

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una de la neurona motora de la supervivencia (SMN) 1 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 AAV9 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 AAV9; 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 AAV9 es auto complementario (scAAV).
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde las células adherentes son células HEK293.
6. El método de la reivindicación 5, 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.
7. El método de la reivindicación 6, donde la densidad de siembra es de 8,000-12,000 células/cm².

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, 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.
9. El método de la reivindicación 8, donde el gen de AAV rep es rep2.
- 5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, donde el paso de transfección (ii) comprende poner en contacto las células adherentes con un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína SMN.
- 10 11. El método de la reivindicación 10, 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.
- 15 12. El método de la reivindicación 10 o 11, donde la proteína SMN comprende la SEQ ID NO: 2.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el vector viral AAV9 comprende la SEQ ID NO: 1.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-13, donde el paso de transfección comprende poner en contacto las células adherentes con el agente de transfección polietilenimina (PEI).
- 20 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-14, 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.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-15, en donde el paso de lisado comprende un tampón de lisis suplementado con una endonucleasa y un detergente.
- 25 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende además congelar el lisado celular antes del paso de acidificación.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el paso de acidificación comprende acidificar el lisado celular a un pH de 3,0 – 4,0.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la ultracentrifugación se ejecuta entre 40,000 – 50,000 rpm.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde el tampón de cloruro de cesio (CsCl) utilizado en el paso d) comprende 3 M CsCl, Tris, MgCl₂, y Poloxámero 188, y tiene un pH entre 7,5 y 8,5.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 donde el lisado celular se incuba con un detergente antes del paso de acidificación.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 donde el paso de clarificación comprende filtrar el lisado celular a través de un filtro de profundidad.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde la CEX comprende una resina de sulfonilo.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde por lo menos un paso de FFT comprende utilizar membranas de celulosa con un límite de peso molecular de 300 kDa de PM.
25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-24, 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.