PCL y dos de TXN en la comparación del vector de AAVrh8R/5.1 kb FVIII. Se muestran por ejemplo datos con la cápside de AAVrh8R con genoma de 5,1 kb.

Tabla 4. Comparación del vector de AAVrh8R/5,1 kb FVIII generado por PCL o métodos de triple transfección

Análisis	Línea celular productora	Triple transfección
Células/producción	2×10^9 células	3×10^9 células
Rendimiento de vector total	2×10^{14} DRPs	6×10^{13} DRPs

Rendimiento/célula	1×10^5 <i>DRP/célula</i>	2×10^4 <i>DRP/célula</i>
% de VG que contienen virus	44-50 %	24-30 %
% de virus con VG >4,7 kb	59-61 %	43-50 %

Los procesamientos de producción de PCL con MW35 dieron como resultado un perfil de productos uniforme como se evalúa por análisis de AUC (**Figura 4A**). Como se ha resumido en la Tabla 4 anterior, el porcentaje de cápsides que contenían genoma de vector determinado por este análisis fue de 44-50 % para virus generados por PCL, mientras que el material de transfección triple tenía menores niveles (30 %; solamente 1-5 % para HLP19, plásmido de vector de cadena principal grande). Además, estaba presente una mayor parte de virus con genomas mayores ($\geq 4,7$ kb) en el material generado por PCL. Los rendimientos de vector/célula fueron 1×10^5 *DRP/célula* por PCL alto productor y $1-3 \times 10^4$ *DRP/célula* por TXN (con HLP19 y cadenas principales de vector grande menores, 1×10^3 *DRP/célula*).

Tabla 5. Comparación de vector AAVrh8R/5,4 kb FVIII generado por PCL o métodos de triple transfección

Análisis	Línea celular productora	Triple transfección
Células/producción	2×10^9 células	2×10^9 células
Rendimiento de vector total	2×10^{13} DRPs	2×10^{14} DRPs
Rendimiento/célula	2×10^4 <i>DRP/célula</i>	7×10^4 <i>DRP/célula</i>
% de VG que contiene virus	24%	23%
% de virus con VG >4,7 kb	68 %	39 %

Un análisis similar para un vector de 5,4 kb usando MW163 mostró niveles de *DRP/célula* ligeramente menores por PCL en comparación con triple transfección (Tabla 5 anterior). Aunque el porcentaje total de cápsides que contenían VG era comparable, el virus generado por PCL tuvo mayor nivel de virus con genomas mayores (**Figura 5B**).

Cuando se caracterizó material de PCL y material de triple transfección por análisis de AUC, la proporción de genomas mayores fue 2 veces mayor en material de PCL (**Figura 5A**) en comparación con material de transfección triple (**Figura 5B**).

Tabla 6. Análisis de empaquetamiento aberrante en vector producido por PCL y triple transfección

	Título del vector (DRP/ml)		
	FVIII	Puromicina	% de Puromicina
Vector por PCL			
AAVrh8R/5,1-FVIII	1,2E+12	5,40E+09	0,44
AAVrh8R/5,4-FVIII	7,6E+12	1,54E+10	0,20
AAV8/5,1-FVIII	5,1E+12	1,21E+10	0,24

	FVIII	Ampicilina	% de Ampicilina
Vector por TXN			
AAVrh8R/5,1-FVIII	2,3E+13	4,76E+11	2,10
AAVrh8R/5,4-FVIII	1,6E+13	5,38E+11	3,40
AAVrh8R/FVIII 4,6 kb	1,2E+13	2,47E+11	2,00

El nivel de empaquetamiento de ADN no deseado, aberrante, como se mide por la presencia de gen de resistencia a antibióticos derivado de plásmido (puromicina para PCL, ampicilina para TXN) en el virus empaquetado era bajo en el virus generado por PCL (<1 %) (Tabla 6). Por el contrario, el virus generado por TXN tenía niveles aproximadamente 10 veces mayores de empaquetamiento aberrante.

En resumen, los datos mostraron que las líneas celulares productoras seleccionadas eran capaces de generar alto nivel de vector de gran tamaño (> 100.000 DRP/ célula). Además, estas líneas celulares mantuvieron la capacidad de producción del vector durante varios pases (> 20) lo que se requeriría para aumento a gran escala para fabricación. La comparación de vector producido por PCL con el generado por el método de transfección triple convencional mostró que el material de PCL contenía más virus que contenían genoma de vector y una mayor proporción de genomas de vector de tamaño de tipo silvestre o mayor así como que contenían menos ADN no deseado, no relacionado con el vector.

Ejemplo 4: Caracterización de genomas de vector empaquetados en vectores de gran tamaño producidos por PCL

A continuación, se analizaron los genomas de vector encapsidados en vectores de rAAV de gran tamaño producidos por la plataforma de PCLN. Se aislaron genomas de vector de viriones purificados y se analizaron con respecto a tamaños de genoma monocatenarios por electroforesis en gel alcalino seguido de análisis de transferencia de Southern usando sondas específicas para el vector (**Figura 6A**). La transferencia de Southern explorada por un fragmento de 4,0 kb de casete de

expresión de FVIII mostró que la mayoría de tamaños de VG eran aproximadamente 4,6 kb o mayores en vectores generados por uno de los métodos (**Figura 6B**). Se cuantificó la densidad de señal en transferencias de Southern usando software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

5 También se analizaron VG usando sondas oligonucleotídicas específicas de cadena para cuantificar la proporción de extremos 5' terminales suprimidos. Ya que se sabe que el empaquetamiento de genomas de AAV se produce comenzando desde los extremos 3' (King, J.A. *et al.* (2001) *EMBO J.* 20:3282-3291), los vectores de gran tamaño pueden carecer de secuencia en los extremos 5' de cadenas menos y más
10 cuando el tamaño del genoma supera 4,7 kb. Los lotes de vectores usados en las **Figuras 4A y 4B** se analizaron aplicando diluciones en serie dobles de cada vector en membrana (comenzando a $2,4 \times 10^9$; un total de ocho concentraciones de vector decrecientes más ningún genoma aplicado como control negativo). Cada transferencia se hibridó con sondas oligonucleotídicas marcadas en el extremo 3' específicas para
15 extremos 3' o 5' terminales de genomas de vector (polaridad más o menos). La intensidad de señal se cuantificó y se normalizó con un vector de 4,6 kb (completamente empaquetado). Se usaron tres concentraciones para generar error típico.

Los datos mostraron que en comparación con el vector de 4,6 kb
20 completamente empaquetado (con una secuencia comparable al vector 5,1 kb excepto la región codificante para el dominio C1 de FVIII), los vectores 5.1 kb tenían una menos intensidad de señal cuando se usaron oligonucleótidos complementarios de las regiones más allá de 4,7 kb para ambas polaridades de genomas monocatenarios (**Figuras 7A, 7B y 7C**). esta diferencia fue mayor en material transfectado triple en
25 comparación con el vector de PCL con la mayoría de las sondas 5' usadas.

La diferencia en los extremos 5' en vectores generados por PCL y por transfección triple también se observó cuando se exploraron transferencias de Southern con sondas oligonucleotídicas complementarias de cadenas + o -. Se muestra la distancia de cada sonda oligonucleotídica de los extremos 3' respectivos
30 (**Figura 8A**). Se comparó en primer lugar la detección igual de virus generado por PCL y triple transfección (TXN) por análisis de transferencia puntual de ADN con sondas oligonucleotídicas específicas de cadena y mostró cantidades comparables de cada virus para cada cadena (se usó virus de 4,6 kb como control para virus completamente empaquetado; se usaron plásmidos que contenían FIX y FVIII como controles
35 negativos y positivos para especificidad de detección) (**FIG. 8B**). Cuando se

exploraron transferencias de Southern con sondas oligonucleotídicas para los extremos 3', los virus generados tanto por PCL como por TXN demostraron presencia de cadenas + y – (**Figura 8C, paneles izquierdos**). Se detectaron niveles mayores de genomas de vector mayores de 4,6 kb en virus de PCL similares a las observaciones mostradas en la **Figura 6A**. Cuando las transferencias de Southern se exploraron con oligonucleótidos específicos para los extremos 5', el vector de PCL mostró presencia de genomas empaquetados mayores de 4,6 kb mientras que el virus generado por transfección triple mostró una clara falta de señal para estos genomas mayores (la sonda usada detectó una región a 4,9 kb desde el extremo 3') (**Figura 8C**). La mayor parte de genomas mayores de 4,7 kb también se confirmó por cuantificación de intensidad de señal para genomas empaquetados de diversos tamaños en las transferencias de Southern (usando sonda para los extremos 3') (**Figura 8D**). La cuantificación también mostró genomas menos fragmentados/más pequeños (< 4,7 kb) en vector de PCL en comparación con el vector de TXN.

A continuación se evaluó el empaquetamiento de genoma de vector del vector de FVIII 5,4 kb generado por PCL y TXN por métodos similares. Se muestra la localización de secuencia complementaria para cada sonda oligonucleotídica en el genoma de 5,4 kb de sus extremos 3' respectivos (**Figura 9A**). De forma similar a los resultados para los vectores de 5,1 kb, las cadenas + y – de los vectores de 5,4 kb se detectaron en niveles comparables con sondas oligonucleotídicas para los extremos 3' de los genomas (**Figura 9B**). Sin embargo, las sondas específicas para áreas localizadas más allá de 4,7 kb de los extremos 3' no consiguieron detectar genomas en vectores generados por el método de TXN (**Figura 9C**). Por el contrario, los vectores generados por método de PCL mostraron presencia de genomas mayores de 4,7 kb (aunque no tan grandes como 5,4 kb).

En resumen, los datos demostraron un mayor nivel de empaquetamiento de genoma de vector mayor en vectores generados por método de PCL en comparación con el del método de TXN.

Ejemplo 5: Eficacia de vectores de rAAV/mTTR-FVIII de gran tamaño *in vivo*

A continuación, se examinaron vectores de rAAV de gran tamaño producidos por la plataforma de PCL con respecto a eficacia *in vivo*. El vector se administró a los ratones por la vena de la cola a 3×10^{11} y 4×10^{10} DRP/ratón y se analizó hasta el día 56. El vector AAVrh8R/5,1 kb mTTR-FVIII producido por PCL generó proteína FVIII activa detectable en plasma de ratones KO para hemofilia A tratados de una manera

sensible a dosis (**Figura 10A**). Además del ensayo de actividad Coatest, la actividad de FVIII también se evaluó con respecto a funcionalidad por tiempo de coagulación usando un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT). Este ensayo mostró tiempos de coagulación comparables para las dosis bajas y altas ensayadas, indicando de este modo que la dosis baja clínicamente relevante era suficiente para normalizar el tiempo de coagulación en ratones KO para hemofilia A (**Figura 10B**).

El vector generado por PCL se comparó después con vector producido por transfección triple usando una dosis de vector clínicamente relevante (2×10^{12} DRP/kg, 4×10^{10} DRP/ratón). Se administraron vectores a ratones KO para hemofilia A por la vena de la cola. El virus generado por PCL produjo más proteína FVIII activa que virus producido por TXN como se determina por ensayo de actividad Coatest (**Figura 11A**). Esto también se correlacionó con un tiempo de coagulación significativamente más corto el día 21 por un ensayo aPTT por el vector generado por PCL (**Figura 11B**). Se observó poca diferencia entre material de PCL y de TXN el día 56 lo que sugiere que el material de PCL dio como resultado cinética de expresión más rápida (**Figura 11C**). La cuantificación de copias de genoma de vector de hígado mostró genomas de vector más persistentes en los animales tratados por el vector generado por PCL que los observados con el material de TXN (**Figura 11D**).

El vector de FVIII de 5,4 kb mayor, generado por PCL y TXN también se ensayó en ratones con inactivación de hemofilia. De forma similar al vector de 5,1 kb, el vector de 5,4 kb generado por PCL mostró mayor actividad de FVIII por ensayo de Coatest y tiempo de coagulación más corto el día 24 (**Figura 12A, B**). Para analizar la cinética de los niveles de genoma de vector en el hígado, se cuantificaron las copias de genoma del vector tanto 3 como 43 días después de la administración del vector. Los datos demostraron que en ambos días hubo aproximadamente 2 veces más genomas de vector en los animales tratados por el vector generado por PCL que con el del material de TXN (**Figura 12C**).

En resumen, el vector rAAV/mTTR-FVIII de gran tamaño generado por el método de PCL dio como resultado una actividad de FVIII 2 veces mayor y tiempos de coagulación más cortos que el del método de TXN cuando se ensayó *in vivo* en el modelo de enfermedad de KO de hemofilia A. estos resultados se correlacionaron con los niveles 2 veces mayores de genomas de vector persistentes presentes en el hígado de los animales tratados. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las diferencias observadas en la calidad de los genomas empaquetados entre los dos métodos de producción de vectores para vectores de rAAV de gran tamaño se

traducen en una potencia *in vivo* mayor por el vector generado por PCL y se basa en la eficacia aumentada de generación de genomas de vectores transcripcionalmente activos en el órgano diana.

Ejemplo 6. Generación de líneas celulares productoras con vectores de SEAP de 5,1, 5,9 y 6,7 kb de gran tamaño

Métodos:

Se generaron genomas de vector AAV2-SEAP de gran tamaño con aumentos por etapas en el tamaño del vector (véase **Figura 13A**) que variaban de 5,1 kb a 5,9 y 6,7 kb. Se amplificaron fragmentos de ADN de relleno de AAT de tres longitudes (0,8, 1,6 y 2,4 kb) mediante PCR usando como molde el plásmido AAVsp70 y cada fragmento de relleno se clonó en los plásmidos TriplePlay con genes cap y rep de AAV2 y cada uno de los genomas de vector de SEAP para generar una serie de plásmidos de pAF-SEAP.

Para la generación de líneas celulares para vectores de SEAP de gran tamaño, se compararon los plásmidos correspondientes que contenían el genoma de vector y los genes rep y cap de AAV2 en paralelo con respecto a la capacidad para generar líneas celulares altas productoras en una transfección analítica de alto rendimiento de 24 pocillos. Se transfectaron matraces T75 duplicados de células HeLaS3 con cada una de las construcciones por protocolo convencional. Un día después de la transfección se sembraron ocho placas de 24 pocillos por cada transfección con 75.000 células/pocillo y se inició la selección farmacológica. Las muestras se cultivaron y se evaluaron con respecto al tamaño de las colonias y la confluencia en preparación para la exploración de productividad relativa.

Resultados:

Los plásmidos de vector de gran tamaño de 5,1, 5,9 y 6,7 kb (**Figura 13A**) se confirmaron en primer lugar para empaquetamiento mediante transfección transitoria en células HeLaS3 (+wtAd5). El resultado mostró que cada plásmido facilitaba el empaquetamiento del vector (datos no mostrados).

Se exploraron aproximadamente ~100-170 pocillos maestros para cada construcción en la exploración de producción relativa. El porcentaje de pocillos maestros positivos (los que producían más de 1×10^7 DRP/ml) en la exploración de producción relativa fueron todos altos (> 80 %) mostrando solamente la construcción de 6,7 kb una cantidad reducida (65,7 %). Además, aunque solamente la construcción de 5,1 kb producía pocillos maestros que producían en el intervalo alto ($>1 \times 10^{10}$ DRP/ml) (tres totales), se identificaron pocillo maestros que producían en el intervalo

medio-alto ($>1 \times 10^9$ DRP/ml) en todos los casos. El porcentaje medio-alto sigue un patrón esperado, con 5,1 kb a 20 %, 5,9 kb a 15,4 % y 6,7 kb a 10,7 %.

Todos los pocillos maestros de mayor producción se sometieron posteriormente a un análisis de productividad específica. Los resultados de dos exploraciones de productividad específica se muestran en la **Figura 13B** (barras grises y blancas) y se comparan con el valor de productividad relativa (barra negra) para cada pocillo maestro. Los resultados mostraron que en muchos casos los rendimientos de vector permanecieron estables en las exploraciones de productividad específicas.

En resumen, los datos demostraron que podrían generarse líneas celulares productoras para vectores de al menos 6,7 kb de tamaño.

SECUENCIAS

Todas las secuencias polipeptídicas se presentan desde el extremo N hasta el extremo C salvo indicación en contrario.

Todas las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en dirección 5' a 3' salvo indicación en contrario.

mTTR202-HI-hFVIIIco-spA (5097 bp)

GAGCTCTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
 CCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 20 AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTACGCGTGTCT
 GTCTGCACATTTCTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGT
 TCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATC
 AGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGG
 GGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGC
 25 TAGCAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTAT
 GGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTGACACTGACATCCACTTTTTCTTTTTCTCCAC
 AGGTATCGATTCTCTAGAGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCT
 GTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGACGGTACTATCTGGGCGCCGT
 GGAAGTGAAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCCGTGGATG
 30 CCAGATTCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTA
 CAAGAAAACCCTGTTCTGTTGAATTACCGACCACCTGTTCAATATCGCCAAGCCC
 AGACCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGAC
 ACCGTCTGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGTCTCTGCATGCC
 GTGGGAGTGTCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACC
 35 AGCCAGCGCGAGAAAGAGGACGACAAGGTGTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTA
 CGTGTGGCAGGTGCTGAAAGAAAACGGCCCCATGGCCTCCGACCCTCTGTGCCT
 GACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGCCT
 GATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAGGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCA
 GACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTCGCCGTGTTTCGACGAGGGCAAGAGCTG
 40 GCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGGGACGCCGCCTCTGCTA
 GAGCCTGGCCCAAAATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCCG
 GACTGATCGGCTGCCACCGGAAGTCTGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCA
 CCACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGACACACCTTTCTCGTGCGGAA
 CCACCGGCAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCCCAGAC
 45 ACTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAG

CACGACGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAGGAACCCCA
GCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACGACCTGACCG
ACAGCGAGATGGACGTGGTGCCTTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCC
AGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCG
5 CCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCCCTCTGGTGCTGGCCCCCGACGACAGA
AGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGCGGATCGGCCGGAAGTAT
AAGAAAGTGC GGTTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCC
ATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGAC
ACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTC
10 ACGGCATCACCGACGTGCGGCCCTGTACTCCAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTG
AAACACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCCGGCGAGATCTTCAAGTACAAGTGGA
CCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCCAGATGCCTGACACGGT
ACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGGGACCTGGCCTCCGGCCTGATTGGCC
CACTGCTGATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGA
15 GCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTTCGATGAGAACCGGTCCTGGT
ATCTGACCGAGAATATCCAGCGGTTCTGCCAACCTGCCGGCGTGACAGCTGG
AAGATCCTGAGTTCCAGGCCTCCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTT
CGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAGGTGGCCTACTGGTACATCCT
GAGCATCGGGGCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGCTACACCTTC
20 AAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCTTTAGCGGCGAAA
CCGTGTTTCATGAGCATGGAACCCCGGCCTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACA
GCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACA
AGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGC
TGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAACCCCCCGTGC
25 TGAAGCGGCACCAGAGAGAGATCACCGGACCACCCTGCAGTCCGACCAGGAA
GAGATCGATTACGACGACACCATCAGCGTGGAAATGAAGAAAGAAGATTTGACA
TCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCCGGTCTTTTCAAGAAAAGACCCGGC
ACTACTTCATTGCCGCTGTGGAACGGCTGTGGGACTACGGCATGAGCAGCAGCC
CTCACGTGCTGAGAAACAGGGGCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAG
30 TGGTGTTCCAGGAATTCACAGACGGCAGCTTCACCCAGCCTCTGTACCGCGGCG
AGCTGAATGAGCACCTGGGACTGCTGGGCCCTATATCAGAGCCGAAGTGGAAG
ATAATATCATGGTACCTTCCGGAATCAGGCCTCCCGGCCCTACAGCTTCTACAG
CTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCCGGAAGAA
CTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGAAGGTGCAGCACCACATG
35 GCCCCTACAAAGGACGAGTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTG
GACCTGGAAAAGGACGTGCACTCTGGGCTGATCGGCCCTGCTCGTGTGCCAC
ACCAACACCCTGAATCCCGCCCCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAGGAATTCGCC
CTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAAAACATGG
AAAGAACTGCCGGGCTCCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGA
40 GAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCT
CGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAA
CGAGAACATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTACCGTGCGGAAAAA
AGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTCGAGACAGTG
GAAATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGGGTGGAATGTCTGATCGGCGA
45 GCATCTGCACGCTGGGATGAGCACACTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCA
GACACCTCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCCGGGACTTTCAGATCACAGCCAG
CGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCAAACTGGCCAGACTGCACTACAGCGGCA
GCATCAACGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGC
TGGCTCCCATGATCATCCACGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCA
50 GCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTG
GCAGACCTACCGGGGCAATAGCACCGGCACCCTGATGGTGTCTTCGGCAACGT
GGAATCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCCCGGTAC
ATCCGGCTGCACCCCAACCACTACAGCATCCGGTCCACCCTGAGAATGGAAGT

ATGGGCTGCGACCTGAACTCCTGCAGCATGCCCTGGGGATGGAAAGCAAGGCC
 ATCTCCGACGCCAGATCACCGCCTCCAGCTACTTCACCAACATGTTCCGCCACCT
 GGTCCCCATCCAAGGCCCGGCTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAATGCTTGGAGGC
 CCCAAGTGAACAACCCCAAAGAATGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAAACCATGAA
 5 AGTGACCGGCGTGACCACCCAGGGCGTGAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGT
 GAAAGAGTTCTGATCTCCAGCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCTGTTTTTC
 CAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCAGGGGAACCAGGACTCCTTCACCCCCGTC
 GTGAATAGCCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATCCACCCTCAG
 AGTTGGGTGCACCAGATTGCTCTGCGGATGGAAGTGTGCTGGGATGCGAGGCCCCAG
 10 GACCTGTACTGACACTAGTAATAAAAGATCAGAGCTGTAGAGATCTGTGTGTTGG
 TTTTTTGTGTGCGGCCGGTACCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT
 CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGC
 CCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT
 GGCC (SEQ ID NO:1)
 15 mTTR202opt
 TGTCTGTCTGCACATTTCTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGGC
 AAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCA
 GAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGG
 AGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTACACAGATCCACAAGCT
 20 CCTGCTAGC (SEQ ID NO:2)
mTTR482opt
 CTACCTGCTGATCGCCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTGCGGGGC
 AAAGGTCGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCCAGTGACGTAGGATC
 CTGTCTGTCTGCACATTTCTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGG
 25 CAAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATC
 AGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAG
 GAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTACACAGATCCACAAGC
 TCCTGCTAGC (SEQ ID NO:3)
pTGENcaphr8R-ITRmTTRFVIII (TriplePlay plasmid with AAVrh8R capsid and 5.1 kb
 30 ITR-mTTR-hFVIIIco) 13524 bp
 GAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG
 CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG
 TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTAGAACTAGGAAT
 TCGCTAGCGGTACCGATATCCTAGTGGATCCCCCGTACACAGGAAGTGACAATTT
 35 TCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGTAAGATTT
 GGGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTG
 AAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTTTTTACGAGATTGTGAT
 TAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTG
 AACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTG
 40 AATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGCCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTT
 CTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAA
 TTTGAGAAGGGAGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGAAACCACCGGG
 GTGAAATCCATGGTTTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTCGCGAAAACTGATTCA
 GAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTTCGCGGTACAAA
 45 GACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCC
 CCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATAT
 GGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCG
 CAGCATCTGACGCACGTGTCGACAGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAAT
 CCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGC
 50 TGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAG
 GAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAA
 TCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCC
 CGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTA

TAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGGCTTCCGTCTTTCTGG
 GATGGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCGTG
 CAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCT
 ACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGCGACAA
 5 GATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGG
 CCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCT
 CGGCCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCG
 CCGTGATTGACGGGAACCTCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACC
 GGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCAC
 10 CAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGT
 GGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCAG
 TGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATC
 GACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAAACAAATGT
 TCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAA
 15 TGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGC
 TTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTGTCGCAAAAAGGCGTATCAGAACT
 GTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCTGCGAT
 CTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATGATTTAAATCAG
 GTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGG
 20 CATTTCGCGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA
 GCAAAGCAGGACGACGCGCCGGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGG
 ACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGG
 CCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT
 ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATA
 25 CGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTC
 TCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGA
 GACCGGTAGAGCAGTCACCCCAAGAACCAGACTCATCCTCGGGCATCGGCAAAT
 CAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAG
 AGTCAGTCCCCGACCCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAGAAGCCCCCTCAGGTC
 30 TGGGACCTAATACAATGGCTTCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACG
 AAGGCGCCGACGGAGTGGGTAAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACAT
 GGCTGGGGGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCATTGCCACCT
 ACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAATGGAACATCGGGAGGAAGCACCAA
 CGACAACACCTACTTTGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGA
 35 TTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAAGTGGG
 GATTCGCGCCAAAGAGACTCAACTTCAAGCTGTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGT
 TACGACGAACGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACCGTCCA
 GGTCTTTACGGAAGTACGAGTACCAGCTACCGTACGTCCTAGGCTCTGCCACCAA
 GGATGCCTGCCACCGTTTCTGTCAGACGTCTTCATGGTTCTCAGTACGGCTACC
 40 TGACGCTCAACAATGGAAGTCAAGCGTTAGGACGTTCTTCTTTCTACTGTCTGGAA
 TACTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACCTTTCAGTTTCACTACACTTT
 CGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCACACAGCCAGAGTCTAGATCGACT
 GATGAACCCCTCATCGACCAGTACCTATACTACCTGGTCAGAACACAGACAACCT
 GGAACCTGGGGGAACCTCAAACCTTTGGCATTGAGCCAAGCAGGCCCTAGCTCAATG
 45 GCCAATCAGGCTAGAACTGGGTACCCGGGCGCTTGCTACCGTCAGCAGCGCGTC
 TCCACAACCACCAACCAAAAATAACAACAGCAACTTTGCGTGGACGGGAGCTGCTA
 AATTCAGCTGAACGGGAGAGACTCGCTAATGAATCCTGGCGTGGCTATGGCATC
 GCACAAAGACGACGAGGACCGCTTCTTTCCATCAAGTGGCGTTCTCATATTTGGC
 AAGCAAGGAGCCGGGAACGATGGAGTCGACTACAGCCAGGTGCTGATTACAGAT
 50 GAGGAAGAAATTAAAGCCACCAACCCTGTAGCCACAGAGGAATACGGAGCAGTG
 GCCATCAACAACCAGGCCGCTAACACGCAGGCGCAAACTGGACTTGTGCATAAC
 CAGGGAGTTATTCCTGGTATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGC
 CCTATTTGGGCTAAAATACCTCACACAGATGGCAACTTTCACCCGTCTCCTCTGAT

GGGTGGATTTGGACTGAAACACCCACCTCCACAGATTCTAATTA AAAATACACCA
GTGCCGGCAGATCCTCCTCTTACCTTCAATCAAGCCAAGCTGAACTCTTTCATCAC
GCAGTACAGCACGGGACAAGTCAGCGTGGAATCGAGTGGGAGCTGCAGAAAGA
AAACAGCAAGCGCTGGAATCCAGAGATCCAGTATACTTCAAACACTACAAATCTA
5 CAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACCGAAGGTGTTTACTCTGAGCCTCGCCCCAT
TGGTACTCGTTACCTCACCCGTAATTTGTAATTGCCTGTTAATCAATAAACCGGT
AATTCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGGGCCGCGCTTAATTAACATGTGAGC
AAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
10 GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTC
CCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT
CTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
CGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACA
15 CGACTTATCGCCACTGGCAGTAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
AGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC
20 TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGG
TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTTCAGTAGAAAGCCAGT
CCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACA
AGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGG
CGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACC GGAATTGCCAGCT
25 GGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTC
TTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCCGATCAAGAGACAGGA
TGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCG
CTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCT
CTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCTGGTTCTTTTTGTCA
30 AGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTAT
CGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTG
AAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTG
TCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC
GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATC
35 GCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATC
TGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAG
GCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTG
CCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGC
TGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTG
40 AAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCG
CTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATT
AATTAAGCGGCCGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC
AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCAGATCCG
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG
45 CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGG
CCAGTGAATTCGCGAGCTCTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT
CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT
TCCTACGCGTGTCTGTCTGCACATTTCTGATAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCT
50 CCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTC
AATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGG
TTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTACCAGGAGAAGCCGTACACAGATC
CACAAGCTCCTGCTAGCAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCT

CTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTGACACTGACATCCACTTTT
 TCTTTTTCTCCACAGGTATCGATTCTCTAGAGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTA
 CCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGACGGTACTA
 TCTGGGCGCCGTGGAAGTGAAGTGCAGAGCGACCTGGGCGAGC
 5 TGCCCGTGGATGCCAGATTCCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACAC
 CTCCGTGGTGTACAAGAAAACCTGTTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAAT
 ATCGCCAAGCCCAGACCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGACCTACAATTCAGGCC
 GAGGTGTACGACACCGTCGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTG
 TCTCTGCATGCCGTGGGAGTGTCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGCGCCGAGTAC
 10 GACGATCAGACCAGCCAGCGCGAGAAAGAGGACGACAAGGTGTTCCCTGGCGG
 CAGCCACACCTACGTGTGGCAGGTGCTGAAAGAAAACGGCCCCATGGCCTCCGA
 CCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTCGTGAAGGACCT
 GAACAGCGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAGGGCAGCCTGGCCA
 AAGAGAAAACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCCGCGTGTTCGACGA
 15 GGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGGGACG
 CCGCCTCTGCTAGAGCCTGGCCCAAATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACA
 GAAGCCTGCCC GGACTGATCGGCTGCCACCGGAAGTCTGTGTACTGGCACGTGA
 TCGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCTGGAAGGACACACCT
 TTCTCGTGCGGAACCACCGGCAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCC
 20 TGACCGCCCAGACACTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACAT
 CAGCTCCCACCAGCACGACGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCC
 CGAGGAACCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACG
 ACGACCTGACCGACAGCGAGATGGACGTGGTGCGCTTCGACGACGATAACAGCC
 CCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGC
 25 ACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCCCCCTCTGGTGCTGGCCC
 CCGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGCGGATCG
 GCCGGAAGTATAAGAAAGTGCGGTTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGA
 CCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGCCCTCTGCTGTATGGC
 GAAGTGGGCGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTAC
 30 AACATCTACCCTCACGGCATCACCGACGTGCGGCCCTGTACTCCAGAAGGCTG
 CCCAAGGGCGTGAAACACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCCCGGCGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCCA
 TGCCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGGGACCTGGCCTCC
 GGCCTGATTGGCCCACTGCTGATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGC
 35 AACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTTCGATGAGA
 ACCGGTCCTGGTATCTGACCGAGAATATCCAGCGGTTCTGCCCAACCCTGCCG
 GCGTGACGCTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCCTCCAACATCATGCACTCCATCAA
 TGGCTATGTGTTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAGGTGGCCTA
 CTGGTACATCCTGAGCATCGGGGCCAGACCGACTTCTGTCCGTGTTCTTCTCC
 40 GGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCT
 TTAGCGGCGAAACCGTGTTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATCCTGG
 GCTGCCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGT
 CCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCA
 GCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGA
 45 ACCCCCCCGTGCTGAAGCGGCACCAGAGAGAGATCACCCGGACCACCCTGCAGT
 CCGACCAGGAAGAGATCGATTACGACGACACCATCAGCGTGGAATGAAGAAAG
 AAGATTTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCCGGTCTTTCAGAA
 AAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCTGTGGAACGGCTGTGGGACTACGGCAT
 GAGCAGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAACAGGGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCC
 50 AGTTCAAGAAAGTGGTGTTCAGGAATTCACAGACGGCAGCTTCACCCAGCCTCT
 GTACCGCGGCGAGCTGAATGAGCACCTGGGACTGCTGGGCCCTATATCAGAGC
 CGAAGTGGAAGATAATATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCCTCCCGGCCCTAC
 AGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAG

CCCCCGAAGAACTTCGTGAAGCCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAAGGTGC
 AGCACCATATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAGGCCTGGGCCTACT
 TCTCCGATGTGGACCTGGAAAAGGACGTGCACTCTGGGCTGATCGGCCCCCTGC
 TCGTGTGCCACACCAACACCCTGAATCCCGCCCACGGCAGACAAGTGACAGTGC
 5 AGGAATTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCAC
 CGAAAACATGGAAAGAACTGCCGGGCTCCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCC
 CACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACA
 CTGCCCCGGCCTCGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATCCGGTGGTATCTGCTGTCC
 ATGGGCTCCAACGAGAACATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCCACC
 10 GTGCGGAAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGT
 TCGAGACAGTGGAAATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGGGTGGAATGTC
 TGATCGGCGAGCATCTGCACGCTGGGATGAGCACACTGTTTCTGGTGTACAGCA
 ACAAGTGCCAGACACCTCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCCGGGACTTTTCAGA
 TCACAGCCAGCGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCAAAAGTGGCCAGACTGCACT
 15 ACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGG
 TGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGAC
 AGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGG
 CAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGCAATAGCACCGGCACCCTGATGGTGTCTT
 CGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCCCCATCATT
 20 GCCCGGTACATCCGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCCGGTCCACCCTGAGA
 ATGGAAGTATGGGCTGCGACCTGAACTCCTGCAGCATGCCCTGGGGATGGAA
 AGCAAGGCCATCTCCGACGCCAGATCACCGCCTCCAGCTACTTCACCAACATGT
 TCGCCACCTGGTCCCCATCCAAGGCCCGGCTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAATG
 CTTGGAGGCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAATGGCTGCAGGTGGACTTCCAGA
 25 AAACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACCCAGGGCGTGAAGTCTCTGCTGACCT
 CTATGTACGTGAAAGAGTTCTGATCTCCAGCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGA
 CCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTTCAGGGGAACCAGGACTCCTT
 CACCCCCGTCGTGAATAGCCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGAT
 CCACCCTCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCTCTGCGGATGGAAGTGTGGGATG
 30 CGAGGCCCAGGACCTGTACTGACAACTAGTAATAAAAGATCAGAGCTGTAGAGAT
 CTGTGTGTTGTTTTTGTGTGCGGCCGGTACCCAGGAACCCCTAGTGATGGAGT
 TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
 TCGCCCCAGCGCCCGGGCTTTGGTTCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
 AGAGAGGGAGTGGCCGGAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
 35 TGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
 GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTC
 ACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC
 CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTGATCTCATA
 CTAGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCGTCGGCCCCGAGATGCGCCGC
 40 GTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGTT
 TGCGCATTACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCTCCAATTCTTGGAGTGGTGA
 ATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCCTGCTTCATCCCCGTGGCCCGTTGCTCGCGTTT
 GCTGGCGGTGTCCCCGGAAGAAATATATTTGCATGTCTTTAGTTCTATGATGACAC
 AAACCCCGCCCAGCGTCTTGTCAATTGGCGAATTCCGGCTGTGGAATGTGTGTCAG
 45 TTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
 AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAA
 CTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATG
 GCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCT
 50 ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT
 GCATGCCTGCAGGTGCGCCGCCACGACCGGTGCCGCCACCATCCCCTGACCCA
 CGCCCCCTGACCCCTCACAAGGAGACGACCTTCATGACCGAGTACAAGCCACG
 GTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCCGGGCCGTACGCACCCTCGCCGC

CGCGTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGACCCGGACCGCCACA
TCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGTCGGGCTCGACA
TCGGCAAGGTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCAC
GCCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTGCCGAGATCGGCCCCGCGCATG
5 GCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCCT
GGCGCCGCACCGGGCCCAAGGAGCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCT
CGCCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTG
GAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCTCCGCGCCCC
GCAACCTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTCGAGG
10 TGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGACGC
CCGCCCCACGACCCGCAGCGCCCGACCGAAAGGAGCGCACGACCCCATGGCTC
CGACCGAAGCCACCCGGGGCGGCCCCGCCGACCCCGCACCCGCCCCCGAGGC
CCACCGACTCTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG
CTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAT (SEQ ID NO:4)
15