

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 4,7 kb;
 - b) proporcionar funciones auxiliares de AAV; y
 - c) recoger las partículas rAAV que comprenden genomas de rAAV de gran tamaño.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño es de entre 4,7 kb y 9,4 kb.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus, HSV o baculovirus.
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, el ácido nucleico que codifica el genoma de rAAV de gran tamaño, o el ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y el ácido nucleico que codifica el genoma de rAAV de gran tamaño se mantienen de forma estable en la línea celular productora, se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora, o se mantienen de forma estable en la línea celular productora y 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 dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV;
 - (ii) un intrón; o
 - (iii) una señal de poliadenilación.
6. El método de la reivindicación 5 en donde la una o dos ITRs son 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.
7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el transgén heterólogo codifica el Factor VIII, la distrofina, la disferlina o el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que el transgén heterólogo es un transgén humano, está unido operativamente a un promotor, o es un transgén

humano y está unido operativamente a un promotor.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 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.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10 o la reivindicación 13, en donde la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside AAV8.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la línea celular productora se deriva de células de primate, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además purificación de las partículas rAAV.

17. Una composición que comprende partículas rAAV en la que al menos 15 % de la partícula rAAV encapsida un genoma de rAAV de gran tamaño mayor de 4,7 kb.

18. La composición de la reivindicación 17, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgén heterólogo y uno o más de:

- (i) una o dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV;
- (ii) un intrón;
- (iii) comprende una señal de poliadenilación.

19. La composición de la reivindicación 18, en la que las ITRs son 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.

20. La composición de la reivindicación 18 o 19, en la que el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico.

21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en la que el

transgén heterólogo codifica el Factor VIII, la distrofina, la disferlina o el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en la que el transgén heterólogo es un transgén humano, está unido operativamente a un promotor, o es un transgén humano y está unido operativamente a un promotor.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 17-22, 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.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en la que la ITR y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

25. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 18-24, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

26. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

27. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23 o la reivindicación 26, en la que la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside AAV8.

28. 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 4,7 kb.

29. La línea celular de la reivindicación 28, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño esta entre 4.7 kb y 9.4 kb.

30. La línea celular de la reivindicación 28 o 29, en la que el ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV, el ácido nucleico que codifica el genoma de rAAV de gran tamaño, o el ácido nucleico que codifica genes rep y cap de AAV y el ácido nucleico que codifica el genoma de rAAV de gran tamaño se mantienen de forma estable en la línea celular productora, se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora, o se mantienen de forma estable en la línea celular productora y se integran de forma estable en el genoma de la línea celular productora.

31. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 28-30, en la que la línea celular se deriva de células de primate, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6;

la línea celular está adaptada para el crecimiento en suspensión; o la línea celular se deriva de células de primate, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6 y la línea celular está adaptada para el crecimiento en suspensión.

32. La línea celular de la reivindicación 28-31, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgen heterólogo y una o más de:

- (i) una o dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV;
- (ii) un intrón; o
- (iii) una señal de poliadenilación.

33. La línea celular de la reivindicación 32, en la que las ITRs son 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.

34. La línea celular de las reivindicaciones 32 o 33, en la que el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico.

35. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 32-34, en la que el transgén heterólogo codifica el Factor VIII, la distrofina, la disferlina o el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

36. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en la que el transgén heterólogo es un transgén humano, está unido operativamente a un promotor, o es un transgén humano y está unido operativamente a un promotor.

37. La línea celular de la reivindicación 28-36, 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.

38. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 32-37, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

39. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 32-38, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

40. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 32-37, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

41. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 32-37 o la reivindicación 40, en donde la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside AAV8.

42. 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 4,7 kb.

43. La partícula AAV de la reivindicación 42, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño es de entre 4,7 kb y 9,4 kb.

44. La partícula AAV de las reivindicaciones 42 o 43, en la que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgen heterólogo y una o más de:

- (i) una o dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV;
- (ii) un intrón; o
- (iii) una señal de poliadenilación.

45. La partícula AAV de la reivindicación 44, en la que la una o dos ITRs son 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.

46. La partícula AAV de las reivindicaciones 44 o 45, en la que el transgén heterólogo codifica un producto transgénico terapéutico.

47. La partícula AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en la que el transgén heterólogo codifica el Factor VIII, la distrofina, la disferlina o el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

48. La partícula AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en la que el transgén heterólogo es un transgén humano, está unido operativamente a un promotor, o es un transgén humano y está unido operativamente a un promotor.

49. La partícula AAV de la reivindicación 42-48, 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.

50. La partícula AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 44-49, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

51. La partícula AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 44-50, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

52. La partícula AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 44-49, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

53. La partícula AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 44-49 o la reivindicación 52, en la que la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside

AAV8.

54. La partícula de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 42-49, 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;

(ii) una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano que comprende una delección del dominio B, una secuencia de poliadenilación sintética, y una ITR de AAV2;

(iii) 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; o

(iv) una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano que comprende una delección del dominio B, una secuencia de poliadenilación sintética de hormona del crecimiento bovina, y una ITR de AAV2.

55. 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'

(i) 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;

(ii) una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano que comprende una delección del dominio B, una secuencia de poliadenilación sintética, y una ITR de AAV2;

(iii) 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; o

(iv) una ITR de AAV2, un promotor de mTTR, un intrón sintético, un transgén que codifica FVIII humano que comprende una delección del dominio B, una secuencia de poliadenilación sintética de hormona del crecimiento bovina, y una ITR de AAV2.