1. Pagalbinė plazmidė, apimanti bent vieną adeno asocijuoto viruso (AAV) rep geną, koduojantį bent vieną funkcionalų AAV Rep baltymą ir bent vieną pagalbinio viruso geną, ir kuri neapima cap geno, koduojančio funkcionalų Cap baltymų rinkinį.

2. Dviejų plazmidžių sistema, apimanti pagalbinę plazmidę pagal 1 punktą ir vektorinę plazmidę.

3. Dviejų plazmidžių sistema pagal 2 punktą, kur:

(i) vektoriaus plazmidė apima:

(a) AAV cap geną, koduojantį bent vieną funkcionalų AAV Cap baltymą; arba

(b) bent vieną AAV cap geno promotorių, klonavimo vietą, funkcionaliai susietą su AAV cap geno promotoriumi, ir raiškos kasetę, bent vienoje pusėje supamą invertuoto galinio pasikartojimo (ITR);

kur vektorinė plazmidė neapima rep geno, koduojančio funkcionalų Rep baltymą, o raiškos kasetė apima transgeną, funkcionaliai susietą su bent vienu reguliatoriniu kontrolės elementu; ir (arba)

(ii) pagalbinės plazmidės ir vektorinės plazmidės santykis yra tarp 1:1 ir 1:4.

4. Dviejų plazmidžių sistema arba pagalbinė plazmidė pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur bent vienas AAV rep genas apima geną, koduojantį funkcionalų Rep 52 baltymą, bent vieną geną, koduojantį funkcionalų Rep 40 baltymą, ir geną, koduojantį funkcionalų Rep 68 baltymą.

5. Dviejų plazmidžių sistema arba pagalbinė plazmidė pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur:

(i) bent vienas AAV rep genas apima geną, koduojantį funkcionalų Rep 52 baltymą, o genas, koduojantis funkcionalų Rep 52 baltymą, apima nukleorūgščių seką, pasižyminčią bent 98% tapatumu viso ilgio sekai arba bent 1000 nukleotidų ilgio fragmentui, sudarytam iš SEQ ID Nr. 1 993-2186 nukleotidų, arba atitinkamai nukleotidų atkarpai kitame AAV serotipe; ir (arba)

(ii)

(a) bent vienas AAV rep genas apima geną, koduojantį funkcionalų Rep 40 baltymą, o genas, koduojantis funkcionalų Rep 40 baltymą, apima nukleorūgščių seką, pasižyminčią bent 98% tapatumu viso ilgio sekai arba bent jau 800 nukleotidų ilgio fragmentui, sudarytam iš nukleotidų atkarpos, atitinkančios SEQ ID Nr. 1 993-2252 nukleotidus, atėmus 1907-2227 nukleotidus, arba atitinkamoms nukleotidų atkarpoms kitame AAV serotipe; ir (arba)

(b) bent vienas AAV rep genas apima geną, koduojantį funkcionalų Rep 40 baltymą, o genas, koduojantis funkcionalų Rep 40 baltymą, apima nukleorūgščių seką, pasižyminčią bent 98% tapatumu viso ilgio sekai arba bent jau 1100 nukleotidų ilgio fragmentui, sudarytam iš SEQ ID Nr. 1 993-2252 nukleotidų arba atitinkamai nukleotidų atkarpai kitame AAV serotipe; ir (arba)

(iii) bent vienas AAV rep genas apima geną, koduojantį funkcionalų Rep 68 baltymą, o genas, koduojantis funkcionalų Rep 68 baltymą, apima nukleorūgščių seką, pasižyminčią bent 98% tapatumu viso ilgio sekai arba bent jau 1500 nukleotidų ilgio fragmentui, sudaytam iš nukleotidų atkarpos, atitinkančios SEQ ID Nr. 1 321-2252 nukleotidus, atėmus 1907-2227 nukleotidus, arba atitinkamoms nukleotidų atkarpoms kitame AAV serotipe.

6. Dviejų plazmidžių sistema arba pagalbinė plazmidė pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur:

(i) pagalbinė plazmidė neapima geno, koduojančio funkcionalų Rep 78 baltymą; ir (arba)

(ii) pagalbinė plazmidė neapima bent 1800 nuoseklios nukleotidų sekos, atitinkančios ekvivalentiško ilgio nuosekliai išsidėsčiusių nukleotidų atkarpą, kurią apima SEQ ID Nr. 1 321-2186 nukleotidai arba atitinkama kito AAV serotipo nukleotidų atkarpa; ir (arba)

(iii) bent vienas AAV rep genas neapima funkcionalaus vidinio p40 promotoriaus; ir (arba)

(iv) pagalbinė plazmidė neapima nuoseklios atkarpos, sudarytos iš išimtinai daugiau nei 60 nukleotidų cap geno sekos.

7. Dviejų plazmidžių sistema arba pagalbinė plazmidė pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur:

(i) pagalbinė plazmidė apima bent vieną pagalbinio viruso geną, o bent vienas pagalbinio viruso genas apima su virusu susijusią (VA) nukleorūgštį, E2A geną ir E4 geną; ir (arba)

(ii) pagalbinė plazmidė apima bent vieną pagalbinio viruso geną, o bent vienas pagalbinio viruso genas apima VA nukleorūgštį, E2A geną ir E4 geną, o E4 genas nėra išsidėstęs tarp VA nukleorūgšties ir E2A geno; ir (arba)

(iii) pagalbinė plazmidė apima bent vieną pagalbinio viruso geną, o pagalbinė plazmidė yra tarp 12000 bp ir 15000 bp ilgio; ir (arba)

(iv) pagalbinė plazmidė neapima bent 3000 nuoseklios nukleotidų sekos, sudarytos iš ekvivalentiško ilgio nuosekliai išsidėsčiusių nukleotidų atkarpos, kurią apima SEQ ID Nr. 2 194-3620 nukleotidai, arba atitinkama nukleotidų atkarpa kitame adenoviruso serotipe; ir (arba)

(v) pagalbinė plazmidė neapima bent 60 nuoseklios nukleotidų sekos, sudarytos iš iš ekvivalentiško ilgio nuosekliai išsidėsčiusių nukleotidų atkarpos, kurią apima SEQ ID Nr. 2 4032-4100 nukleotidai, arba atitinkama nukleotidų atkarpa kitame adenoviruso serotipe; ir (arba)

(vi) pagalbinė plazmidė neapima bent 350 nuoseklios nukleotidų sekos, sudarytos iš ekvivalentiško ilgio nuosekliai išsidėsčiusių nukleotidų atkarpos, kurią apima SEQ ID Nr. 1 4051-4413 nukleotidai, arba atitinkama nukleotidų atkarpa kitame AAV serotipe.

8. Dviejų plazmidžių sistema arba pagalbinė plazmidė pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur:

(i) pagalbinė plazmidė neapima bent 600 nuoseklios nukleotidų sekos, sudarytos iš ekvivalentiško ilgio nuosekliai išsidėsčiusių nukleotidų atkarpos, kurią apima SEQ ID Nr. 1 2301-2947 nukleotidai, arba atitinkama nukleotidų atkarpa kitame AAV serotipe; ir (arba)

(ii) pagalbinė plazmidė apima bent vieną pagalbinio viruso geną, o bent vienas pagalbinis viruso genas apima VA nukleorūgštį, E2A geną ir E4 geną, o VA nukleorūgštį, E2A geną ir E4 geną apima nuosekli atkarpa, sudaryta iš mažiau nei 10 000 nukleotidų; ir (arba)

(iii) pagalbinė plazmidė neapima bent 22 000 nuoseklios nukleotidų sekos, sudarytos iš ekvivalentiško ilgio nuosekliai išsidėsčiusių nukleotidų atkarpos, kurią apima SEQ ID Nr. 2 10619-32756 nukleotidai, arba atitinkama nukleotidų atkarpa kitame adenoviruso serotipe; ir (arba)

(iv) pagalbinė plazmidė ir (arba) vektorinė plazmidė neapima dirbtinai sukurtos Rep surišimo vietos.

9. Dviejų plazmidžių sistema arba pagalbinė plazmidė pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur pagalbinė plazmidė apima bent vieną pagalbinį viruso geną ir bent vienas pagalbinio viruso genas yra nuoseklioje plazmidės atkarpoje, pasižyminčioje bent 98% tapatumu. viso ilgio sekai arba sekos SEQ ID Nr. 4 bent 8000 nukleotidų ilgio fragmentui.

10. Dviejų plazmidžių sistema pagal bet kurį iš 2-9 punktų, kur:

(i) vektorinė plazmidė apima bent vieną AAV cap geno promotorių, kuris apima AAV p40 promotorių, p5 promotorių ir p19 promotorių; ir (arba)

(ii) vektorinė plazmidė neapima jokių būtinų transliacijos inicijacijos kodonų; ir (arba)

(iii) vektorinė plazmidė apima promotoriaus sritį, apimančią vieną ar daugiau promotorių, o promotoriaus srityje:

(a) nėra nukleotidų, atitinkančių SEQ ID Nr. 1 321-323 nukleotidus;

(b) nukleotidai, atitinkantys SEQ ID Nr. 1 766-768 nukleotidus, yra ne ATG;

(c) nėra nukleotidų, atitinkančių SEQ ID Nr. 1 955-957 nukleotidus;

(d) nėra nukleotidų, atitinkančių SEQ ID Nr. 1 993-995 nukleotidus; ir

(e) nėra nukleotidų, atitinkančių SEQ ID Nr. 1 1014-1016 nukleotidus; ir (arba)

(iv) vektorinė plazmidė apima trumpesnę nei 3000 nukleotidų ilgio grandinę.

11. Dviejų plazmidžių sistema pagal 10(iii)(b) punktą, kur nukleotidai, atitinkantys SEQ ID Nr. 1 766-768 nukleotidus, yra ATT.

12. Rekombinantinio AAV preparato gamybos būdas, apimantis:

(a) dviejų plazmidžių sistemos, pagalbinės plazmidės arba vektorinės plazmidės gavimą, kaip apibrėžta bet kuriame iš 1-11 punktų;

(b) ląstelės-šeimininkės transfekavimą dviejų plazmidžių sistema, pagalbine plazmide arba vektorine plazmide, kaip apibrėžta bet kuriame iš 1-11 punktų; ir

(c) ląstelės-šeimininkės kultivavimą sąlygomis, tinkamomis rekombinantinio AAV gamybai.

13. Būdas pagal 12 punktą:

(i) papildomai apimantis rekombinantinio AAV surinkimo etapą, siekiant gauti rekombinantinį AAV preparatą; ir (arba)

(ii) kur rekombinantinis AAV preparatas apima AAV (rcAAV) žemu lygiu gebantį replikuotis AAV (rcAAV); ir (arba)

(iii) kur išmatuotas rcAAV lygis yra mažesnis nei 1 rcAAV iš 107 rekombinantinio AAV, mažesnis nei 1 rcAAV iš 109 rekombinantinio AAV arba mažesnis nei 1 rcAAV iš 1010 rekombinantinio AAV; ir (arba)

(iv) kur rekombinantinis AAV preparatas apima žemą rcAAV lygį, o rcAAV lygis yra mažesnis už rcAAV lygį, gautą naudojant ekvivalentišką būdą, tik skirtingą tuo, kad vektorinė plazmidė apima tiek bent vieną AAV rep geną, tiek ir bent vieną AAV cap geną; ir (arba)

(v) apimantis pagalbinės plazmidės ir vektorinės plazmidės santykio parinkimo etapą, kur pagalbinės plazmidės ir vektorinės plazmidės santykis yra parinktas arba priderintas iki santykio, kuris leidžia naudotojui gauti norimą pilnos sudėties dalelių santykį lyginant su visomis, arba didelę arba norimą rekombinantinio AAV vektoriaus išeigą; ir (arba)

(vi) kur pagalbinės plazmidės santykis su vektorine plazmide yra parinktas arba sureguliuotas iki santykio, kuriuo pasiekiama maksimali rekombinantinio AAV išeiga su mažiausia tuščių dalelių išeiga, pasiekiamą esant tokiai maksimaliai rekombinantinio AAV išeigai; ir (arba)

(vii) kur norimas pilnos sudėties dalelių santykis lyginant su visomis, yra pilnos sudėties dalelių santykis lyginant su visomis, kuris yra mažiausiai 20% arba mažiausiai 30% santykio pilnos sudėties dalelių lyginant su visomis, gauto naudojant ekvivalentišką būdą, kur pagalbinės plazmidės santykis su vektorine plazmide yra 1,8:1; ir (arba)

(viii) papildomai apimantis rekombinantinio AAV gryninimo etapą.