

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula de virus adenoasociado (AAV) que comprende un genoma de AAV recombinante (rAAV) de gran tamaño, comprendiendo el método

a) cultivar una línea celular productora de AAV en condiciones para generar partículas rAAV, en el 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 de gran tamaño, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño es mayor de aproximadamente 4,7 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb;

b) proporcionar funciones auxiliares de AAV, opcionalmente en donde las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus, HSV o baculovirus; y

c) recoger las partículas rAAV que comprenden genomas de rAAV de gran tamaño, opcionalmente entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de la provisión de funciones auxiliares.

2. Un método para mejorar la expresión de un genoma de rAAV de gran tamaño, comprendiendo el método la producción de partículas de rAAV en una línea celular productora mediante provisión de funciones auxiliares de AAV a la línea celular, opcionalmente en donde las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus, HSV o baculovirus, en donde la línea de células productoras comprende

a) ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV, y

b) el genoma de rAAV de gran tamaño, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño es mayor que aproximadamente 4,7 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb; y que opcionalmente comprende además

c) recoger las partículas de rAAV que comprenden genomas de rAAV de gran tamaño, opcionalmente entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 96 horas después de la provisión de funciones auxiliares.

3. El método de la reivindicación 2, en el que

(i) 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 expresión del genoma de rAAV de gran tamaño de partículas rAAV producidas por transfección transitoria;

(ii) la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño a partir de partículas de rAAV producidas por una línea celular productora tienen cinética de expresión más rápida

comparada con la cinética de expresión del genoma rAAV de gran tamaño a partir de partículas de rAAV producidas por transfección transitoria; y/o

(iii) la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño a partir de partículas de rAAV producidas por una línea celular productora es aproximadamente 5% más rápida, aproximadamente 10% más rápida, aproximadamente 25% más rápida, aproximadamente 50% más rápida, aproximadamente 75% más rápida o aproximadamente 90% más rápida que la cinética de expresión del genoma de rAAV de gran tamaño a partir de partículas de rAAV producidas por transfección transitoria.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV de gran tamaño se mantienen de forma estable en la línea celular productora y/o se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgen heterólogo y una o más de:

(i) una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV, en donde las ITR son opcionalmente ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón;

(ii) un intrón, opcionalmente un intrón sintético; o

(iii) una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el transgén heterólogo

(i) codifica un producto transgénico terapéutico;

(ii) codifica el factor VIII, la distrofina, la disferlina o el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR);

(iii) es un transgén humano; y / o

(iv) está unido operativamente a un promotor, opcionalmente en el que el promotor es el promotor de transtiretina de ratón (mTTR).

7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que la partícula rAAV comprende una 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, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérica, AAV bovina o cápside de AAV de ratón rAAV2/HBoV1, opcionalmente en el que

(i) la ITR y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV, opcionalmente AAV2; o

(ii) la ITR y la cápside de las partículas de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV, opcionalmente ITRs de AAV2 y de la cápside AAVrh8R o cápside AAV8.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que la línea celular productora deriva de células de primate, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6,

opcionalmente la línea celular productora se adapta para crecimiento en suspensión.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, que comprende además purificación de las partículas rAAV, opcionalmente en el que la purificación comprende una o más etapas de cromatografía.

10. Una composición que comprende partículas rAAV en la 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 % o al menos aproximadamente 70 % de la partícula rAAV encapsida un genoma de rAAV de gran tamaño mayor de aproximadamente 4,7 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgén heterólogo y uno o más de:

(i) una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV, o dos ITR, en donde las ITR son opcionalmente ITRs de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón;

(ii) un intrón, opcionalmente un intrón sintético; o

(iii) comprende una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que el transgén heterólogo

(i) codifica un producto transgénico terapéutico;

(ii) codifica el factor VIII, la distrofina, la disferlina o el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR);

(iii) es un transgén humano; y/o

(iv) está unido operativamente a un promotor, opcionalmente en el que el promotor es el promotor de transtiretina de ratón (mTTR).

13. La composición de la reivindicación 11 o 12, en la que la partícula rAAV comprende una 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, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino o cápside de AAV de ratón rAAV2/HBoV1, opcionalmente en donde

(i) la ITR y la cápside de la partícula rAAV derivan del mismo serotipo de AAV, opcionalmente AAV2; o

(ii) la ITR y la cápside de las partículas rAAV derivan de diferentes serotipos de AAV,

opcionalmente ITR de AAV2 y cápside de AAVrh8R o cápside de AAV8.

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 13, en la que las partículas rAAV se producen en una línea celular productora, opcionalmente en la que

(i) el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV de gran tamaño se mantienen de forma estable en la línea celular productora, opcionalmente 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 línea celular productora;

(ii) la que la línea celular productora deriva de células de primate, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6;

(iii) en la que la línea celular productora está adaptada para crecimiento en suspensión;

(iv) las partículas rAAV se producen proporcionando funciones auxiliares de AAV a la línea celular productora, opcionalmente en donde las funciones auxiliares de AAV se proporcionan por adenovirus, VHS o baculovirus.

15. Una línea celular para producir una partícula de virus adenoasociado (AAV) que comprende un genoma de AAV recombinante de gran tamaño, comprendiendo la línea celular

a) ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV, y

b) un genoma de rAAV de gran tamaño, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño es mayor de aproximadamente 4,7 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb, o aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb, y opcionalmente en la que

(i) el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV de gran tamaño se mantienen de forma estable en la línea celular; opcionalmente el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV de gran tamaño se integra de manera estable en el genoma de la línea celular;

(ii) la línea celular se deriva de células de primates, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6; y/o

(iii) la línea celular está adaptada para el crecimiento en suspensión.

16. La línea celular de la reivindicación 15, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgen heterólogo y una o más de:

(i) una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV, o dos ITR, en donde las ITR son opcionalmente ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón;

(ii) un intrón, opcionalmente un intrón sintético; o

(iii) una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

17 La línea celular de la reivindicación 16, en la que el transgén heterólogo

(i) codifica un producto transgénico terapéutico;

(ii) codifica Factor VIII, distrofina, disferlina o regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR);

(iii) es un transgén humano; y/o

(iv) está unido operativamente con un promotor, opcionalmente en la que el promotor es el promotor de transtiretina de ratón (mTTR).

18. La línea celular de la reivindicación 16 o 17, en la que la partícula rAAV comprende una 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, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino o cápside de AAV de ratón rAAV2/HBoV1, opcionalmente en donde

(i) las ITR y la cápside de la partícula rAAV derivan del mismo serotipo de AAV; opcionalmente de AAV2; o

(ii) las ITR y la cápside de las partículas rAAV derivan de diferentes serotipos de AAV, opcionalmente ITR de AAV2 y cápside de AAVrh8R o cápside de AAV8.

19. Una partícula de virus adenoasociado (AAV) que comprende un genoma de rAAV de gran tamaño encapsidado por una cápside de AAV, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño es mayor de aproximadamente 4,7 kb, opcionalmente entre aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9,4 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 5 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 6 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 7 kb, aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 8 kb o aproximadamente 4,7 kb y aproximadamente 9 kb, aproximadamente 4,7 kb y 6,7 kb o entre aproximadamente 5,2 kb y aproximadamente 8,7 kb.

20. La partícula AAV de la reivindicación 19, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgen heterólogo y una o más de:

(i) una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV, o dos ITR, en donde las ITR son opcionalmente ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón;

(ii) un intrón, opcionalmente un intrón sintético; o

(iii) una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal de poliadenilación sintética o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

21. La partícula AAV de la reivindicación 20, en la que el transgén heterólogo

(i) codifica un producto transgénico terapéutico;

(ii) codifica Factor VIII, distrofina, disferlina o regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR);

(iii) es un transgén humano;

(iv) está unido operativamente con un promotor, opcionalmente en donde el promotor es el promotor de transtiretina de ratón (mTTR).

22. La partícula AAV de la reivindicación 20 o 21, en la que la partícula rAAV comprende una 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, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino o cápside de AAV de ratón rAAV2/HBoV1; opcionalmente en donde

(i) las ITR y la cápside de la partícula rAAV derivan del mismo serotipo de AAV, opcionalmente AAV2; o

(ii) las ITR y la cápside de las partículas rAAV derivan de diferentes serotipos de AAV, opcionalmente ITR de AAV2 y cápside de AAVrh8R o cápside de AAV8.

23. La partícula de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22. en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende de 5' a 3'

(i) 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; o

(ii) una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano, una secuencia de poliadenilación sintética de hormona del crecimiento bovina y una ITR de AAV2;

y opcionalmente en donde el FVIII comprende una supresión de todo o una parte del dominio B.

24. Un vector de rAAV que comprende un genoma de rAAV de gran tamaño, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor de a mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano, una secuencia de poliadenilación sintética y una ITR de AAV2; opcionalmente la secuencia de poliadenilación sintética es una secuencia de poliadenilación sintética de hormona del crecimiento bovina, y/o el FVIII comprende una supresión de todo o una parte del dominio B.

25. Un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo, opcionalmente un ser humano, que comprende administrar una partícula AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño, opcionalmente la partícula de AAV es la partícula de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 160-164, en el que el genoma de AAV de gran tamaño comprende un transgén adecuado para tratar la enfermedad o el trastorno, opcionalmente en donde

(i) la enfermedad o el trastorno es hemofilia A y la partícula de AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño codifica un transgén de Factor VIII

(ii) la enfermedad o el trastorno es distrofia muscular y la partícula de AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño codifica un transgén de distrofina

(iii) la enfermedad o el trastorno es disferlinopatía y la partícula de AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño codifica un transgén de disferlina

(iv) la enfermedad o el trastorno es fibrosis quística y la partícula de AAV que comprende un genoma de AAV de gran tamaño codifica un transgén de CFTR.