

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 es 5,4kb - 6,7kb;
 - b) proporcionar funciones auxiliares de AAV por adenovirus, HSV o baculovirus; y
 - c) recoger las partículas rAAV que comprenden genomas de rAAV de gran tamaño, en donde 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.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el genoma de rAAV d es 5,4 kb.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el genoma de rAAV de gran tamaño comprende un transgén 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.
4. El método de la reivindicación 3, 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.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que el transgén heterólogo codifica un péptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, 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).
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, 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.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 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.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8 o la reivindicación 11, en donde la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside AAV8.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la línea celular productora se deriva de células de primate, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además purificación de las partículas rAAV.

15. Una composición que comprende partículas rAAV en la que al menos 45% de la partícula rAAV encapsida un genoma de rAAV de gran tamaño, en el que el tamaño del genoma de rAAV es de 5,4 kb - 6,7kb.

16. La composición de la reivindicación 15, 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.

17. La composición de la reivindicación 16, 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.

18. La composición de la reivindicación 16 o 17, en la que el transgén heterólogo codifica un péptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico.

19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, 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).

20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, 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.

21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15-20, 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.

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15-21, en la que la ITR y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15-22, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15-21, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

25. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15-21 o la reivindicación 24, en la que la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside AAV8.

26. 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 es 5,4 kb – 6,7kb, en donde 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;

y en donde la línea celular productora se deriva de células de primates, células HeLa, células 293, células A549 o células Perc.6.

27. La línea celular de la reivindicación 26, en la que el genoma de rAAV es 5,4 kb.

28. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 26-27, en la que la línea celular está adaptada para el crecimiento en suspensión.

29. La línea celular de la reivindicación 26-28, 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.

30. La línea celular de la reivindicación 29, 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.

31. La línea celular de las reivindicaciones 29 o 30, en la que el transgén heterólogo codifica un péptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico.

32. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 29-31, 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).

33. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 29-32, 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.

34. La línea celular de la reivindicación 26-33, 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.

35. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en la que la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV.

36. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 29-35, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de AAV2.

37. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde la una o dos ITRs y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV.

38. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones 29-34 o la reivindicación 37, en donde la una o dos ITRs son ITRs de AAV2 y la cápside es una cápside AAVrh8R o cápside AAV8.