

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de un vector viral AAV de un lisado de cultivo celular, que comprende los pasos de:
 - 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) utilizando filtración de flujo tangencial (FFT);
 - d. ultracentrifugar el producto de (c) utilizando 2 – 4 M de un tampón de cloruro de cesio (CsCl); y
 - e. recolectar el vector viral AAV del producto de (d).
2. El método de la reivindicación 1, que comprende antes del paso (a):
 - i. cultivar células adherentes;
 - ii. transfectar las células adherentes con plásmido(s) para permitir la producción del vector viral AAV; y
 - iii. lisar las células adherentes para producir el lisado celular.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende filtrar el producto de (e) utilizando una segunda filtración de flujo tangencial.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el AAV es AAV9.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el AAV es auto complementario (scAAV).
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde las células adherentes son células HEK293.
7. El método de la reivindicación 6, donde el paso (i) comprende sembrar las células en un biorreactor a gran escala que puede proporcionar la circulación continua de medios de cultivo celular.
8. El método de la reivindicación 7, donde la densidad de siembra es de 8,000-12,000 células/cm².

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde el paso de transfección (ii) comprende poner en contacto las células adherentes con un plásmido auxiliar de adenovirus (pHELP), y un plásmido que codifica los genes AAV rep y cap.
- 5 10. El método de la reivindicación 9, donde el gen de AAV rep es rep2 y el gen de AAV cap es cap9.
- 10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, donde el paso de transfección (ii) 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.
- 15 12. El método de la reivindicación 11, 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.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, donde el polinucleótido codifica la proteína SMN de la SEQ ID NO: 2.
- 20 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el vector viral AAV comprende la SEQ ID NO: 1.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-14, donde el paso de transfección comprende poner en contacto las células adherentes con el agente de transfección polietilenimina (PEI).
- 25 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-15, 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.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en donde el paso de lisado comprende un tampón de lisis suplementado con una endonucleasa y un detergente.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que comprende además congelar el lisado celular antes del paso de acidificación.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el paso de acidificación comprende acidificar el lisado celular a un pH de 3,0 – 4,0.
- 5 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde la ultracentrifugación se ejecuta entre 40,000 – 50,000 rpm.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, donde el tampón CsCl comprende 3 M CsCl, Tris, MgCl₂, y Poloxámero 188, y tiene un pH entre 7,5 y 8,5.
- 10 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 donde el lisado celular se incuba con un detergente antes del paso de acidificación.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22 donde el paso de clarificación comprende filtrar el lisado celular a través de un filtro de profundidad.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde la CEX comprende una resina de sulfonilo.
- 15 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde por lo menos un paso de FFT comprende utilizar membranas de celulosa con un límite de peso molecular de 300 kDa de PM.
- 20 26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-25, donde los vectores virales de AAV recolectados luego del segundo paso de FFT son almacenados en una solución que comprende Tris, MgCl₂, NaCl, y Poloxámero 188, y el pH oscila entre pH 7,5 y 8,5.
- 25 27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, 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.
28. Una composición farmacéutica que comprende un vector viral AAV9 fabricado de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, donde la composición farmacéutica comprende menos de $2,0 \times 10^5$ pg/mL ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, que comprende por lo menos uno de los siguientes:
- a. menos de 0,09 ng de endonucleasa por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - b. menos de 30 $\mu\text{g/g}$ (ppm) de cesio,
 - 5 c. 20-80 ppm de Poloxámero 188,
 - d. menos de 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - e. menos de $6,8 \times 10^5$ pg de ADN de plásmido residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - f. menos de $1,1 \times 10^5$ pg de ADNhc residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - 10 g. menos de 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - h. pH de 7,7-8,3,
 - i. 390-430 mOsm/kg,
 - j. menos de 600 partículas de $\geq 25 \mu\text{m}$ de tamaño por envase,
 - k. menos de 6000 partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño por envase,
 - 15 l. $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genómico,
 - m. un título infeccioso de $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - n. un total de proteína de 100-300 μg por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
 - o. una potencia relativa de 70-130%, o
 - p. menos de 5% de cápsides vacías.
30. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, que comprende:
- 20 a. entre $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas del vector viral AAV9/mL (vg/mL);
 - b. menos de 7 % de cápsides virales vacías;
 - c. menos de 100 ng/mL de proteínas de la célula huésped por 1×10^{13} vg/mL; y
 - d. menos de $2,0 \times 10^5$ de ADN residual de la célula huésped por 1×10^{13} vg/mL;
 - 25 donde por lo menos 80% de los $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas del vector viral AAV9/mL son funcionales, y
 - 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.
- 30 31. La composición de la reivindicación 30, 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.

32. La composición de la reivindicación 31, donde el polinucleótido codifica la proteína SMN de la SEQ ID NO: 2.
33. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 30-32, donde el vector viral AAV9 comprende la SEQ ID NO: 1.
- 5 34. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 30-33, que comprende entre $1,7 - 2,3 \times 10^{13}$ AAV9 vg/mL.
35. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 30-34, donde la composición es una formulación farmacéutica acuosa.
- 10 36. La composición de la reivindicación 35, donde la formulación farmacéutica acuosa comprende un tampón Tris, $MgCl_2$, NaCl, y Poloxámero 188.
37. La composición de la reivindicación 35 o 36, donde la formulación farmacéutica acuosa no comprende un conservante.
38. La composición de la reivindicación 36 o 37, donde:
- 15 (i) la concentración de tampón Tris es de 10-30 mM;
- (ii) el pH de la formulación es de 7,7 a 8,3;
- (iii) la concentración de $MgCl_2$ es de 0,5-1,5 mM;
- (iv) la concentración de NaCl es de 100-300 mM;
- (v) la formulación comprende 0,005% p/v de Poloxámero 188; o
- (vi) la formulación farmacéutica acuosa tiene una osmolalidad de 390-430 mOsm/kg.
- 20