

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de un vector viral AAV, que comprende:
 - a. cultivar células adherentes;
 - 5 b. transfectar las células adherentes con uno o más plásmidos para permitir la producción del vector viral AAV;
 - c. lisar las células adherentes para aislar el vector viral AAV;
 - d. acidificar y clarificar el lisado celular de (c);
 - 10 e. purificar el producto de (d) utilizando cromatografía de intercambio catiónico (CEX);
 - f. filtrar el producto de (e) utilizando filtración de flujo tangencial (FFT);
 - g. ultracentrifugar el producto de (f) en un tampón de cloruro de cesio (CsCl); y
 - h. recolectar el vector viral AAV del producto de (g).
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el AAV es AAV9.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el AAV es auto complementario (scAAV).
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las células adherentes son células HEK293.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en donde el paso (a) comprende sembrar las células en un biorreactor a gran escala que puede proporcionar la circulación continua de medios de cultivo celular.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la densidad de siembra es de aproximadamente 8,000-12,000 células/cm².
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el paso de transfección (b) comprende poner en contacto la célula adherente con un plásmido auxiliar de adenovirus (pHELP), y un plásmido que codifica los genes AAV rep y cap.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el gen de AAV rep es rep2 y el gen de AAV cap es cap9.

- 5 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el paso de transfección (b) comprende poner en contacto las células adherentes con un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), un polinucleótido que codifica MeCP2 o un polinucleótido que codifica un ARNsh de SOD1.
- 10 10. El método de la reivindicación 9, en donde el plásmido que comprende el polinucleótido que codifica la proteína SMN1 comprende una ITR de AAV2 modificada, un promotor de beta-actina (CB) de pollo, un potenciador inmediato/temprano de citomegalovirus (CMV), un intrón tardío de 16s del SV40 modificado, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH), y una ITR de AAV2.
11. El método de la reivindicación 9 o 10, en donde el polinucleótido que codifica SMN codifica la proteína SMN de la SEQ ID NO: 2.
- 15 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el vector viral AAV comprende la SEQ ID NO: 1.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paso de transfección comprende poner en contacto las células adherentes con el agente de transfección polietilenimina (PEI).
- 20 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el paso de transfección comprende poner en contacto las células adherentes con un medio de transfección que no contiene suero, calcio, o glutamina.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el paso de lisado comprende un tampón de lisis suplementado con Benzonase y Tween.
- 25 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además congelar el lisado celular del paso (c) antes del paso de acidificación de (d).
17. Un método de purificación de un vector viral AAV de un lisado de cultivo celular, que comprende los pasos de:
- 30 a. acidificar y clarificar el lisado celular;
- b. purificar el producto de (a) utilizando cromatografía de intercambio catiónico (CEX);

- c. filtrar el producto de (b) a través de una filtración de flujo tangencial;
 - d. ultracentrifugar el producto de (c) usando 2-4 M de tampón de cloruro de cesio (CsCl);
 - e. recolectar los vectores virales de AAV del producto de (d); y
 - 5 f. filtrar el producto de (e) a través de una filtración de flujo tangencial.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el paso de acidificación comprende acidificar el lisado celular a un pH de aproximadamente 3,0 – 4,0.
- 10 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde la ultracentrifugación se ejecuta entre 40,000 – 50,000 rpm.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el tampón CsCl comprende aproximadamente 3 M CsCl, Tris, MgCl₂, y Poloxámero 188, y tiene un pH entre aproximadamente 7,5 y 8,5.
- 15 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en donde el lisado celular se incuba con Tween antes del paso de acidificación.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 en donde el paso de clarificación comprende filtrar el lisado celular a través de un filtro de profundidad.
- 20 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la CEX comprende una resina de sulfonilo.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde por lo menos un paso de FFT comprende utilizar membranas de celulosa con un límite de peso molecular de aproximadamente 300 kDa de PM.
- 25 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde el número de cápsides virales vacías es inferior al 7%, inferior al 5%, inferior al 3% o inferior al 1% del total de cápsides luego de recolectar los vectores virales de AAV del lisado celular ultracentrifugado.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-25, en donde los vectores virales de AAV recolectados luego del segundo paso de FFT son almacenados en una

solución que comprende Tris, $MgCl_2$, NaCl, y Poloxámero 188, y el pH oscila entre aproximadamente pH 7,5 y 8,5.

- 5 27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-26, en donde los vectores virales de AAV recolectados luego de la segunda FFT contienen menos de aproximadamente 30 $\mu g/g$ o menos de aproximadamente 20 $\mu g/g$ de CsCl.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-27, en donde la concentración de vectores virales de AAV recolectados luego de la segunda FFT es mayor o igual a aproximadamente 3×10^{13} vg/ml.
- 10 29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde el rendimiento producido de AAV es superior a 5×10^{15} vg, o superior a 8×10^{15} vg o superior a 1×10^{16} vg por lote de fabricación.
- 15 30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en donde el vector de AAV comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), un polinucleótido que codifica MeCP2 o un polinucleótido que codifica un ARNsh de SOD1.
31. Una composición farmacéutica que comprende un vector viral AAV9 fabricado de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-30.
- 20 32. La composición farmacéutica de la reivindicación 31, que comprende por lo menos uno de los siguientes:
- 25 a. menos de aproximadamente 0,09 ng de Benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
b. menos de aproximadamente 30 $\mu g/g$ (ppm) de cesio,
c. aproximadamente 20-80 ppm de Poloxámero 188,
d. menos de aproximadamente 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
e. menos de aproximadamente $6,8 \times 10^5$ pg de ADN de plásmido residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
25 f. menos de aproximadamente $1,1 \times 10^5$ pg de ADNhc residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
g. menos de aproximadamente 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
h. pH de aproximadamente 7,7-8,3,
i. aproximadamente 390-430 mOsm/kg,
30 j. menos de aproximadamente 600 partículas de $\geq 25 \mu m$ de tamaño por envase,

- 5
- k. menos de aproximadamente 6000 partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño por envase,
 - l. aproximadamente $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genómico,
 - m. un título infeccioso de aproximadamente $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - n. un total de proteína de aproximadamente 100-300 μg por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - o. una potencia relativa de aproximadamente 70-130%, o
 - p. menos de aproximadamente 5% de cápsides vacías.
- 10 33. Una composición farmacéutica que comprende:
- a. entre $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas del vector viral AAV9/mL (vg/mL);
 - b. menos de aproximadamente 7 % de cápsides virales vacías;
 - c. menos de aproximadamente 100 ng/mL de proteína de la célula huésped por 1×10^{13} vg/mL;
 - d. menos de aproximadamente 5×10^6 pg/mL de ADN de la célula huésped residual por 1×10^{13} vg/mL;
- 15 y en donde por lo menos aproximadamente 80% de los $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas del vector viral AAV9/mL son funcionales.
- 20 34. La composición de la reivindicación 33, en donde el vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), un polinucleótido que codifica MeCP2 o un polinucleótido que codifica un ARNsh de SOD1.
- 25 35. La composición de la reivindicación 33 o 34, en donde el vector viral AAV9 comprende una ITR de AAV2 modificada, un promotor de beta-actina (CB) de pollo, un potenciador inmediato/temprano de citomegalovirus (CMV), un intrón tardío de 16s del SV40 modificado, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH), y una ITR de AAV2 sin modificar.
- 30 36. La composición de la reivindicación 34 o 37, en donde el polinucleótido codifica la proteína SMN de la SEQ ID NO: 2.
37. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 33 - 36, en donde el vector viral AAV9 comprende la SEQ ID NO: 1.

38. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 33-37, que comprende entre $1,7 - 2,3 \times 10^{13}$ AAV9 vg/mL.
39. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 33-38, en donde la composición es una formulación farmacéutica acuosa.
- 5 40. La composición de la reivindicación 39, en donde la formulación farmacéutica acuosa comprende un tampón Tris, $MgCl_2$, NaCl, y Poloxámero 188.
41. La composición de la reivindicación 39 o 40, en donde la formulación farmacéutica acuosa no comprende un conservante.
42. La composición de la reivindicación 40 o 41, en donde:
- 10 (i) la concentración de tampón Tris es de aproximadamente 10-30 nM;
(ii) el pH de la formulación oscila entre aproximadamente 7,7 y aproximadamente 8,3;
(iii) la concentración de $MgCl_2$ es de aproximadamente 0,5-1,5 mM;
(iv) la concentración de NaCl es de aproximadamente 100-300 mM;
- 15 (v) la formulación comprende aproximadamente 0,005% p/v de Poloxámero 188; o
(vi) la formulación farmacéutica acuosa tiene una osmolalidad de 390-430 mOsm/kg.
43. Un método de tratamiento de la atrofia muscular espinal tipo I (AME) en un paciente que lo necesita, que comprende administrar la composición de cualquiera de las reivindicaciones 34 -42 al paciente, en donde el paciente:
- 20 a. tiene nueve meses de vida o menos;
b. tiene un peso corporal de por lo menos aproximadamente 2,6 kg;
c. tiene mutaciones o deleciones nulas de SMN1 bialélicas; y
d. tiene por lo menos una copia funcional de SMN2.
- 25 44. El método de la reivindicación 43, en donde el vector viral se administra a una dosis de aproximadamente $1-2,5 \times 10^{14}$ vg/kg.
45. El método de la reivindicación 43 o 44, en donde el paciente tiene un peso corporal de no más de aproximadamente 8,5 kg.
- 30 46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 43-45, en donde el paciente no tiene una sustitución c.859G>C en el exón 7 de por lo menos una copia del gen de SMN2.

- 5 47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 43-46, en donde la composición se administra al paciente antes de los 6 meses de vida, o antes del inicio de uno o más síntomas de AME seleccionados entre hipotonía, retraso en las habilidades motoras, control deficiente de la cabeza, postura redonda del hombro e hipermovilidad de las articulaciones.
48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 43-47, en donde el vector viral se administra en aproximadamente 5-20 mL/kg, aproximadamente 10-20 mL/kg, o aproximadamente 5,5-6,5 mL/kg de solución salina tamponada con Tris.
- 10 49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 43-48, en donde la eficacia se determina usando la escala CHOP-INTEND.
- 15 50. El método de la reivindicación 43-49, que comprende administrar un volumen de dosis seleccionado del grupo que consiste en una dosis de 16,5 mL para un paciente que pesa 2,6-3,0 kg, una dosis de 19,3 mL para un paciente que pesa 3,1-3,5 kg, una dosis de 22,0 mL para un paciente que pesa 3,6 a 4,0 kg, una dosis de 24,8 mL para un paciente que pesa 4,1-4,5 kg, una dosis de 27,5 mL para un paciente que pesa 4,6-5,0 kg, una dosis de 30,3 mL para un paciente que pesa 5,1-5,5 kg, una dosis de 33,0 mL para un paciente que pesa 5,6-6,0 kg, una dosis de 35,8 mL para un paciente que pesa 6,1-6,5 kg, una dosis de 38,5 mL para un paciente que pesa 6,6-7,0 kg, una dosis de 41,3 mL para un paciente que pesa 7,1-7,5 kg, una dosis de 44,0 mL para un paciente que pesa 7,6-8,0 kg, y una dosis de 46,8 mL para un paciente que pesa 8,1-8,5 kg.
- 20 51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 43-50, en donde la composición se administra por infusión intravenosa o intratecal a un paciente que lo necesita.
- 25 52. El método de la reivindicación 51, en donde el vector viral se infunde durante aproximadamente 45 – 75 minutos.
- 30 53. Un kit que comprende viales que contienen aproximadamente 5,5 mL o aproximadamente 8,3 mL de un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), y que se formula a una concentración de aproximadamente $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL en 20 mM Tris, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl, 0,005% p/v de Poloxámero 188 a un pH de 7,7-8,3.