

MEDIOS Y MÉTODO PARA PREPARAR VECTORES VIRALES Y USOS DE LOS MISMOS

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado en formato ASCII vía EFS-Web y queda incorporado por completo a la presente como referencia. Dicha copia en ASCII, creada el 31 de Octubre de 2018 se denomina AVEX-003001WO_ST25.txt y tiene 14,639 bytes de tamaño.

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la Solicitud de Patente Estadounidense Provisional Número 62/583,035, presentada el 8 de Noviembre de 2017, la cual se incorpora por completo a la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para preparar y purificar partículas virales y composiciones y usos que comprenden las mismas.

ANTECEDENTES

El virus adenoasociado (AAV) es un miembro de la familia parvoviridae. El genoma del AAV está compuesto por una molécula de ADN lineal monocatenaria que contiene aproximadamente 4,7 kilobases (kb) y consta de dos marcos de lectura abiertos principales que codifican las proteínas no estructurales Rep (replicación) y estructurales Cap (cápside). Flanqueando las regiones codificantes del AAV hay dos secuencias de repetición terminal invertida (ITR) que actúan en cis, de aproximadamente 145 nucleótidos de longitud, con secuencias palindrómicas interrumpidas que pueden plegarse en estructuras en horquilla que funcionan como cebadores durante el inicio de la replicación del ADN. Además de su papel en la replicación del ADN, se ha demostrado que las secuencias ITR son necesarias para la integración viral, el rescate del genoma del huésped y la encapsidación del ácido nucleico viral en viriones maduros (Muzyczka, (1992) Curr. Top. Micro. Immunol. 158:97-129).

Existen múltiples serotipos de AAV y ofrecen un variado tropismo tisular. Los serotipos conocidos incluyen, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10 y AAV11. AAV9 está descrito en la Patente Estadounidense Número 7,198,951 y en Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004), que se incorporan por completo a la presente como referencia. Los avances en el suministro de AAV6 y AAV8 han hecho posible la transducción por estos serotipos del músculo esquelético y cardíaco luego de inyecciones intravenosas o intraperitoneales sistémicas simples. Véase Pacak et al., Circ. Res., 99(4): 3-9 (2006) y Wang et al., Nature Biotech. 23(3): 321-8 (2005). Sin embargo, el uso de AAV para dirigirse a ciertos tipos de células dentro del sistema nervioso central ha requerido una inyección quirúrgica intraparenquimatosa. Véase Kaplitt et al., “Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial.” *Lancet*, 369:2097-2105; Marks et al., “Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomized, controlled trial.” *Lancet Neurol* 9:1164-1172; y Worgall et al., “Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA.” *Hum Gene Ther*, 19(5):463-74 .

La secuencia de nucleótidos del genoma del serotipo 2 (AAV2) de AAV se ha presentado en Srivastava et al., J Virol, 45: 555-564 (1983) corregida por Ruffing et al., J Gen Virol, 75: 3385-3392 (1994). Las secuencias que actúan en cis que dirigen la replicación (rep) del ADN viral, la encapsidación/empaquetamiento y la integración del cromosoma de la célula huésped están contenidas dentro de las ITR. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones de mapa relativas) dirigen la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), junto con el empalme diferencial del intrón AAV único (en los nucleótidos 2107 y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son en última instancia responsables de replicar el genoma viral. El gen cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. El empalme alternativo y los sitios de inicio de traducción no de consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación de consenso se encuentra en la posición del mapa 95 del genoma del AAV. El ciclo vital y la genética del AAV están descritos en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

Los vectores derivados del AAV son particularmente atractivos para suministrar material genético porque (i) pueden infectar (transducir) una amplia variedad de tipos de células que no se dividen y que se dividen, incluidas las fibras musculares y las neuronas; (ii) están desprovistos de los genes

- estructurales del virus, eliminando así las respuestas de la célula huésped natural a la infección por el virus, por ejemplo, respuestas mediadas por interferón; (iii) los virus de tipo salvaje nunca se han asociado con ninguna patología en humanos; (iv) contrariamente a los AAV de tipo salvaje, que son capaces de integrarse al genoma de la célula huésped, los vectores de AAV deficientes en replicación generalmente persisten como episomas, limitando así el riesgo de mutagénesis insercional o la activación de oncogenes; y (v) contrariamente a los otros sistemas de vectores, los vectores AAV no desencadenan una respuesta inmune significativa (véase ii), por lo tanto, posibilitan una expresión a largo plazo de los transgenes terapéuticos (siempre que sus productos génicos no sean rechazados).
- Los vectores adenoasociados autocomplementarios (scAAV) son vectores virales diseñados a partir del virus adenoasociado (AAV) natural para su uso en terapia génica. Los ScAAV se denominan "autocomplementarios" porque la región de codificación se ha diseñado para formar una plantilla de ADN de doble cadena intramolecular. Una etapa limitante de la velocidad del ciclo de vida del genoma AAV estándar involucra a la síntesis de la segunda cadena ya que el genoma del AAV típico es una plantilla de ADN monocatenaria. Sin embargo, este no es el caso de los genomas scAAV. Tras la infección, en lugar de esperar la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias del scAAV se asociarán para formar una unidad de ADN de cadena doble (ADNs) que estará lista para la replicación y transcripción inmediata.
- Sigue existiendo la necesidad de desarrollar un método escalable para fabricar y purificar un producto farmacéutico de AAV con, por ejemplo, pocas cápsides vacías, poca proteína de la célula huésped y/o poco ADN contaminante, reteniendo a la vez una alta potencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención proporciona un método para preparar preparaciones de partículas virales purificadas, incluyendo preparaciones de partículas de AAV.

- En algunas formas de realización, la presente invención provee 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, y (d) menos de aproximadamente 5×10^6 pg/mL de ADN de la célula huésped residual por 1×10^{13} vg/mL, y en donde por lo menos aproximadamente 80% de los $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas del vector viral AAV9/mL son funcionales. En una forma de

realización, el vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN). En una forma de realización, el vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de unión a metil-CpG 2 (MECP2). En una forma de realización, el vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica un ARN corto en horquilla (ARNsh) dirigido a la superóxido dismutasa 1 (SOD1). En una forma de realización, 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.

10

La presente invención provee una formulación farmacéutica. En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica acuosa comprende (a) un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), (b) un tampón Tris, (c) cloruro de magnesio, (d) cloruro de sodio, y (e) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188), en donde la composición farmacéutica no comprende un conservante. En una forma de realización de la formulación, el vector viral AAV9 además 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. En una forma de realización de la formulación, la concentración de tampón Tris es de aproximadamente 10-30 mM, por ejemplo, aproximadamente 20 mM. En una forma de realización, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,7 a aproximadamente 8,3, por ejemplo, aproximadamente pH 8,0 (por ejemplo, medido de acuerdo con USP <791> (se incorpora por completo a la presente como referencia)). En una forma de realización de la formulación, la concentración de cloruro de magnesio es de aproximadamente 0,5-1,5 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM. En una forma de realización de la formulación, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 100-300 mM, por ejemplo, aproximadamente 200 mM. En una forma de realización, la formulación comprende aproximadamente 0,005% p/v de poloxámero 188.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar la atrofia muscular espinal tipo I (AME) en un paciente que lo necesita, que comprende administrar un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de SMN (por ejemplo, una composición o formulación de acuerdo con la presente) al paciente mediante una vía intratecal o intravenosa, en donde el paciente tiene (a) nueve meses 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. En una forma de realización, 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
5 señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH), y una ITR de AAV2 sin modificar. En una forma de realización, el paciente tiene un peso corporal de no más de aproximadamente 8,5 kg. En una forma de realización, el paciente no tiene una sustitución c.859G>C en el exón 7 de por lo menos una copia del gen de SMN2. En una forma de realización, el tratamiento se administra al paciente antes de los 6 meses de vida. En una forma de realización, el tratamiento se
10 administra al paciente 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. En una forma de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpos anti-AAV9 iguales o inferiores a 1:100 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes de la administración.

15

Asimismo la invención divulga un método para tratar un paciente pediátrico con atrofia muscular espinal (AME) Tipo I, con o sin inicio de la enfermedad, que comprende administrar al paciente una composición o formulación que comprende un vector de un virus adeno asociado (AAV) de acuerdo con lo descripto en la presente.

20

La presente invención además se refiere a un método para tratar Síndrome de Rett en un paciente que lo necesita, que comprende administrar un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de unión a metil-CpG 2 (MECP2) al paciente mediante una vía intratecal o intravenosa.

25

La presente invención además se refiere a un método para tratar esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un paciente que lo necesita, que comprende administrar un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica un ARN corto en horquilla (ARNsh) dirigido a la superóxido dismutasa 1 (SOD1) al paciente mediante una vía intratecal o intravenosa.

30

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar un paciente que padece AME tipo I, que comprende los pasos de (a) determinar el peso del paciente, (b) obtener un kit que contiene viales de una composición farmacéutica de vector viral AAV9, y (c) administrar el vector viral AAV9 desde los viales al paciente, en donde la concentración del vector viral en cada vial es de aproximadamente

2,0 x 10¹³ vg/mL, en donde el vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína SMN; y en donde el kit comprende el siguiente número de viales:

Peso del Paciente (kg)	Vial de 5,5 ± 0,4 mL	Vial de 8,3 ± 0,4 mL	Total de Viales por Kit
2,6 – 3,0	0	2	2
3,1 – 3,5	2	1	3
3,6 – 4,0	1	2	3
4,1 – 4,5	0	3	3
4,6 – 5,0	2	2	4
5,1 – 5,5	1	3	4
5,6 – 6,0	0	4	4
6,1 – 6,5	2	3	5
6,6 – 7,0	1	4	5
7,1 – 7,5	0	5	5
7,6 – 8,0	2	4	6
8,1 – 8,5	1	5	6

En una forma de realización, el kit comprende un vector viral AAV9 que comprende una ITR de AAV2 mutada, 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. En una forma de realización, el vector viral AAV se administra por infusión a una dosis de aproximadamente 1,0x10¹⁴ - 2,5x10¹⁴ vg/kg.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para tratar un paciente que padece la atrofia muscular espinal tipo I (AME) que comprende viales que contienen la composición vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN) o la formulación que comprende (a) un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), (b) un tampón Tris, (c) cloruro de magnesio, (d) cloruro de sodio, y (e) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a 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 $MgCl_2$,
5 200 mM NaCl, 0,005% p/v de Poloxámero 188 a un pH de 7,7-8,3, por ejemplo, aproximadamente 8,0.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar AME tipo I, que comprende administrar cierto volumen de la composición de vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido
10 que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN) o la formulación que comprende (a) un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de la neurona motora de la supervivencia (SMN), (b) un tampón Tris, (c) cloruro de magnesio, (d) cloruro de sodio, y (e) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188) por infusión intravenosa a un paciente que lo necesita.

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de fabricación de un vector viral AAV. En una forma de realización, un método de fabricación de un vector viral AAV comprende los pasos de (a) cultivar células adherentes, (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
20 AAV, (d) acidificar y clarificar el lisado celular de (c), (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 los vectores virales de AAV del producto de (g).

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para purificar 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) 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
30 producto de (d), (f) filtrar el producto de (e) a través de una filtración de flujo tangencial. En una forma de realización, el método se ejecuta a escala industrial. En una forma de realización, el método produce un rendimiento de más de 5×10^{15} vg, o superior a 8×10^{15} vg o superior a 1×10^{16} vg por lote de fabricación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar un paciente que padece AME Tipo 1 mediante la administración de un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de SMN que se prepara de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar un paciente que padece Síndrome de Rett mediante la administración de un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína MECP2 que se prepara de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar un paciente que padece ELA mediante la administración de un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica un ARNsh dirigido a SOD1 que se prepara de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína SMN, que se fabrica de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína SMN, que se fabrica de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica acuosa que comprende un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína SMN, un tampón Tris, una solución de cloruro de magnesio, y una solución de cloruro de sodio, en donde la composición farmacéutica no comprende un conservante, y en donde la composición se fabrica de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

25

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína MECP2, que se fabrica de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica una proteína MECP2, que se fabrica de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector viral AAV9 que comprende un polinucleótido que codifica un ARNsh dirigido a SOD1, que se fabrica de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí divulgados.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere un método para tratar AME Tipo I en un paciente que lo necesita mediante la administración intravenosa de una composición farmacéutica que comprende (a) un vector viral AAV9 auto complementario que 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, (b) 20 mM Tris a un pH de 8,0, (c) 1
15 mM MgCl₂, (d) 200 mM NaCl, y (e) 0,005% Poloxámero 188, en donde el paciente tiene un peso corporal de 2,6 kg a 8,5 kg. En una forma de realización, la composición no comprende un conservante.

En una forma de realización, el paciente (a) tiene nueve meses de vida o menos, (b) tiene un peso
20 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.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición adecuada o fabricada para administrar por vía intravenosa una composición farmacéutica que comprende (a) un vector viral
25 AAV9 auto complementario que 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, (b) 20 mM Tris a un pH de 8,0, (c) 1 mM MgCl₂, (d) 200 mM NaCl, y (e) 0,005% Poloxámero 188.

30

En algunas formas de realización, se divulga una composición o formulación, en donde la composición o formulación comprende por lo menos uno de los siguientes: (a) menos de aproximadamente 0,09 ng de Benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg, (b) menos de aproximadamente 30 µg/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, (f) menos de aproximadamente $1,1 \times 10^5$ pg de ADNhc residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, y (g) menos de aproximadamente 4 ng de PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg,

5 En algunas formas de realización, la presente invención provee un proceso aguas arriba para producir un intermedio (por ejemplo, un intermedio congelado) derivado de un banco de células de trabajo, en donde el proceso aguas arriba comprende los pasos de (a) cultivar las células, (b) transfectar las células cultivadas con plásmidos (por ejemplo, tres plásmidos), (c) cosechar las partículas virales expandidas de las células luego de un período de cultivo, (d) purificar las partículas virales mediante
10 filtración para eliminar las células intactas o los restos celulares, (e) someter el eluyente del paso (d) a filtración de flujo tangencial, y (g) opcionalmente congelar la preparación intermedia resultante de partículas virales purificadas. En algunas formas de realización, el proceso aguas arriba se combina con pasos de procesamiento adicionales, por ejemplo, pasos de purificación y formulación adicionales para producir un producto farmacéutico final.

15

En una forma de realización, el banco de células de trabajo comprende células HEK293. En otras formas de realización, se usa otro tipo de célula o derivado que esté disponible en la técnica y que sea adecuado para su uso en los métodos descriptos en la presente.

20 En una forma de realización, el paso de transfección utiliza polietilenimina. En una forma de realización, el paso de transfección comprende una transfección de triple vector usando un plásmido transgénico, por ejemplo, un plásmido pSMN, un plásmido pAAV y un plásmido pHELP.

En una forma de realización, el proceso además comprende lisando las células transfectadas con
25 tampón de lisis y tensioactivo.

En una forma de realización, el paso de cosecha incluye tratar el producto con una endonucleasa, como la Benzonase, por ejemplo, a una concentración entre 50 – 200 U/ml, por ejemplo, a una concentración entre 75-150 U/ml, para reducir el ADN residual de la célula huésped.

30

En una forma de realización, el paso de purificación incluye filtración profunda y posterior filtración a través de un filtro que elimina los contaminantes de moléculas grandes y restos celulares, por ejemplo un filtro de 0,45 micrones, pero que permite que los genomas de vector pasen. Se puede usar cualquier filtro de profundidad adecuado.

En una forma de realización, la filtración de flujo tangencial (“FFT”) logra entre 5 – 15 X, por ejemplo, una concentración de 6 – 10 X del eluyente del paso (d) y por lo menos la diafiltración de 4 diavolúmenes, por ejemplo, 6 diavolúmenes o 10 diavolúmenes, o 12 diavolúmenes, o 15 diavolúmenes. Es posible usar cualquier filtro de FFT. En una forma de realización, la membrana FFT es una membrana de celulosa. En una forma de realización la membrana FFT tiene un límite de 300 kDa.

En segundo término, la presente invención provee un proceso aguas abajo para procesar el intermedio (por ejemplo, el intermedio congelado) en una sustancia farmacológica filtrada. Los pasos del proceso aguas abajo incluyen un paso de acidificación y clarificación (usando filtración), seguido de una cromatografía de intercambio catiónico, filtración de flujo tangencial, ultracentrifugación en CsCl y un paso de filtración de flujo tangencial adicional con el fin de producir una sustancia farmacológica filtrada donde las partículas de AAV purificadas se suspenden en un portador farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización, el paso de acidificación y clarificación incluye filtración profunda y posterior filtración a través de un filtro que elimina los contaminantes de moléculas grandes y restos celulares, por ejemplo un filtro de 0,45 micrones. En algunas formas de realización, se controla el ajuste del pH. Como parte de este paso, en una forma de realización, se agrega un detergente, por ejemplo Tween. En algunas formas de realización, se controla la tasa de adición de Tween y el rango de concentración de Tween.

En una forma de realización, la cromatografía de intercambio catiónico comprende una resina de cromatografía basada en membrana constituida por una resina de sulfonilo compuesta con un tamaño de poro de 0,2 micrones.

En una forma de realización, el paso de ultracentrifugación de Cloruro de Cesio (CsCl) usa entre 2-4 M CsCl, por ejemplo, aproximadamente 3 M CsCl.

En otra forma de realización, el paso de ultracentrifugación de Cloruro de Cesio se ejecuta a aproximadamente 40-50 kRPM durante aproximadamente 20-25 horas. En otra forma de realización, el paso de ultracentrifugación de Cloruro de Cesio se ejecuta a aproximadamente 45 kRPM durante aproximadamente 22 horas.

En una forma de realización, la filtración de flujo tangencial (“FFT”) logra una concentración de entre 5 – 15 X, por ejemplo, 6 – 10 X del eluyente del paso (d) y por lo menos 4 diavolumenes de diafiltración, por ejemplo, 6 diavolumenes, o 10 diavolumenes, o 12 diavolumenes, o 15 diavolumenes. En una forma de realización, la membrana de FFT tiene un límite de 300 kDa.

En una forma de realización, el eluyente está por debajo del nivel de detección de cesio (Cs). En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es inferior a 50 partes por millón (ppm). En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es de aproximadamente 50-70 ppm. En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es de aproximadamente 70-90 partes por millón (ppm). En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es de aproximadamente 90-110 partes por millón (ppm). En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es de aproximadamente 110-130 partes por millón (ppm). En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es de aproximadamente 130-150 partes por millón (ppm). En otra forma de realización, el nivel de detección de Cs es inferior a 150 partes por millón (ppm).

Estos métodos de purificación pueden usarse para preparar preparaciones virales de alto rendimiento, incluyendo preparaciones de AAV (por ejemplo, AAV9-SMN), que comprenden menos de 5×10^6 pg/ml de ADN residual de la célula huésped (ADNhc) por 1×10^{13} genomas de vector (“vg”)/ml, por ejemplo, menos de $1,2 \times 10^6$ pg/mL ADNhc por 1×10^{13} vg/mL. Así, un paciente de 5 kg que reciba $7,5 \times 10^{15}$ vg no obtendría más de hasta $1,2 \times 10^6$ pg/mL $\times 7,5 \times 10^{15}$ vg / (1×10^{13} vg/mL) = $8,4 \times 10^7$ pg ADNhc = 84,000 ng ADNhc por dosis de 5kg. En una forma de realización, una preparación comprende menos de $5,0 \times 10^5$ pg ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $2,0 \times 10^5$ pg ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $1,1 \times 10^5$ pg ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $1,0 \times 10^5$ pg ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $0,9 \times 10^5$ pg ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $0,8 \times 10^5$ pg ADN residual de la célula huésped por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o cualquier concentración entre ellas.

En una forma de realización, el AAV es un AAV9 de replicación defectuosa, por ejemplo, scAAV9, un ITRs derivadas de AAV2. En otra forma de realización, el vector de AAV porta un transgén de SMN. En una forma de realización, el ADN que codifica SMN está establecido en el número de acceso a GenBank NM_000344.2. También se contemplan sustituciones conservadoras de nucleótidos de ADN de SMN (por ejemplo, un cambio de guanina a adenina en la posición 625, según lo establecido en el Número de Acceso a GenBank NM_000344.2).

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende partículas de AAV en una formulación adecuada ya sea para administración (a) por inyección intravenosa (“IV”) (b) intratecal (“IT”).

5

En otra forma de realización, la composición farmacéutica tiene menos de 10 % de cápsides vacías, menos de 8 % de cápsides vacías, menos de 7 % de cápsides vacías, menos de 5 % de cápsides vacías, menos de 3 % de cápsides vacías, o menos de 1 % de cápsides vacías. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene menos de aproximadamente 5 % de cápsides vacías.

10

En una forma de realización, el número de cápsides vacías es inferior al límite de detección. En algunas formas de realización, es conveniente que la composición farmacéutica tenga bajas cantidades de cápsides vacías, dado que tales cápsides vacías pueden generar una respuesta adversa (por ejemplo, respuesta inmune, respuesta inflamatoria, respuesta hepática y/o respuesta cardíaca) sin beneficio terapéutico.

15

En otra forma de realización, la proteína de célula huésped residual (“PCHr”) en dicha composición farmacéutica es menor o igual a 100 ng/ml PCHr por 1×10^{13} vg/ml, por ejemplo, menor o igual a 40 ng/ml PCHr por 1×10^{13} vg/ml o 1-50 ng/ml PCHr por 1×10^{13} vg/ml. En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende menos de 10 ng PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o menos de 5 ng PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 4 ng PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o menos de 3 ng PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o cualquier concentración entre ellas.

20

En otra forma de realización, el ADN residual de la célula huésped (“ADNhc”) en dicha composición farmacéutica es menor o igual a 5×10^6 pg/ml ADNhc por 1×10^{13} vg/ml, menor o igual a $1,2 \times 10^6$ pg/ml ADNhc por 1×10^{13} vg/ml, o 1×10^5 pg/ml ADNhc por 1×10^{13} vg/ml a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml. En una forma de realización, el ADN residual de la célula huésped en dicha composición farmacéutica es menos de $5,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $2,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $1,0 \times 10^5$ pg ADNhc por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $0,9 \times 10^5$ pg ADNhc por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $0,8 \times 10^5$ pg ADNhc por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o cualquier concentración entre ellas.

25

30

En una forma de realización, el ADN de plásmido residual en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $1,7 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml, o 1×10^5 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml a $1,7 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml. En una forma de realización, el ADN de plásmido residual en dicha

composición farmacéutica es menor a $10,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor a $8,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o menor a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

5 En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende menos de 0,5 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,3 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,22 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o menos de 0,2 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o cualquier concentración entre ellas de albúmina de suero bovino (BSA). En una forma de realización, la Benzonase en dicha composición farmacéutica es menos de 0,2 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,1 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,09 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,08 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg o cualquier concentración entre ellas. En una forma de
10 realización, el Poloxámero 188 en dicha composición farmacéutica oscila entre aproximadamente 10-150 ppm, aproximadamente 15-100 ppm, o aproximadamente 20-80 ppm. En una forma de realización, el cesio en dicha composición farmacéutica es menos de 50 µg/g (ppm), menos de 30 µg/g (ppm) o menos de 20 µg/g (ppm), o cualquier concentración entre ellas.

15 En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende impurezas totales, por ejemplo, según lo determinado por SDS-PAGE, de menos de 10%, menos de 8%, menos de 7%, menos de 6%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, o cualquier porcentaje entre ellos. En una forma de realización, la pureza total, por ejemplo, según lo determinado por SDS-PAGE, es mayor que 90%, mayor que 92%, mayor que 93%, mayor que 94%,
20 mayor que 95%, mayor que 96%, mayor que 97%, mayor que 98%, o cualquier porcentaje entre ellos. En una forma de realización de la composición farmacéutica, ninguna impureza relacionada no identificada, por ejemplo, según lo determinado por SDS-PAGE, es mayor que 5%, mayor que 4%, mayor que 3% o mayor que 2%, o cualquier porcentaje entre ellos. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende un porcentaje de cápsides llenas en relación con el total de
25 cápsides (por ejemplo, pico 1 + pico 2 medido por ultracentrifugación analítica) mayor que 85%, mayor que 86%, mayor que 87%, mayor que 88%, mayor que 89%, mayor que 90%, mayor que 91%, mayor que 91,9%, mayor que 92%, mayor que 93%, o cualquier porcentaje entre ellos. En una forma de realización de la composición farmacéutica, el porcentaje de cápsides llenas medido en el pico 1 por ultracentrifugación analítica es de 20-80%, 25-75%, 30-75%, 35-75%, o 37,4-70,3%. En una
30 forma de realización de la composición farmacéutica, el porcentaje de cápsides llenas medido en el pico 2 por ultracentrifugación analítica es de 20-80%, 20-70%, 22-65%, 24-62%, o 24,9-60,1%.

En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende un título genómico de $1,0-5,0 \times 10^{13}$ vg/mL, $1,2-3,0 \times 10^{13}$ vg/mL o $1,7-2,3 \times 10^{13}$ vg/mL.

En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente exhibe una carga biológica de menos de 5 CFU/mL, menos de 4 CFU/mL menos de 3 CFU/mL, menos de 2 CFU/mL, o menos de 1 CFU/mL, o cualquier concentración entre ellas. En una forma de realización, la cantidad de endotoxina de acuerdo con USP, por ejemplo USP <85> (se incorpora por completo a la presente como referencia) es menos de 1,0 EU/mL, menos de 0,8 EU/mL o menos de 0,75 EU/mL.

En una forma de realización, la osmolalidad de una composición farmacéutica divulgada en la presente de acuerdo con USP, por ejemplo USP <785> (se incorpora por completo a la presente como referencia) es 350-450 mOsm/kg, 370-440 mOsm/kg o 390-430 mOsm/kg. En una forma de realización, la composición farmacéutica contiene menos de 1200 partículas superiores a 25 µm por envase, menos de 1000 partículas superiores a 25 µm por envase, menos de 600 partículas superiores a 25 µm por envase, menos de 500 partículas superiores a 25 µm por envase, o cualquier valor entre ellos. En una forma de realización, la composición farmacéutica contiene menos de 10000 partículas superiores a 10 µm por envase, menos de 8000 partículas superiores a 10 µm por envase, o menos de 6000 partículas superiores a 10 µm por envase.

En una forma de realización, la composición farmacéutica tiene un título genómico de $0,5-5,0 \times 10^{13}$ vg/mL, $1,0-4,0 \times 10^{13}$ vg/mL, $1,5-3,0 \times 10^{13}$ vg/mL o $1,7-2,3 \times 10^{13}$ vg/mL.

En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende uno o más de los siguientes: menos de aproximadamente 0,09 ng de Benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente 30 µg/g (ppm) de cesio, aproximadamente 20-80 ppm de Poloxámero 188, menos de aproximadamente 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente $6,8 \times 10^5$ pg de ADN de plásmido residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente $1,1 \times 10^5$ pg de ADNhc residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente 4 ng de PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg, pH 7,7-8,3, aproximadamente 390-430 mOsm/kg, menos de aproximadamente 600 partículas de ≥ 25 µm de tamaño por envase, menos de aproximadamente 6000 partículas de ≥ 10 µm de tamaño por envase, aproximadamente $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genómico, un título infeccioso de aproximadamente $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg, un total de proteína de aproximadamente 100-300 µg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, supervivencia media de ≥ 24 días de ratones AMEΔ7 con aproximadamente $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg de dosis de vector viral, aproximadamente 70-130 % de potencia relativa en base a un ensayo in vitro basado en células, y/o menos de aproximadamente 5% de cápsides vacías.

En varias formas de realización, la composición farmacéutica de acuerdo con lo descrito en la presente que comprende cualquiera de las partículas virales descritas en la presente (por ejemplo, las partículas virales AAV de SMN, AAV MECP2, o AAV SOD1), retiene una potencia de entre $\pm 20\%$, entre $\pm 15\%$, entre $\pm 10\%$, o entre $\pm 5\%$, de un estándar de referencia. En algunas formas de realización, la potencia se mide usando un ensayo celular in vitro o un modelo animal in vivo adecuado. Por ejemplo, la potencia o el % de partículas virales de AAV de SMN puede determinarse usando un modelo animal de AME, por ejemplo, el ratón AME $\Delta 7$, o un ensayo cuantitativo basado en células usando una línea celular adecuada, por ejemplo, células progenitoras neurales primarias (NPCs) aisladas de la corteza de ratones AME $\Delta 7$. En una forma de realización, la potencia se evalúa contra un estándar de referencia usando los métodos en Foust et al., Nat. Biotechnol., 28(3), pp. 271-274 (2010). Es posible utilizar cualquier estándar de referencia. La potencia o el % de AAV MeCP2 funcional puede evaluarse usando un ensayo celular in vitro o un modelo animal in vivo adecuado, por ejemplo, un ratón knockout *Mecp2* como en Guy et al., “Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome.” Science, 315(5815):1143-7.

La potencia o % de AAV SOD1 funcional puede evaluarse usando un ensayo celular in vitro o un modelo animal in vivo adecuado, por ejemplo, un ratón mutante *SOD1* como en Gurney et al., “Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.” Science, 264(5166):1772-5. En una forma de realización, la composición farmacéutica tiene una potencia in vivo según lo determinado por la supervivencia media en un modelo de ratón AME $\Delta 7$ dado a una dosis de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg mayor que 15 días, mayor que 20 días, mayor que 22 días o mayor que 24 días. En una forma de realización, la composición farmacéutica tiene una potencia relativa in vivo según lo testeado mediante un ensayo celular de 50-150%, 60-140% o 70-130% en relación con un estándar de referencia y/o un control adecuado.

En una forma de realización, una formulación intravenosa (“IV”) tiene un pH entre 7,5 y 8,5, un título genómico de entre aproximadamente $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas de vector viral/mL (vg/mL), o entre 2×10^{13} vg/ml - 6×10^{13} vg/ml, y opcionalmente una osmolalidad de 384 – 448 mOsm/kg. En una forma de realización, una formulación IV comprende MgCl₂, NaCl, pluronic F68, en tampón Tris a un pH de 8,0.

En una forma de realización, para la administración IV, el vector de AAV-9 que porta el transgén de SMN se administra bajo condiciones estériles en un entorno adecuado (por ejemplo, suite de intervención, quirófano, sala de procedimientos específicos) una vez a través de un catéter venoso

insertado en una vena periférica de una extremidad (brazo o pierna) a la dosis indicada, y se infunde lentamente durante aproximadamente 30-60 minutos,

En otra forma de realización, la invención provee composiciones y métodos de administración de un polinucleótido al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita que comprende la administración intratecal (“IT”) de rAAV9 y un agente de contraste no iónico de bajo osmolar al paciente, en donde rAAV9 comprende un genoma auto complementario que incluye el polinucleótido. El polinucleótido se administra, por ejemplo, al cerebro, la médula espinal, una célula glial, un astrocito y/o una neurona motora inferior. El agente de contraste no iónico de bajo osmolar es, por ejemplo, iobitridol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopentol, iopromuro, ioversol o ioxilan. En algunas formas de realización, el polinucleótido es un polinucleótido de neurona motora de supervivencia (SMN). En una forma de realización, el agente de contraste es iohexol, por ejemplo, iohexol 180 (comercializado como Omnipaque 180, que contiene 388 mg de iohexol equivalentes a 180 mg de yodo orgánico por mL).

15

En una forma de realización, para la administración IT, el vector scAAV9 que porta el transgén de SMN se diluye con solución salina normal y se mezcla previamente con un medio de contraste hiperbárico apropiado aprobado e indicado para uso pediátrico para la monitorización radiográfica de la inyección mediante inyección intratecal lumbar (como Omnipaque 180). El volumen total de composición acuosa que comprende el vector de AAV-9 que porta el transgén de SMN más medio de contraste y/o solución salina no excederá los 5 mL. El agente de contraste y el vector scAAV-9 que porta el transgén de SMN pueden co-formularse, co-embalsamarse o embalsamarse por separado y administrarse en el centro de salud.

Los pacientes reciben el vector scAAV-9 que porta el transgén de SMN mediante inyección intratecal bajo condiciones estériles en una habitación de terapia intensiva pediátrica u otro entorno apropiado (por ejemplo, suite de intervención, quirófano, sala de procedimientos dedicada) con acceso inmediato a cuidados intensivos agudos. Los sitios pueden usar una aguja atraumática insertada con el bisel paralelo a las fibras de la duramadre; se ha demostrado que esto reduce considerablemente el daño a la duramadre y, en consecuencia, disminuye el riesgo de fuga de líquido cefalorraquídeo después de la punción lumbar (Ebinger et al., “Headache and Backache After Lumbar Puncture in Children and Adolescents: A Prospective Study.” *Pediatrics*, 113(6):1588-1592; Kiechl-Kohlendorfer et al., “Cerebrospinal Fluid Leakage After Lumbar Puncture in Neonates: Incidence and Sonographic Appearance.” *American Journal of Roentgenology*, 181(1):231-234) incluso en niños.

Sedación/anestesia se recomienda para todos los pacientes que reciben inyecciones intratecales. El método y los medicamentos quedarán a criterio del anestesiólogo local, pero deben incorporar un grado suficiente de sedación o ansiolisis para garantizar la analgesia y la falta de movimiento para el procedimiento y el posicionamiento de Trendelenburg posterior al procedimiento. Los pacientes se colocarán en la posición de Trendelenburg, con la cabeza inclinada hacia abajo a 30° durante 15 minutos después de la administración de la terapia intratecal para mejorar la distribución a las regiones cervical y cerebral.

Los pacientes se colocan en posición decúbito lateral y se inserta un catéter con estilete mediante una punción lumbar en el espacio interespinoso L3-L4 o L4-L5 en el espacio subaracnoideo. La canulación subaracnoidea se confirma con el flujo de líquido cefalorraquídeo (LCR) claro desde el catéter. El LCR se eliminará y dispondrá según las pautas institucionales. El vector scAAV-9 que porta el transgén de SMN en la solución de contraste premezclada se inyecta directamente en el espacio subaracnoideo.

En una forma de realización, la presente invención provee un método para tratar una enfermedad neurológica en un paciente que lo necesita que comprende la administración intravenosa o intratecal de la composición farmacéutica divulgada en la presente, en donde el parvovirus comprende un genoma de rAAV9 auto complementario, en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN y en donde la enfermedad es AME.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para tratar una enfermedad neurológica en un paciente que lo necesita que comprende la administración intratecal de una composición farmacéutica divulgada en la presente con un agente de contraste, en donde el parvovirus comprende un genoma de rAAV9 auto complementario, en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN, en donde la enfermedad es AME, y en donde el agente de contraste es Omnipaque 180.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método de tratamiento de AME tipo II, III, o IV en un paciente que lo necesita que comprende la administración intratecal de la composición farmacéutica divulgada en la presente con un agente de contraste, en donde el parvovirus comprende un genoma de rAAV9 auto complementario, en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN, y en donde el agente de contraste es Omnipaque 180.

En otra forma de realización, la presente invención provee un método para tratar AME tipo I en un paciente que lo necesita que comprende administración intravenosa de la composición farmacéutica divulgada en la presente, en donde el parvovirus comprende un genoma de rAAV9 auto
5 complementario, y en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN. En algunas formas de realización, el paciente tiene 0-9 meses de vida. En algunas formas de realización, el paciente tiene 0-6 meses de vida. En otras formas de realización, el paciente pediátrico pesa hasta aproximadamente 8 kg. En algunas formas de realización, el paciente pediátrico pesa aproximadamente 8,5 kg o menos. En algunas formas de realización, el paciente pediátrico pesa
10 aproximadamente 2,6 kg o más.

En otra forma de realización, la presente invención provee un kit para tratar AME tipo I en un paciente que lo necesita, que comprende la administración intravenosa de la composición farmacéutica divulgada en la presente contenida en viales. En algunas formas de realización, se toma el peso del paciente y la dosis se
15 calcula en base al peso del paciente.

Salvo definición en contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente les asigna el experto en el campo al cual la invención pertenece.

20 De acuerdo con la presente, las formas singulares de una palabra también incluyen la forma plural de la palabra, a menos que el contexto indique claramente lo contrario; como ejemplos los artículos se entienden en singular y plural y el término “o” en sentido inclusivo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos.

25 A lo largo de toda la memoria la palabra “comprende,” o sus variantes, se entenderá en el sentido de incluir un elemento, número entero o paso mencionado, o grupo de elementos, números enteros o pasos, sin excluir ningún otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos. A lo largo de toda la memoria la palabra “consiste en,” o sus variantes, se entenderá en el
30 sentido de incluir un elemento, número entero o paso mencionado, o grupo de elementos, números enteros o pasos, excluyendo todo otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos. A lo largo de toda la memoria la palabra “consiste esencialmente en,” o sus variantes, se entenderá en el sentido de incluir un elemento, número entero o paso mencionado, o grupo de elementos, números enteros o pasos, y todo otro elemento, número entero o paso, o grupo

de elementos, números enteros o pasos que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la divulgación y/o reivindicación.

5 Aproximadamente puede entenderse como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, o 0,01% del valor establecido. Cuando se use en referencia a un valor porcentual, "aproximadamente" puede entenderse como dentro de $\pm 1\%$ (por ejemplo, "aproximadamente 5%" puede entenderse como dentro de 4% - 6%) o $\pm 0,5\%$ (por ejemplo, "aproximadamente 5%" puede entenderse como dentro de 4,5% - 5,5%). Salvo que el contexto claramente indique lo contrario, todos los valores numéricos proporcionados en la presente están modificados por el término
10 "aproximadamente".

Si bien pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias
15 mencionadas en este documento quedan incorporadas como referencia en su totalidad. Las referencias citadas en este documento no se admiten como técnica anterior a la invención reivindicada. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Varios objetos y beneficios y una comprensión más completa de la presente invención serán evidentes y se advertirán más con mayor facilidad con referencia a la siguiente Descripción detallada y las
25 reivindicaciones adjuntas tomadas en conjunto con los Dibujos que se acompañan, en donde:

Figura 1. Mapas de plásmidos de pSMN, pHELP y pAAV.

La Figura 1A ilustra el mapa de plásmido de pSMN. pSMN es un plásmido que codifica la información para un genoma de ADN de AAV auto complementario recombinante que expresa el
30 ADNc de la neurona motora de supervivencia humana (SMN) bajo el control de un promotor híbrido de beta-actina de pollo con un elemento potenciador inmediato/temprano de citomegalovirus (CMV). El ADNc de SMN codifica una proteína funcional completa. El casete de expresión contiene una secuencia intrónica modificada derivada del virus del simio 40 (SV40) y una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH). El casete de expresión (CMV-CB-SV40-SMN-

BGHPA) está flanqueado por repeticiones terminales invertidas derivadas de AAV2 (ITRs). La ITR izquierda se modifica para preferentemente empaquetar genomas de AAV auto complementarios. Juntas, las regiones entre y que incluyen las ITRs son empaquetadas en cápsides de AAV9 recombinante durante la fabricación del producto farmacológico de la invención. Los componentes clave de pSMN que no están destinados a empaquetarse en los genomas de AAV recombinantes incluyen un marco de lectura abierto que codifica la resistencia a la kanamicina (KanR) y un origen de replicación (ori) derivado de pUC. Las regiones ori y KanR son útiles para la fabricación de plásmidos.

La Figura 1B ilustra el mapa de plásmido del plásmido pHELP. El plásmido pHELP contiene los componentes adenovirales de acción trans necesarios para la producción de virus recombinantes adenoasociados. El plásmido pHELP contiene las regiones del genoma de adenovirus que proporcionan factores que son importantes para la replicación de AAV, a saber E2A, E4, y VA ARN. Las funciones del adenovirus E1 involucradas en la replicación de rAVV son provistas por la transfección de células huésped 293. El plásmido pHELP, sin embargo, no contiene otros genes de replicación de adenovirus o estructurales. Las secuencias de adenovirus presentes en este plásmido representan solamente ~28% (9,280/35,938) del genoma del adenovirus y no contienen los elementos *cis* críticos para la replicación, como las repeticiones de terminales invertidas. En consecuencia, no se espera generar adenovirus infeccioso a partir de dicho sistema de producción.

La Figura 1C ilustra el mapa de plásmido del plásmido AAV. El genoma de AAV de tipo salvaje contiene dos elementos estructurales no codificantes llamados repeticiones terminales invertidas que flanquean los marcos de lectura abiertos *rep* y *cap*. *Rep* y *cap* codifican la replicación viral y las proteínas de la cápside respectivamente. En la producción de vectores virales adenoasociados recombinantes; las ITR virales son los únicos elementos utilizados en *cis*, mientras que los marcos de lectura abiertos virales se suministran en *trans*. El uso del método de transfección transitoria de células HEK293 adherentes para conformar AAV aborda los roles *cis/trans* para los diferentes elementos genéticos dividiéndolos en plásmidos separados. El plásmido pAAV2/9 contiene los marcos de lectura abiertos para el gen de AAV2 *rep* y el gen de AAV9 *cap*.

La Figura 2 ilustra un diagrama de flujo de proceso para la selección de células HEK293 para el pre banco de células maestras de adherencia excepcional (BCM).

La Figura 3 ilustra un resumen de los detalles de procesamiento de las células para la selección de células HEK293 para el pre banco de células maestras de adherencia excepcional (BCM).

Las Figuras 4A-B describen el diagrama de flujo del proceso aguas arriba de la sustancia farmacológica.

La Figura 5 describe el diagrama de flujo del proceso aguas abajo de la sustancia farmacológica.

La Figura 6 ilustra la inactivación de XMuLV mediante Tween 20 agregado hasta en 120 minutos.

La Figura 7 ilustra la inactivación de PRV mediante Tween 20 agregado hasta en 120 minutos.

La Figura 8 describe el flujo del proceso de expansión de células HEK 293 durante los experimentos de densidad de siembra celular.

Las Figuras 9A-E ilustran los perfiles de crecimiento y metabolitos. Las células HEK 293 se sembraron por duplicado a 12,000 y 8,000 células/cm² en biorreactores (pH 7,23, 37,0°C, 55% oxígeno disuelto (OD)). Las células fueron transfectadas con plásmidos de ADN/PEI a los cuatro días (12,000 células/cm²) y cinco días (8,000 células/cm²) de la siembra. Los biorreactores fueron cosechados a los ocho días (12,000 células/cm²) y nueve días (8,000 células/cm²) luego de la siembra. Las lecturas de pH y metabolitos se tomaron diariamente en Nova BioFlex.

La Figura 10 ilustra la producción del genoma viral en función de la densidad de siembra celular (8000 o 12000 células/cm²) y cuatro períodos de tiempo de transfección diferentes (20 minutos, 1 hora o 2 horas).

La Figura 11 ilustra los títulos virales de los intermedios muestreados en diferentes etapas de filtración a lo largo del proceso de fabricación.

Las Figuras 12 A-B ilustran la recuperación del aclaramiento del vector viral y la proteína de la célula huésped (HCP) en el paso de FFT1.

La Figura 13 describe el flujo del proceso de expansión de células HEK 293 durante los experimentos de densidad de siembra celular.

Las Figuras 14 A-E ilustran que las células HEK 293 fueron sembradas por duplicado a 8,000 células/cm², 9,350 células/cm², 10,700 células/cm², 12,050 células/cm² en biorreactores (pH 7,23, 37,0°C, 55% DO). Las células se transfectaron con plásmidos de ADN/PEI (1:1 m/m) cinco días
5 luego de la siembra. El análisis del pH y metabolitos se realizó utilizando NOVA BioProfile 400.

Las Figuras 15 A-B ilustran la producción de sustancias farmacológicas a partir de cuatro densidades
10 iniciales de siembra en biorreactores. Comparación del título del virus y el genoma del vector cosechado por unidad de superficie.

La Figura 16 ilustra los procesos de fabricación Fase 1 (Proceso A) y Fase 3 de Prueba (Proceso B).

Las Figuras 17 A-B proveen una tabla que ilustra los resultados de comparabilidad y consistencia de
15 fabricación - Productos del Proceso A (Fase 1) y Proceso B (Fase 3). Los productos de Proceso B muestran beneficios adicionales en comparación con el Proceso A.

La Figura 18 ilustra la comparabilidad entre el Proceso A y el Proceso B usando la comparación por
20 pares del Proceso A (Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613) y el Proceso B (Fase 3 Lote 600156). Los productos del Proceso B muestran beneficios adicionales en comparación con el Proceso A.

La Figura 19 ilustra la evaluación de la consistencia de fabricación mediante la comparación por pares
de los lotes del Proceso B (Fase 3) 600156 y 600307.

La Figura 20 ilustra el perfil de estabilidad para NCH Lote NCHAAV9SMN0613 almacenado en
25 condiciones de almacenamiento en tiempo real $\leq -60^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.

La Figura 21 ilustra los coeficientes de sedimentación (seg. $\times 10^{-13}$) para el material de la Fase 1
(NCHAAV9SMN0613) que muestra cápsides vacías (7%) con un coeficiente de sedimentación de
30 aproximadamente 60×10^{-13} segundos, y las cápsides llenas con un rango de coeficiente de sedimentación de aproximadamente $80-150 \times 10^{-13}$ segundos.

La Figura 22 los ilustra los coeficientes de sedimentación (seg. $\times 10^{-13}$) para el material de la Fase 3
(600156) que muestra cápsides vacías (2%) con un coeficiente de sedimentación de aproximadamente

60 x 10⁻¹³ segundos, y las cápsides llenas con rango de coeficiente de sedimentación de aproximadamente 80-150 x 10⁻¹³ segundos.

La Figura 23 ilustra los coeficientes de sedimentación (seg. x 10⁻¹³) para el material de la Fase 3 (600307) que ilustra cápsides vacías (4%) con un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 60 x 10⁻¹³ segundos, y las cápsides llenas con rango de coeficiente de sedimentación de aproximadamente 80-150 x 10⁻¹³ segundos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Con el fin de avanzar en el desarrollo de la terapia génica AAV más allá de los modelos en animales y en estudios clínicos y/o para usos terapéuticos, se desarrolló un proceso escalable capaz de producir material viral adecuado para uso en humanos.

En algunas formas de realización, "vector" hace referencia a cualquier elemento genético, como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicarse cuando se asocia con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias de genes entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

En algunas formas de realización, un "vector de AAV" hace referencia a un vector derivado del serotipo de un virus adeno-asociado, que incluye, entre otros, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8 y AAV-9. Los vectores de AAV pueden tener uno o más de los genes de tipo salvaje de AAV eliminados en su totalidad o en parte, por ejemplo, los genes rep y/o cap, pero conservan secuencias ITR flanqueantes funcionales. Las secuencias ITR funcionales son necesarias para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Así, de acuerdo con la presente un vector de AAV incluye por lo menos aquellas secuencias que en cis proporcionan la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del virus. Las ITR no necesitan ser las secuencias de nucleótidos de tipo salvaje, y pueden alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, eliminación o sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias proporcionen rescate, replicación y empaquetamiento funcionales. En una forma de realización, el vector es un vector de AAV-9, con ITRs derivadas de AAV-2. Asimismo "vector de AAV" hace referencia a la cubierta proteica o cápside, que proporciona un vehículo eficiente para la entrega del ácido nucleico del vector al núcleo de las células diana.

En algunas formas de realización, “scAAV” hace referencia a un virus adeno-asociado auto complementario (scAAV), que es un vector viral diseñado a partir del virus adeno-asociado natural (AAV) para uso en terapia génica. El scAAV se denomina “auto complementario” dado que la región de codificación ha sido diseñada para formar una plantilla de ADN de doble cadena intramolecular.

5

En algunas formas de realización, la expresión "impurezas relacionadas el vector" se refiere a todos los tipos de partículas de AAV que no sean partículas de AAV recombinantes propiamente dichas. Las impurezas relacionadas con el vector incluyen cápsides vacías de AAV (también denominadas "vacías" o "partículas vacías") y partículas de AAV que contienen secuencias de polinucleótidos distintas del genoma del vector deseado (también denominadas "impurezas de ácido nucleico encapsidadas con AAV" o "impurezas de ADN encapsidadas con AAV").

10

En algunas formas de realización, "virus recombinante" hace referencia a un virus que ha sido genéticamente alterado, por ejemplo, mediante la adición o inserción de un constructo de ácido nucleico heterólogo en la partícula. "Recombinante" puede abreviarse "r", por ejemplo, rAAV puede referirse a AAV recombinante. El término "AAV", de acuerdo con la presente, pretende abarcar "AAV recombinante" o "rAAV".

15

En algunas formas de realización, "virión de AAV" hace referencia a una partícula de virus completa, tal como una partícula de virus AAV de tipo salvaje (wt) (que comprende un genoma de ácido nucleico de AAV lineal, monocatenario asociado con una cubierta de proteína de cápside de AAV). A este respecto, las moléculas de ácido nucleico de AAV monocatenario de cadenas complementarias de sentido, por ejemplo, "sentido" o "antisentido", se pueden empaquetar en cualquier virión de AAV y ambas cadenas son igualmente infecciosas.

20

25

En algunas formas de realización, las expresiones "virión de AAV recombinante," "virión de rAAV," "vector de partícula de AAV," "cápsides llenas," y "partículas llenas" se definen en la presente como un virus infeccioso defectuoso en la replicación que incluye una cubierta de proteína de AAV, que encapsida una secuencia de nucleótidos de interés heteróloga que está flanqueada en ambos lados por ITRs de AAV. Se produce un virión de rAAV en una célula huésped adecuada que ha tenido secuencias que especifican un vector de AAV, funciones auxiliares de AAV y funciones accesorias introducidas en el mismo. De esta manera, la célula huésped se vuelve capaz de codificar polipéptidos de AAV que proporcionan el empaquetamiento del vector de AAV (que contiene una secuencia de nucleótidos recombinante de interés) en partículas de virión recombinante infecciosas para la entrega

30

posterior de genes.

En algunas formas de realización, las expresiones "cápside vacía" y "partícula vacía" hacen referencia a un virión de AAV que incluye una cubierta de proteína de AAV pero que carece en su totalidad o en parte del constructo polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos de interés heteróloga flanqueada a ambos lados por ITRs de AAV.

La expresión "célula huésped" indica, por ejemplo, microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que se pueden usar, o se han utilizado, como receptores de un constructo auxiliar de un AAV, un vector de plásmido de AAV, un vector de función accesoria u otra transferencia de ADN. El término incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Así, una "célula huésped" de acuerdo con la presente generalmente se refiere a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una sola célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total como la original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

En otra forma de realización, la expresión "funciones auxiliares de AAV" se refieren a secuencias de codificación derivadas de AAV que se pueden expresar para proporcionar productos génicos de AAV que, a su vez, funcionan en trans para la replicación productiva de AAV. Por lo tanto: las funciones auxiliares de AAV incluyen los dos principales marcos de lectura abierta (ORF) de AAV, *rep* y *cap*. Se ha demostrado que los productos de expresión Rep poseen muchas funciones, que incluyen, entre otras: reconocimiento, unión y ruptura del origen del AAV de la replicación del ADN; actividad de helicasa de ADN; y modulación de la transcripción de promotores de AAV (u otros promotores heterólogos). Los productos de expresión Cap proporcionan las funciones de empaquetamiento necesarias. Las funciones auxiliares de AAV se utilizan en la presente para complementar las funciones de AAV en trans que faltan en los vectores de AAV.

En una forma de realización, la expresión "constructo auxiliar de AAV" en general se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones de AAV eliminadas de un vector de AAV que se utilizará para producir un vector transductor para la administración de una secuencia de nucleótidos de interés. El constructo auxiliar de AAV se usa comúnmente para proporcionar la expresión transitoria de los genes *rep* y/o *cap* de AAV con el fin complementar las funciones faltantes de AAV que son necesarias para la replicación de AAV; sin embargo, los constructos auxiliares carecen de las ITRs de AAV y no pueden replicarse ni

empaquetarse. El constructo auxiliar de AAV puede tener la forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito diversos constructos auxiliares de AAV, como los plásmidos de uso común pAAV/Ad y pLM29+45 que codifican los productos de expresión Rep y Cap. Véase, por ejemplo, Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828; y McCarty et al. (1991) J. Virol. 65:2936-2945. Se han descrito otros vectores que codifican productos de expresión Rep y/o Cap. Véanse, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Números 5,139,941 y 6,376,237.

En otra forma de realización, la expresión "transfección" se usa para referirse a la absorción de ADN extraño por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. Una serie de técnicas de transfección son en general conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Graham et al. (1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, y Chu et al. (1981) Gene 13:197. Estas técnicas también pueden ser usadas para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

De acuerdo con la presente, la expresión "línea celular" se refiere a una población de células capaces de crecimiento continuo o prolongado y división in vitro. Se sabe además en la técnica que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de tales poblaciones clonales. En consecuencia, las células derivadas de la línea celular mencionada pueden no ser exactamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular mencionada incluye tales variantes. En algunas formas de realización, las expresiones "células HEK293", "células 293" o sus equivalentes gramaticales se usan indistintamente y hacen referencia a la línea celular huésped/empaquetadora utilizada en los métodos descritos en la presente.

En algunas formas de realización, la expresión "eluyente" puede entenderse, en contexto, para referirse al tampón usado para eluir una sustancia. En algunas formas de realización, la expresión "eluyente" puede entenderse, en contexto, para referirse a la sustancia eluida, por ejemplo, el producto o sustancia deseada de una etapa de purificación previa, por ejemplo, para ensayo o purificación adicional.

En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente se ejecutan aplicando las buenas prácticas de manufactura (BPM) y a escala industrial. Las BPM son regulaciones, por ejemplo, aplicadas por la Federal Drug Agency (FDA) para garantizar la calidad farmacéutica. Las

regulaciones de las BPM establecen controles para los procesos de fabricación. La FDA publica ejemplos de las regulaciones actuales de BPM. En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente emplean procedimientos de BPM para producir vectores virales de AAV a escala industrial. A la fecha, la producción a escala industrial de vectores virales de AAV para terapia

5 génica ha sido un desafío debido a problemas de escalabilidad. Así, en algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente proporcionaron una ventaja al producir vectores virales de AAV, por ejemplo, en células adherentes, a escala industrial y con niveles de pureza suficientes para administrar a un ser humano. El término "escala industrial" se refiere a métodos de producción de vectores virales en células a mayor escala que la escala de banco, por ejemplo, a escala comercial,

10 por ejemplo, donde el rendimiento 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.

PROCESO AGUAS ARRIBA

En algunas formas de realización, se utiliza un proceso aguas arriba para producir un derivado

15 intermedio de un banco de células de trabajo, en donde el proceso aguas arriba comprende los pasos de (a) cultivar las células, por ejemplo, células adherentes, (b) transfectar las células cultivadas, por ejemplo, células adherentes, con tres plásmidos, (c) cosechar las partículas virales expandidas de las células luego de un período de cultivo, por ejemplo, por lisis celular total, (d) purificar las partículas virales mediante filtración para eliminar las células intactas o los restos celulares, (e) someter el

20 eluyente del paso (d) a filtración de flujo tangencial, y (f) opcionalmente congelar la preparación intermedia resultante de partículas virales purificadas. En algunas formas de realización, la preparación intermedia puede ser congelada. En otras formas de realización, no es necesario congelar la preparación intermedia antes del proceso aguas abajo. En algunas formas de realización, el AAV preparado con el proceso aguas arriba que se divulga en la presente es un AAV que codifica un

25 ARNsh dirigido a SOD1, un AAV que comprende un polinucleótido que codifica MECP2, o un AAV que comprende un polinucleótido que codifica SMN, de acuerdo con lo descrito en la presente. En algunas formas de realización, el proceso aguas arriba se ejecuta bajo BPM y a escala industrial.

1. Transfección y cultivo de la línea celular

30

En un aspecto, la presente invención describe genomas de rAAV. Los genomas de rAAV comprenden una o más ITRs de AAV que flanquean un polinucleótido que codifica un polipéptido (incluyendo, pero no limitado a, un polipéptido SMN) o que codifica ARNsi, ARNsh, antisentido y/o ARNm dirigido a proteínas mutadas o secuencias de control de sus genes. El polinucleótido se

une operativamente a los ADN de control transcripcional, específicamente el ADN promotor, el ADN potenciador y el ADN de la secuencia de señal de poliadenilación que son funcionales en las células diana para formar un casete génico. El casete génico también puede incluir secuencias de intrones para facilitar el procesamiento de una transcrita de ARN cuando se expresa en células de mamífero.

En algunas formas de realización, el genoma de rAAV (por ejemplo, rAAV9) codifica un factor trófico o protector para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que incluyen entre otros la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, junto con lesiones del sistema nervioso, que incluyen traumatismos/lesiones de la médula espinal y el cerebro, derrames cerebrales y cánceres cerebrales. Los ejemplos no limitativos de factores de crecimiento conocidos del sistema nervioso incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5), neurotrofina-6 (NT-6), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (por ejemplo, FGF's 1-15), factor inhibidor de leucemia (LIF), ciertos miembros de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (por ejemplo, IGF-1), las neurturinas, persefina, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), las inmunofilinas, la familia de factores de crecimiento del factor de crecimiento transformante (TGF), las neuregulinas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), familia del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo VEGF 165), folistatina, Hif1 y otros. Además en general se contemplan los factores de transcripción con dedos de zinc que regulan cada uno de los factores tróficos o protectores contemplados en la presente. En formas de realización adicionales, se contemplan métodos para modular la función neuroinmune, incluyendo pero no limitado a, inhibición de la activación microglial y astrogial mediante, por ejemplo, inhibición de NFkB o NFkB para neuroprotección (acción dual de NFkB y vías asociadas en diferentes tipos de células) por ARNsi, ARNsh, antisentido o ARNmi. En aún otras formas de realización adicionales, el genoma de rAAV (por ejemplo, rAAV9) codifica un inhibidor apoptótico (por ejemplo, bcl2, bclxL). Uso de un rAAV (por ejemplo, rAAV9) que codifica un factor trófico o proteína moduladora de la lesión de la médula espinal o un supresor de un inhibidor del crecimiento axonal (por ejemplo, un supresor de Nogo [Oertle et al., The Journal of Neuroscience, 23(13):5393-5406 (2003)]) también queda contemplado para el tratamiento de la lesión de la médula espinal.

Para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, el genoma

de rAAV (por ejemplo rAAV9) codifica en varias formas de realización ácido aromático dopa descarboxilasa (AADC), tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidrolasa 1 (gtpch1), inhibidores apoptóticos (por ejemplo, bcl2, bclxL), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurotransmisor inhibidor-ácido aminobutírico (GABA) o las enzimas que participan en la biosíntesis de la dopamina. En formas de realización adicionales, el genoma del rAAV (por ejemplo rAAV9) puede codificar, por ejemplo, modificadores de la parkina y/o sinucleína.

Para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, en algunas formas de realización, se contemplan métodos para aumentar la producción de acetilcolina. En algunas formas de realización, se contemplan métodos para aumentar el nivel de una colina acetiltransferasa (ChAT) o inhibir la actividad de una acetilcolina esterasa (AChE).

El genoma de rAAV (por ejemplo rAAV9) codifica en algunas formas de realización, ARNsi, ARNsh, antisentido, y/o ARNmi para su utilización en métodos para reducir la expresión de la proteína Huntington mutante (htt) para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, tal como la enfermedad de Huntington.

El genoma de rAAV (por ejemplo rAAV9) codifica en varias formas de realización ARNsi, ARNsh, antisentido, y/o ARNmi para su utilización en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tal como ELA. El tratamiento resulta en una reducción de la expresión de marcadores moleculares de enfermedad, tales como $\text{TNF}\alpha$, óxido nítrico, peroxinitrito y/o óxido nítrico sintasa (NOS)

En algunas formas de realización, los vectores codifican ARN de horquilla cortos (ARNshs) dirigidos a proteínas mutadas, tales como la superóxido dismutasa para (SOD, por ejemplo, SOD-1) para la ELA, o factores neurotróficos, tales como GDNF o IGF1 para la ELA o la enfermedad de Parkinson.

En una forma de realización, los métodos y materiales descritos en la presente pueden ser usados para el tratamiento de ELA. ELA es una enfermedad neurodegenerativa que resulta en la pérdida progresiva de neuronas motoras en el cerebro y la médula espinal, con síntomas que incluyen la pérdida de la capacidad de hablar, comer, moverse y eventualmente respirar. La enfermedad generalmente produce la muerte dentro de los 3-5 años posteriores al diagnóstico. Si bien se desconoce la causa del 90-95% de las causas de ELA, un subconjunto de ELA es causado por mutaciones genéticas en el gen superóxido dismutasa 1 (SOD1), donde una mutación causa una

ganancia de función dominante tóxica. Estudios en ratones muestran que la eliminación de SOD1 no produce enfermedad y, por lo tanto, se cree que las terapias que reducen los niveles de SOD1 mutante alivian los síntomas de la enfermedad.

5 En algunas formas de realización, el vector de AAV codifica un ARNsh dirigido a SOD1 para ELA. Un ejemplo de constructo de AAV, por ejemplo, scAAV9, que codifica ARNsh para SOD1 se provee en WO2015031392 y US2016272976, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente como referencia. En algunas formas de realización, un constructo de AAV que codifica ARNsh para SOD1 puede prepararse usando los métodos descritos en la presente. En algunas
10 formas de realización, estos constructos de AAV se pueden usar para tratar la ELA. En algunas formas de realización, el AAV de SOD1 exhibe menos de 10%, por ejemplo, menos de 7%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1 % de cápsides vacías. En algunas formas de realización, el AAV de SOD1 exhibe bajas cantidades de proteína residual de la célula huésped, ADN de célula huésped, ADN plasmídico y/o endotoxina, por ejemplo, los niveles descritos en la presente para la preparación y
15 purificación de vectores de AAV. De acuerdo con la presente, “AVXS-301” es un ejemplo no limitativo de un vector de scAAV9, es decir, que comprende un polinucleótido (por ejemplo pSOD1sh) que codifica ARNsh de SOD1 antihumano, una ITR de AAV2 modificada, un promotor de H1 humano, y una ITR de AAV2 sin modificar. Las ITR modificadas y no modificadas pueden venir en cualquier orientación (es decir, 5’ o 3’) en relación con el casete de expresión de ARNsh de
20 SOD1 antihumano.

De acuerdo con la presente, plásmido del vector “pSOD1sh” comprende un polinucleótido que codifica un ARN corto en horquilla (ARNsh) dirigido a la expresión del gen superóxido dismutasa 1 (SOD1), es decir, un casete de anti-ARNsh de SOD1, en donde el casete está flanqueado por
25 secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del virus adeno-asociado, por ejemplo, a “izquierda” y “derecha” del polinucleótido que codifica pSOD1sh. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica pSOD1sh se transcribe en un ARN corto en horquilla que se dirige específicamente al ARNm de SOD1 humano. En algunas formas de realización, las secuencias ITR que circundan el polinucleótido que codifica pSOD1sh son secuencias de ITR de
30 AAV nativas, variantes o modificadas. En algunas formas de realización, por lo menos una secuencia ITR es una secuencia ITR de AAV2 nativa, variante o modificada. En algunas formas de realización, las ITRs flanquean el polinucleótido que codifica pSOD1sh. En algunas formas de realización, las dos secuencias ITR son secuencias ITR de AAV2 nativas, variantes o modificadas. En algunas formas de realización, la ITR “izquierda” es una secuencia de ITR de AAV2 modificada

que permite la producción de genomas autocomplementarios, y la ITR “derecha” es una secuencia de ITR de AAV2 nativa. En algunas formas de realización, la ITR “derecha” es una secuencia de ITR de AAV2 modificada que permite la producción de genomas auto complementarios, y la ITR “izquierda” es una secuencia de ITR de AAV2 nativa. En algunas formas de realización, el vector de pSOD1sh además comprende un segmento del promotor de ARN H1 humano, por ejemplo, según lo descrito por Myslinksi. Myslinkski et al. “An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene.” *Nucleic Acids Research*, 29(12):2502-2509. En algunas formas de realización, el vector de pSOD1sh además comprende una secuencia de relleno única hecha de segmentos de esqueletos de plásmidos aleatorios para aumentar el tamaño del casete de expresión. En algunas formas de realización, el vector de pSOD1sh comprende un polinucleótido que codifica ARNsh de SOD1 antihumano, una ITR de AAV2 modificada, un promotor de H1 humano, y una ITR de AAV2 sin modificar

En una forma de realización, los métodos y materiales descritos en la presente pueden usarse para el tratamiento de trastornos del desarrollo neurológico como el Síndrome de Rett. El síndrome de Rett es un trastorno neurológico raro reconocido por primera vez en la infancia, como resultado de mutaciones en el gen MECP2 en el cromosoma X en el 90-95% de los casos. Ruthie et al., “Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.” *Nature Genetics*, 23:185-188. Los niños que solo tienen una copia del cromosoma X generalmente mueren poco después del nacimiento, mientras que las niñas que tienen dos copias del cromosoma X usualmente tienen una copia funcional del gen. Comienzan a desarrollar síntomas entre los 6 y los 18 meses, con síntomas característicos como retorcerse o apretarse las manos, aplaudir, frotarse, lavarse las manos o llevarse las manos a la boca. La enfermedad es progresiva con una discapacidad significativa que puede incluir comportamientos de tipo autista, irregularidades respiratorias, dificultades para alimentarse y tragar, retraso del crecimiento y convulsiones. Hay 200 mutaciones conocidas del gen MECP2, y dependiendo del nivel de inactivación de X y compensación de dosis, la gravedad de la enfermedad varía ampliamente de un paciente a otro. Los estudios en ratones muestran que la mutación de MECP2 no causa la muerte de las neuronas, lo que sugiere que no es un trastorno neurodegenerativo. Guy et al, “Reversal of Neurological Defects in a Mouse Model of Síndrome de Rett.” *Science*, 315(5815)1143-1147.

Para las formas de realización relativas al Síndrome de Rett, el genoma de rAAV (por ejemplo rAAV9) puede codificar, por ejemplo, proteína de unión a metil citosina 2 (MeCP2). Un ejemplo de constructo de AAV, por ejemplo, scAAV9, que comprende un polinucleótido que codifica MeCP2

se provee en la Patente Estadounidense Número 9,415,121, cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente como referencia. En algunas formas de realización, un constructo de AAV que comprende un polinucleótido que codifica MeCP2 puede prepararse usando los métodos descriptos en la presente. En algunas formas de realización, estos constructos de AAV pueden ser
5 usados para tratar el Síndrome de Rett. En algunas formas de realización, el AAV de MeCP2 exhibe menos de 10%, por ejemplo, menos de 7%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1 % de cápsides vacías. En algunas formas de realización, el AAV de MeCP2 exhibe bajas cantidades de proteína residual de la célula huésped, ADN de célula huésped, ADN de plásmido y/o endotoxina, por ejemplo, los niveles descriptos en la presente para la preparación y purificación de vectores de AAV.

10

De acuerdo con la presente, “AVXS-201” es un ejemplo no limitativo de un vector de scAAV9, es decir, que comprende un polinucleótido (por ejemplo pMECP2) que comprende un casete de expresión de cDA de MECP2, una ITR de AAV2 modificada, un promotor de Mecp2 murino, un intrón de SV40 modificado, una señal de poliadenilación mínima, y una ITR de AAV2 sin
15 modificar. Las ITR modificadas y no modificadas pueden venir en cualquier orientación (es decir, 5 ‘o 3’) en relación con el casete de expresión de ADNc de MECP2.

20

De acuerdo con la presente, el plásmido del vector de “pMECP2” comprende un polinucleótido que codifica una proteína MECP2, una ITR de AAV2 modificada, un promotor de Mecp2 murino, un
20 intrón de SV40 modificado, una señal de poliadenilación mínima, y una ITR de AAV2 sin modificar. En algunas formas de realización, pMECP2 es un constructo de vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína MECP2, es decir un casete de expresión de cDA de MECP2, en donde el casete está flanqueado por secuencias de repetición terminal invertidas (ITR) del virus adeno-asociado, por ejemplo, a “izquierda” y “derecha” del polinucleótido que codifica el
25 gen MECP2. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica MECP2 es una secuencia de MECP2 humana, por ejemplo, una secuencia de MECP2 humana natural o isoformas, variantes o mutantes de la misma. En algunas formas de realización, las secuencias ITR son secuencias ITR de AAV nativas, variantes, o modificadas. En algunas formas de realización, por lo menos una secuencia ITR es una secuencia ITR de AAV nativa, variante, o modificada. En algunas
30 formas de realización, las dos secuencias ITR son secuencias ITR de AAV nativas, variantes, o modificadas. En algunas formas de realización, la ITR “izquierda” es una secuencia de ITR de AAV2 modificada que permite la producción de genomas autocomplementarios, y la ITR “derecha” es una secuencia de ITR de AAV2 nativa. En algunas formas de realización, la ITR “derecha” es una secuencia de ITR de AAV2 modificada que permite la producción de genomas auto

complementarios, y la ITR “izquierda” es una secuencia de ITR de AAV2 nativa. En algunas formas de realización, el vector de pMECP2 además comprende un segmento pero no todo el promotor de Mecp2 de ratón. En algunas formas de realización, el vector de pMECP2 además comprende un intrón de Virus de Simio 40 (SV40). En algunas formas de realización, el vector de pMECP2 además comprende una señal de poliadenilación mínima, por ejemplo, según lo definido por Levitt et al., “Definition of an efficient synthetic poly(A) site.” *Genes & Development*, 3:1019-1025.

En algunas formas de realización, los genomas de rAAV divulgados en la presente carecen de ADN de AAV rep y cap. El ADN de AAV en los genomas de rAAV (por ejemplo, ITRs) puede ser de cualquier serotipo de AAV para el que se pueda derivar un virus recombinante, incluyendo, pero no limitado a, los serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 está provisto en el Número de Acceso a GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-2 está provisto en el Número de Acceso a GenBank NC 001401 y Srivastava et al., *Virol.*, 45: 555-564 {1983}; el genoma completo de AAV-3 está provisto en el Número de Acceso a GenBank NC_1829; el genoma completo de AAV-4 está provisto en el Número de Acceso a GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 está provisto en el Número de Acceso a GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 está provisto en el Número de Acceso a GenBank NC_001862; por lo menos porciones de los genomas de AAV-7 y AAV-8 están provistas en los Números de Acceso a GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV-9 está provisto en Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 está provisto en *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 está provisto en *Virology*, 330(2): 375-383 (2004).

De acuerdo con la presente, el plásmido del vector de “pSMN” comprende un polinucleótido que codifica una proteína de SMN, es decir, un ADNc de un casete de expresión de SMN, en donde el casete está flanqueado por secuencias de repetición terminal invertidas (ITR) del virus adeno-asociado, por ejemplo, a “izquierda” y “derecha” del polinucleótido que codifica el gen de SMN. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica SMN es una secuencia de SMN humana, por ejemplo, una secuencia de SMN humana natural o isoformas, variantes o mutantes de la misma. En algunas formas de realización, las secuencias ITR son secuencias ITR de AAV nativas, variantes, o modificadas. En algunas formas de realización, por lo menos una secuencia ITR es una secuencia de ITR de AAV2 nativa, variante, o modificada. En algunas formas de realización, las dos secuencias ITR son secuencias de ITR de AAV2 nativas, variantes, o modificadas. En algunas formas de

realización, la ITR “izquierda” es una secuencia de ITR de AAV2 modificada que permite la producción de genomas auto complementarios, y la ITR “derecha” es una secuencia de ITR de AAV2 nativa. En algunas formas de realización, la ITR “derecha” es una secuencia de ITR de AAV2 modificada que permite la producción de genomas auto complementarios, y la ITR “izquierda” es una secuencia de ITR de AAV2 nativa. En algunas formas de realización, el plásmido de pSMN además comprende un potenciador de CMV/promotor de beta-actina de pollo ("CB"). En algunas formas de realización, el plásmido de pSMN además comprende un intrón de Virus de Simio 40 (SV40). En algunas formas de realización, el plásmido de pSMN además comprende una señal de terminación de poliadenilación (poliA) de la hormona del crecimiento bovina (BGH). Los ejemplos de secuencias que pueden usarse para uno o más de los componentes antes expuestos se ilustran en la Tabla 1 a continuación. En algunas formas de realización, se usan todas las secuencias ilustradas en la Tabla 1 que sigue. En algunas formas de realización, “AVXS-101,” es un ejemplo no limitativo de un constructo de vector que usa todas las secuencias en la Tabla 1 y que cae dentro del alcance de la expresión pSMN.

15

En algunas formas de realización, un vector de pSMN puede comprender un ADNc de casete de expresión de SMN, 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. Las ITR modificadas y no modificadas pueden venir en cualquier orientación (es decir, 5 ‘o 3’) en relación con el ADNc de casete de expresión de SMN.

En algunas formas de realización, por ejemplo, durante los procesos de fabricación descritos en la presente la secuencia de la construcción del vector está encapsidada, por ejemplo, en viriones de AAV9. En estas formas de realización, la encapsidación está en una cápside de AAV9 recombinante no replicante capaz de entregar un transgén estable y funcional, por ejemplo un transgén de SMN humano completamente funcional, un transgén de MECP2, o anti-ARNsh de SOD1. En algunas formas de realización, la cápside está compuesta de 60 proteínas virales (VP1, VP2, VP3), por ejemplo, en una proporción de 1:1:10 producidas por empalme alternativo de modo que VP2 y VP3 sean dos formas truncadas de VP1, todo con secuencias C-terminales comunes. En algunas formas de realización, el producto del proceso de fabricación, por ejemplo, un producto farmacológico, puede comprender una cápside de AAV9 recombinante, no replicante para entregar un transgén de SMN humano completamente funcional, estable, a un transgén de MECP2, o un anti-ARNsh de SOD1. En algunas formas de realización, la cápside está compuesta de 60 proteínas virales (VP1, VP2, VP3) en una

proporción de 1:1:10 producidas por empalme alternativo de modo que VP2 y VP3 sean dos formas truncadas de VP1, todo con secuencias C-terminales comunes.

En algunas formas de realización, la cantidad de vectores virales funcionales se determina por el % de vg/ml funcional medido usando un ensayo celular in vitro o un modelo animal in vivo adecuado. Por ejemplo, el % de AAV de SMN funcional puede ser analizado por potencia relativa usando un modelo animal de AME, por ejemplo, el ratón AMEΔ7, o un ensayo cuantitativo basado en células usando una línea celular adecuada, por ejemplo, células progenitoras neurales primarias (NPCs) aisladas de la corteza de ratones AMEΔ7. El % de AAV de MeCP2 funcional puede evaluarse usando un ensayo celular in vitro o un modelo animal in vivo adecuado, por ejemplo, un ratón knockout *Mecp2*. El % de AAV de SOD1 funcional puede evaluarse usando un ensayo celular in vitro o un modelo animal in vivo adecuado, por ejemplo, un ratón mutante *SOD1*.

La secuencia de ADN de un ejemplo de constructo de vector, por ejemplo, AVXS-101 está descrita en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de ADN de la Construcción del Vector AVXS-101, Sumario de Componentes (todas las posiciones de inicio y parada nt están en relación con la SEQ ID NO: 1).

	Posición de Inicio	Posición de Parada	Tamaño (nt)	Descripción	Descripción no limitativa de beneficios potenciales
ITR de AAV2 mutada "izquierda"	1	106	106	Modificación a la ITR "izquierdo" eliminando el sitio de resolución terminal para permitir la formación del genoma en horquilla	Sin limitarse a la teoría, esta ITR mutada puede permitir un vector auto complementario de segunda generación para maximizar la potencia del vector, permitiendo dosis sistémicas más bajas
Potenciador de CMV/Promotor de CB	153	432	280	Porción del potenciador inmediato/temporano de CMV	Sin limitarse a la teoría, esto puede permitir una expresión constitutiva de SMN de alto nivel
	439	704	266	Promotor mínimo de CB	
Intrón SV40	774	870	97	Intrón del SV40 (para mejorar la acumulación de	Sin limitarse a la teoría, esto puede permitir un

				nivel constante de ARNm para la traducción)	aumento de la expresión génica
ADNc de SMN humano	1003	1887	885	Modificado a partir del Acceso a Genbank #NM_017411	Sin limitarse a la teoría, esto puede permitir la expresión de una proteína de SMN de longitud completa
Señal de terminación de Poli A de la hormona de crecimiento bovino	1973	2204	232	Señal de Poli A de BGH	Sin limitarse a la teoría, esto puede proporcionar una Poli A del ARNm de SMN (señal de terminación de la transcripción) para una expresión génica eficiente de alto nivel
ITR de AAV2 “derecha”	2217	2359	143	ITR de AAV2 sin modificar	Sin limitarse a la teoría, esta ITR de AAV2 en cis puede proporcionar tanto la replicación del ADN viral como el empaquetamiento del genoma del vector de AAV

En otro aspecto, la secuencia de ADN del constructo del vector AVXS-101 está provista en la SEQ ID NO: 1:

```

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 50
5  ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg 100
gagtggaatt cacgcgtgga tctgaattca attcacgcgt ggtacctctg 150
gtcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga 200
ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa 250
tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatattacg gtaaactgcc 300
10 cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 350
cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct 400
tatgggactt tcctacttgg cagtacatct actcgaggcc acgttctgct 450
tactctccc catctcccc ccctccccac cccaatttt gtatttattt 500
atTTTTtaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg gggggggggc 550
15 cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga 600
gaggtgcggc ggcagccaat cagagcgggc cgctccgaaa gtttcctttt 650
atggcgaggc ggcggcgggc gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg 700

```

ggcgggagcg ggatcagcca ccgcggtggc ggcctagagt cgacgaggaa 750
 ctgaaaaacc agaaagttaa ctggtaagtt tagtcttttt gtctttttatt 800
 tcagggtccc gatccggtgg tgggtgcaa caaagaactg ctcctcagtg 850
 gatgttgcc tttacttctag gcctgtacgg aagtgttact tctgctctaa 900
 5 aagctgcgga attgtacccg cggccgatcc accggtccgg aattcccggg 950
 atatcgtcga cccacgcgtc cgggccccac gctgcgcacc cgcggggtttg 1000
 ctatggcgat gagcagcggc ggcagtgggtg gcggcggtccc ggagcaggag 1050
 gattccgtgc tgttccggcg cggcacaggc cagagcgatg attctgacat 1100
 ttgggatgat acagcactga taaaagcata tgataaagct gtggcttcat 1150
 10 ttaagcatgc tctaaagaat ggtgacattt gtgaaacttc gggtaaacca 1200
 aaaaccacac ctaaaagaaa acctgctaag aagaataaaa gccaaaagaa 1250
 gaatactgca gcttccttac aacagtggaa agttggggac aaatgttctg 1300
 ccatttggtc agaagacggt tgcatttacc cagctaccat tgcttcaatt 1350
 gattttaaga gagaaacctg tgttggtggtt tacactggat atggaaatag 1400
 15 agaggagcaa aatctgtccg atctactttc cccaatctgt gaagtagcta 1450
 ataatataga acagaatgct caagagaatg aaaatgaaag ccaagtttca 1500
 acagatgaaa gtgagaactc caggtctcct ggaaataaat cagataacat 1550
 caagcccaaa tctgctccat ggaactcttt tctccctcca ccacccccca 1600
 tgccagggcc aagactggga ccaggaaagc caggtctaaa attcaatggc 1650
 20 ccaccaccgc caccgccacc accaccacc cacttactat catgctggct 1700
 gcctccattt ctttctggac caccaataat tccccacca cctcccatat 1750
 gtccagattc tcttgatgat gctgatgctt tgggaagtat gttaatttca 1800
 tgggtacatga gtggctatca tactggctat tatatgggtt ttagacaaaa 1850
 tcaaaaagaa ggaaggtgct cacattcctt aaattaagga gaaatgctgg 1900
 25 catagagcag cactaaatga caccactaaa gaaacgatca gacagatcta 1950
 gaaagcttat cgataccgtc gactagagct cgctgatcag cctcgactgt 2000
 gccttctagt tgccagccat ctgttggttg cccctcccc gtgccttcct 2050
 tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa 2100
 attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt 2150
 30 ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg 2200
 gggagagatc gatctgagga acccctagtg atggagttag cactccctc 2250
 tctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgc 2300
 gcccggtt tgccggggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag 2350
 ggagtggcc 2359 (SEQ ID NO: 1).

En algunas formas de realización, la secuencia de aminoácidos de la proteína SMN codificada por el plásmido de pSMN comprende:

MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDTALIKAYDKAVASFKHALKNGDIC
5 ETSGKPKTTPKRKPAKKNSQKKNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRE
TCVVVYTYGNGREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNI
KPKSAPWNSFLPPPPMPGPRLGPGKPLKFNGPPPPPPPPPHLLSCWLPPFPSPGPPPIPPPPPI
CPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGYMGRQNKQKEGRCSHSLN (SEQ ID NO: 2).

10 En algunas formas de realización, las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2, VP3 derivan de la misma transcripción. Presentan sitios de inicio alternativos pero comparten un término carboxi. A continuación, las secuencias de aminoácidos específicas de VP1 se indican en negro y en negrita. Las secuencias de aminoácidos comunes a VP1 y VP2 están subrayadas y en *cursiva*. Los aminoácidos comunes a las tres proteínas de la cápside están en negrita y en *cursiva*.

15 1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD
61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFG
121 AKKRILLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE
181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI
20 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR
301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH
361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV
421 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP
481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS
25 541 LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG
601 ILPGMVWQDR DVYLQGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT
661 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFVNTEGV
721 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO: 3).

30 En una forma de realización, las proteínas de la cápside de AAV derivan de una transcripción que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, se describen plásmidos de ADN que comprenden genomas de rAAV. Los plásmidos de ADN se transfieren a las células permitidas para la infección con un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con E1 eliminado o herpes virus) para ensamblar el genoma de rAAV en partículas virales infecciosas con proteínas de la cápside de AAV9. Las técnicas para producir partículas de rAAV, donde un genoma de AAV a empaquetar, los genes rep y cap, y las funciones de virus auxiliar se proporcionan a una célula son estándar en la técnica. En algunas formas de realización, la producción de rAAV involucra los siguientes componentes presentes dentro de una sola célula (indicada en la presente como célula de empaquetamiento): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados del (es decir, no en) genoma de rAAV, y funciones de virus auxiliar. La producción de rAAV seudotipado se divulga en, por ejemplo, WO 01/83692 que se incorpora por completo a la presente como referencia. En varias formas de realización, las proteínas de la cápside de AAV puede modificarse para mejorar la entrega del vector recombinante. Las modificaciones a las proteínas de la cápside son generalmente conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, US 2005/0053922 y US 2009/0202490, las cuales se incorporan por completo a la presente como referencia.

Los principios generales de la producción de rAAV están descriptos en, por ejemplo, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; y Muzyczka, 1992, *CUM Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129). Varios enfoques están descriptos en Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hennonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988); y Lebkowski et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); Patente Estadounidense Número 5,173,414; WO 95/13365 y la correspondiente Patente Estadounidense Número 5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; Patente Estadounidense Número 5,786,211; Patente Estadounidense Número 5,871,982; y Patente Estadounidense Número 6,258,595. Los documentos precedentes quedan incorporados por completo como referencia, con particular énfasis en aquellas secciones de los mismos relativas a la producción de rAAV.

Un ejemplo de método para generar una célula de empaquetamiento es crear una línea celular que exprese de manera estable todos los componentes necesarios para la producción de partículas de AAV. Por ejemplo, un plásmido (o múltiples plásmidos) que comprende un genoma de rAAV que

carece de los genes rep y cap de AAV, los genes rep y cap de AAV separados del genoma de rAAV, y un marcador seleccionable, como un gen de resistencia a la neomicina, se integran en el genoma de una célula. Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como la cola de GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79:2077-2081), adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasas de restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) o por ligadura directa de extremo romo (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). La línea celular de empaquetamiento se infecta con un virus auxiliar como el adenovirus. Las ventajas de este método son que las células son seleccionables y adecuadas para la producción a gran escala de rAAV. Otros ejemplos de métodos adecuados emplean adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genomas de rAAV y/o genes rep y cap en células de empaquetamiento.

Así la invención provee, en varias formas de realización, células de empaquetamiento que producen rAAV infecciosos. Las células de empaquetamiento pueden ser células no adherentes cultivadas en suspensión o células adherentes. En una forma de realización, se puede usar cualquier línea celular de empaquetamiento adecuada, tal como células HeLa, células HEK 293 y PerC.6 (línea 293 afín). En una forma de realización, la línea celular es células HEK 293.

Para aumentar el rendimiento de la producción viral del vector, las células adherentes pueden cultivarse y seleccionarse para una mejor adherencia a los matraces de cultivo. En algunas formas de realización, se mejora la eficiencia de la transfección y el recuento celular durante los siguientes pasos de siembra en el biorreactor. Durante el subcultivo, las células pueden separarse de la superficie del cultivo celular mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden levantarse raspando o incubando en una solución que comprende proteasas. En un ejemplo de forma de realización, las células HEK293 pueden lavarse con PBS y disociarse con tripsina durante ~ 2 minutos a temperatura ambiente. La disociación puede detenerse agregando medios de crecimiento que contengan suero, y los grupos de células pueden disociarse mediante pipeteo repetido de la suspensión. La suspensión celular se puede peletizar y el pellet aislado se puede resuspender en un medio de crecimiento completo adecuado. Luego las células se pueden sembrar en nuevas cámaras de cultivo celular y se deja que se adhieran. Las células que no se adhieren a la superficie después de un período de tiempo pueden eliminarse por aspiración suave con medios de cultivo celular, antes de que los medios de cultivo celular se reemplacen por completo con medios de crecimiento. En algunas formas de realización, el período de tiempo durante el cual las células pueden adherirse puede ser de aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas o aproximadamente 7 horas. Cuando las células se han expandido,

el proceso puede repetirse para aumentar la fracción de células que se adhieren fuertemente a los
matraces de cultivo. En algunas formas de realización, el proceso se repite por lo menos 2 veces, por
lo menos 3 veces, por lo menos 4 veces, por lo menos 5 veces, o cualquier número de veces. En un
ejemplo de forma de realización, las células HEK293 se siembran en un matraz de 75 cm², y se dejan
5 adherir durante 4 horas en la incubadora a 37°C antes de que se eliminen las células débilmente
adherentes mediante aspiración y reemplazo de los medios de cultivo. En un ejemplo de forma de
realización, el proceso de selección de células fuertemente adherentes se repite para tres pases de
cultivo celular.

10 En otras formas de realización, rAAV9 (es decir, partículas de rAAV9 infecciosas encapsidadas)
comprende un genoma de rAAV divulgado en la presente. En un aspecto, el genoma de rAAV es un
genoma auto complementario.

En otro aspecto, se proporcionan rAAVs como rAAV9 que se denomina "rAAV de SMN." En algunas
15 formas de realización, el genoma de rAAV de SMN tiene en secuencia una primera ITR de AAV2,
el promotor de actina β de pollo con un potenciador de citomegalovirus, un intrón SV40, un
polinucleótido que codifica SMN, una secuencia de señal de poliadenilación de la hormona de
crecimiento bovino, y una segunda ITR de AAV2. En algunas formas de realización, el polinucleótido
que codifica SMN es un gen de SMN humano, por ejemplo, descrito o derivado del Número de
20 Acceso a GenBank MN_000344.2, Acceso a Genbank #NM_017411, o cualquier otra isoforma de
SMN humano adecuada. Un ejemplo de secuencia de SMN comprende una secuencia de:

1 CCACAAATGT GGGAGGGCGA TAACCACTCG TAGAAAGCGT GAGAAGTTAC TACAAGCGGT
61 CCTCCCGGCC ACCGTACTGT TCCGCTCCCA GAAGCCCCGG GCGGCGGAAG TCGTCACTCT
121 TAAGAAGGGA CGGGGCCCCA CGCTGCGCAC CCGCGGGTTT GCTATGGCGA TGAGCAGCGG
25 181 CGGCAGTGGT GCGGCGGTCC CGGAGCAGGA GGATTCCGTG CTGTTCCGGC GCGGCACAGG
241 CCAGAGCGAT GATTCTGACA TTTGGGATGA TACAGCACTG ATAAAAGCAT ATGATAAAGC
301 TGTGGCTTCA TTTAAGCATG CTCTAAAGAA TGGTGACATT TGTGAAACTT CGGGTAAACC
361 AAAAACCACA CCTAAAAGAA AACCTGCTAA GAAGAATAAA AGCCAAAAGA AGAATACTGC
421 AGCTTCCTTA CAACAGTGGA AAGTTGGGGA CAAATGTTCT GCCATTTGGT CAGAAGACGG
30 481 TTGCATTTAC CCAGCTACCA TTGCTTCAAT TGATTTTAAG AGAGAAACCT GTGTTGTGGT
541 TTCACTGGA TATGGAATA GAGAGGAGCA AAATCTGTCC GATCTACTTT CCCCAATCTG
601 TGAAGTAGCT AATAATATAG AACAGAATGC TCAAGAGAAT GAAAATGAAA GCCAAGTTTC
661 AACAGATGAA AGTGAGAACT CCAGGTCTCC TGGAATAAAA TCAGATAACA TCAAGCCCAA
721 ATCTGCTCCA TGGAATCTT TTCTCCCTCC ACCACCCCCC ATGCCAGGGC CAAGACTGGG
35 781 ACCAGGAAAG CCAGGTCTAA AATTCAATGG CCCACCACCG CCACCGCCAC CACCACCACC
841 CCACTTACTA TCATGCTGGC TGCTTCCATT TCCTTCTGGA CCACCAATAA TTCCCCCACC
901 ACCTCCCATA TGTCCAGATT CTCTTGATGA TGCTGATGCT TTGGGAAGTA TGTTAATTTT
961 ATGGTACATG AGTGGCTATC ATACTGGCTA TTATATGGGT TTCAGACAAA ATCAAAAAGA
1021 AGGAAGGTGC TCACATTCTT TAAATTAAGG AGAAATGCTG GCATAGAGCA CCACTAAATG
40 1081 ACACCACTAA AGAAACGATC AGACAGATCT GGAATGTGAA GCGTTATAGA AGATAACTGG
1141 CCTCATTTCT TCAAAATATC AAGTGTTGGG AAAGAAAAAA GGAAGTGGA TGGGTAATCT
1201 TTCTTGATTA AAAGTTATGT AATAACCAAA TGCAATGTGA AATATTTTAC TGGACTCTTT
1261 TGAAAAACCA TCTGTAAAAG ACTGGGGTGG GGGTGGGAGG CCAGCACGGT GGTGAGGCAG
1321 TTGAGAAAAT TTGAATGTGG ATTAGATTTT GAATGATATT GGATAATTAT TGGTAATTTT

1381 ATGGCCTGTG AGAAGGGTGT TGTAAGTTTAT AAAAGACTGT CTTAATTTGC ATACTTAAGC
1441 ATTTAGGAAT GAAGTGTTAG AGTGTCTTAA AATGTTTCAA ATGGTTTAAC AAAATGTATG
1501 TGAGGCGTAT GTGGCAAAAT GTTACAGAAT CTAAGTGGTG GACATGGCTG TTCATTGTAC
1561 TGTTTTTTTC TATCTTCTAT ATGTTTAAAA GTATATAATA AAAATATTTA ATTTTTTTTT
1621 A (SEQ ID NO: 4).

5

También se contemplan sustituciones de nucleótidos conservadoras de ADN de SMN (por ejemplo, un cambio de guanina a adenina en la posición 625 del Número de Acceso a GenBank NM_000344.2). En algunas formas de realización, el genoma carece de ADN de AAV rep y cap, es decir, no hay ADN de AAV rep o cap entre las ITRs del genoma. Los polipéptidos SMN
10 contemplados incluyen, entre otros, el polipéptido SMN1 humano establecido en el número de base de datos de proteínas NCBI NP_000335.1. En ciertas formas de realización el ADN de SMN comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido SMN humano (por ejemplo la proteína humana de SMN identificada por el Número de Acceso Uniprot Q16637, isoforma 1 (Q16637-1)). También se contempla el polipéptido modificador de SMN1 plastina-3 (PLS3) [Oprea et al., Science
15 320(5875): 524-527 (2008)]. Las secuencias que codifican otros polipéptidos pueden ser sustituidas para el ADN de SMN.

20

Previo a la transfección, las células se expanden en medios de cultivo adecuados, en matraces o en un biorreactor adecuado, o en ambos. En algunas formas de realización, las células pueden expandirse
20 en biorreactores que proporcionan la circulación continua de medios de cultivo celular. En una forma de realización, las células son expandidas en biorreactores de 200 m², 333 m², o 500 m² iCELLis. Un medio de cultivo es DMEM con 5-10% FBS, 4,5 g/L glucosa, 4 mM L-glutamina. En algunas formas de realización, las células adherentes se agregan a los medios en una bolsa de medios de recirculación y circulan a través del biorreactor. En algunas formas de realización, los medios de cultivo celular o
25 cualquier otro medio se recirculan continuamente a través del biorreactor utilizando una bomba peristáltica. Las células se pueden sembrar a una densidad adecuada en los matraces o biorreactores para el cultivo y la transfección. La densidad de siembra puede depender del tipo de célula y la cantidad de tiempo hasta la transfección. En algunas formas de realización, las células se siembran a aproximadamente 8000-16000 células/cm². En una forma de realización, las células HEK293 se
30 siembran a 8000-12,000 células/cm².

25

30

Los métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto son conocidos en la técnica. En una forma de realización, las células pueden transducirse in vitro combinando rAAV con las células, por ejemplo, en medios apropiados, y seleccionando aquellas
35 células que albergan el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como transferencias Southern y/o PCR, o mediante el uso de marcadores seleccionables.

En algunas formas de realización, se transfecta una línea celular de empaquetamiento con tres plásmidos: un plásmido que codifica o que comprende la secuencia del vector a empaquetar dentro del vector de AAV (por ejemplo, pSMN, transgén de MECP2, o pSOD1sh), pHELP y pAAV2/9. La transfección se puede realizar usando cualquiera de las técnicas conocidas en el arte, incluyendo, entre otras, electroporación, lipofección, por ejemplo con una lipofectamina, polímeros catiónicos y lípidos catiónicos. Se puede usar cualquier medio de transfección adecuado. En una forma de realización del proceso de transfección, las células embrionarias de riñón humano adherentes (HEK293) se transfectan con una coprecipitación de polietilenimina (PEI) de plásmido de ADN triple. En una forma de realización, un vector de scAAV9.CB.SMN (un vector de AAV9 auto complementario que comprende un promotor CB y un polinucleótido que codifica SMN) se produce utilizando transfección de plásmido de ADN triple en células HEK293 adherentes utilizando una coprecipitación de PEI en un biorreactor de células adherentes a gran escala. En una forma de realización, el medio de crecimiento DMEM utilizado para la expansión celular se reemplaza con un medio de transfección DMEM modificado. Este medio se formula sin calcio y L-glutamina. En una forma de realización, el medio de transfección es DMEM sin FBS, sin calcio, sin L-glutamina y 4,5 g/L glucosa. En algunas formas de realización, los medios de transfección sin suero (por ejemplo, sin FBS) mejoran la eficacia de la transfección. En una forma de realización, el medio de transfección es OptiMEM (Invitrogen/Thermo Fisher). En una forma de realización, los tres plásmidos (pSMN, pHELP y pAAV2/9) se mezclan con PEI en el medio de transfección y se dejan reaccionar. En algunas formas de realización, los tres plásmidos se mezclan bajo una relación molar de aproximadamente 1:1:1. En algunas formas de realización, los plásmidos y PEI se mezclan en una proporción de 1:1 en peso de ADN:PEI. En algunas formas de realización, los plásmidos y PEI se mezclan en una proporción de menos de 1:1 en peso de ADN:PEI. En una forma de realización, pSMN, pHELP y pAAV2/9 se mezclan en una relación molar de 1:1:1 en medio OptiMEM. En tal forma de realización, se agrega el PEI de modo que ADN:PEI sea 1:1 en peso. En algunas formas de realización, la reacción se deja proceder durante 0-60 minutos, o 10-45 minutos, o 20-30 minutos. En una forma de realización, la reacción se deja proceder durante 15-30 minutos.

En una forma de realización, la presente invención provee un método de fabricación de un vector viral basado en AAV que comprende los pasos de (i) cultivar las células HEK293 adherentes en un biorreactor a escala industrial, (2) transfectar las células adherentes con los plásmidos durante menos de 60 minutos para permitir la producción del vector de AAV, y opcionalmente implementar etapas adicionales de procesamiento, purificación, formulación y llenado para producir un producto

farmacéutico. En una forma de realización de este proceso, el vector scAAV9.CB.SMN se produce usando transfección de ADN de plásmido triple aplicando una coprecipitación con polietilenimina (“PEI”). En una forma de realización, los 3 plásmidos utilizados para esta transfección son pSMN, pAAV2/9, y pHELP.

5

La transfección puede realizarse poniendo en contacto la línea celular de empaquetamiento con el coprecipitado de ADN-PEI. En algunas formas de realización, el coprecipitado de ADN-PEI en medios de transfección se coloca en una bolsa de recirculación de medios. En algunas formas de realización, el coprecipitado de ADN-PEI en medios de transfección circula en el biorreactor y desplaza completamente los medios de crecimiento. En algunas formas de realización, el coprecipitado de ADN-PEI en medios de transfección se deja entrar en contacto con las células adherentes en el biorreactor. En algunas formas de realización, el coprecipitado de ADN-PEI en medios de transfección se deja entrar en contacto con las células adherentes en el biorreactor durante hasta dos horas. En algunas formas de realización, la transfección se produce durante una o dos horas. En algunas formas de realización, la transfección se produce durante menos de una hora, por ejemplo, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos o 50 minutos. En algunas formas de realización, la transfección se produce durante una o dos horas. En algunas formas de realización, la transfección se interrumpe haciendo recircular el medio de crecimiento completo por el biorreactor y desplazando por completo el medio de transfección.

20

2. Cosecha de las Partículas Virales Expandidas

Luego de un período de expansión celular adecuado después de la transfección, en algunas formas de realización, las células se lisan y se cosechan las partículas virales. En algunas formas de realización, las células se disocian del reactor antes de que se inicie el proceso de lisis celular. En algunas formas de realización, las células se lisan in situ. Opcionalmente, las partículas virales se cosechan sin lizar. En algunas formas de realización, se agrega una endonucleasa, por ejemplo, circulada en el biorreactor a una concentración objetivo final. La endonucleasa puede ser una que degrade tanto ADN como ARN. En una forma de realización, la endonucleasa es una endonucleasa genéticamente modificada de *Serratia marcescens* (Eaves, G. N. et al. J. Bact. 1963, 85, 273-278; Nestle, M. et al. J. Biol. Chem. 1969, 244, 5219-5225) que se comercializa bajo la marca Benzonase® (EMD Millipore). La enzima se produce y purifica a partir de la cepa W3110 de *E. coli*, un mutante de la cepa K12, que contiene el plásmido de producción pNUC1 (Patente Estadounidense Número 5,173,418, que se incorpora por completo a la presente como referencia). Estructuralmente, la proteína es un dímero de

30

245 aminoácidos idénticos, subunidades de aproximadamente 30 kDa con dos enlaces disulfuro importantes. Benzonase® degrada todas las formas de ADN y ARN (monocatenario, bicatenario, lineal y circular) y es eficaz en una amplia gama de condiciones operativas, digiriendo ácidos nucleicos en oligonucleótidos terminados en 5'-monofosfato de 2-5 bases de longitud. Benzonase® se produce bajo las buenas prácticas de manufactura actuales (BPMA) y, por lo tanto, puede usarse en procesos a escala industrial para la purificación de proteínas y/o partículas virales. Otras endonucleasas que se producen en condiciones de BPMA también pueden usarse en los métodos de purificación descritos en esta solicitud. En una forma de realización, benzonase se agrega al biorreactor a una concentración final de entre 50 – 200 U/ml, por ejemplo, 75 – 150 U/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 U/mL. En algunas formas de realización la adición de Benzonase reduce en forma significativa el ADN de la célula huésped mientras permite una alta producción de vg en un biorreactor.

En algunas formas de realización, la endonucleasa se deja mezclar antes de agregar el tampón de lisis al reactor. En algunas formas de realización, la solución de lisis celular se deja mezclar con las células adherentes durante hasta 1 hora, hasta 2 horas, hasta 3 horas, hasta 4 horas o hasta 5 horas. En algunas formas de realización, el tampón de lisis puede comprender cloruro de magnesio y/o Tween-20 en un tampón adecuado. En un ejemplo de forma de realización, el tampón de lisis es 500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM MgCl₂, pH 8,0. Una Solución de Sal de Sacarosa (SSS) que apaga la reacción de Benzonase puede agregarse para detener la reacción de lisis. En algunas formas de realización, la SSS se agrega a una bolsa de cosecha que comprende tampón de enjuague y se mezcla durante 15 minutos. En algunas formas de realización, el biorreactor se enjuaga con un Tampón de Enjuague de Biorreactor, y luego se recolecta el enjuague en la bolsa de recolección de cosecha, junto con la solución de lisis de células apagada y el contenido de células lisadas, que en conjunto constituyen la cosecha a granel. En algunas formas de realización, el Tampón de Enjuague de Biorreactor puede comprender Tris, MgCl₂, NaCl, Tween-20 y sacarosa. En un ejemplo de forma de realización, el Tampón de Enjuague de Biorreactor comprende 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 1% Tween-20 p/v y 1% sacarosa p/v a un pH de 8,1.

3. Purificación de las Partículas Virales

Luego de la cosecha, las partículas virales de la cosecha a granel pueden concentrarse y purificarse, típicamente por filtración. En una forma de realización, las partículas virales se filtran por filtración profunda seguida de filtración a través de un filtro que elimina los contaminantes de moléculas

grandes y restos celulares, por ejemplo un filtro de 0,45 μm , pero que permite que los genomas de vector pasen a través de ellos. Se puede usar cualquier filtro de profundidad adecuado.

Tal como se entiende en la técnica, la filtración profunda se refiere al uso de un medio filtrante poroso para clarificar soluciones que contienen cantidades significativas de partículas grandes (por ejemplo, células intactas o desechos celulares) en comparación con la filtración por membrana que se obstruiría rápidamente en tales condiciones. Una variedad de medios de filtración profunda de diferentes tamaños de poro está disponibles comercialmente a través de diversos fabricantes como Millipore, Pall, General Electric, y Sartorius.

La tasa de flujo objetivo para la filtración de profundidad puede reducirse para mantener la presión de entrada del filtro dentro de las especificaciones. Una vez que se ha filtrado toda la cosecha a granel, el filtro de profundidad puede, en ciertas formas de realización, ser arrastrado con el tampón de diafiltración utilizado para un primer paso posterior de filtración de flujo tangencial ("FFT1"). El conjunto de filtro de profundidad es mixto. El conjunto de filtro de profundidad se puede filtrar a través de un filtro de 0,45 μm para aclarar adicionalmente el material de cosecha a granel. El filtro de 0,45 μm luego se arrastra con el tampón de FFT1.

4. Filtración de Flujo Tangencial

En varias formas de realización, se usa filtración de flujo tangencial para concentrar la cosecha a granel y eliminar sales y proteínas. La Filtración de Flujo Tangencial (FFT) (también denominada Filtración de Flujo Cruzado CFF) es muy conocida por los expertos en la técnica y los equipos y protocolos para su implementación en una amplia gama de situaciones están disponibles comercialmente de una variedad de fabricantes, entre otros, Pall Corporation, Port Washington, NY y Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA. En general, la FFT puede implicar la recirculación del retenido a través de la superficie de la membrana. Esta alimentación de flujo cruzado suave puede, en ciertas formas de realización, minimizar el ensuciamiento de la membrana, mantener una alta tasa de filtración y proporcionar una alta recuperación del producto. En una forma de realización, la etapa de FFT puede implementarse con un sistema de lámina plana, según se ejemplifica en la presente. Los sistemas de láminas planas se pueden usar en la producción a gran escala donde están provistos de un medio (por ejemplo, un canal de flujo abierto) para evitar fuerzas de corte excesivas sobre las partículas virales. Alternativamente, la etapa FFT puede implementarse con un sistema de fibra hueca, según se ejemplifica en la presente. En una forma de realización, el Peso Molecular de

Corte (PMCO) del sistema FFT oscila entre 200-400 kDa, por ejemplo, aproximadamente 300 kDa.

En una forma de realización, la etapa de FFT1 se ejecuta usando casete de membrana de celulosa regenerada de corte de 300 kDa de peso molecular de corte. El casete se lava y se sanitiza con solución de NaOH y se equilibra con tampón de FFT1. En una forma de realización, el tampón de FFT1 comprende 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 1% Sacarosa, pH 8,1.

En algunas formas de realización, la fase de concentración de la etapa FFT1 se selecciona para reducir el volumen de la cosecha clarificada aproximadamente 10x. Una vez que se alcanza el volumen de retenido deseado, se pueden iniciar las operaciones de diafiltración. El retenido puede, en algunas formas de realización, ser diafiltrado con aproximadamente 6 diavolúmenes de tampón de FFT1. En algunas formas de realización, el retenido es diafiltrado con aproximadamente 5-20, o 10-15, o 12 diavolúmenes de tampón de FFT1. Una vez que se han alcanzado 6 diavolúmenes de flujo total de permeado, el retenido puede concentrarse nuevamente y cosecharse. Los enjuagues, por ejemplo, dos enjuagues sucesivos de la membrana, se pueden ejecutar para aumentar la recuperación de producto de la sustancia farmacológica intermedia.

5. Producto Intermedio

En algunas formas de realización, la sustancia farmacológica intermedia puede congelarse en hielo seco o en un congelador y luego transferirse a <-60 ° C de almacenamiento. En otras formas de realización, el producto intermedio no necesita ser congelado antes de proceso aguas abajo.

En algunas formas de realización, múltiples lotes de sustancia de producto intermedio se agrupan para su procesamiento adicional (por ejemplo, para su purificación en un proceso aguas abajo, por ejemplo, según lo descrito en la presente). Los múltiples lotes de sustancia de producto intermedio pueden agruparse antes de la congelación y el almacenamiento. En otras formas de realización, los múltiples lotes de sustancia de producto intermedio pueden agruparse después de descongelar los lotes congelados y almacenados.

PROCESO AGUAS ABAJO

En algunas formas de realización, un proceso aguas abajo se usa para procesar el producto intermedio (por ejemplo el producto intermedio agrupado) en una sustancia farmacológica filtrada. En algunas

formas de realización, los pasos del proceso aguas abajo incluyen: (a) acidificación y clarificación (por ejemplo, usando filtración), (b) cromatografía de intercambio catiónico, (c) filtración de flujo tangencial (“FFT2”), (d) ultracentrifugación en CsCl, (e) recolección de vectores virales y (f) filtración de flujo tangencial adicional (“FFT3”) para producir una sustancia farmacológica filtrada donde las partículas de AAV purificadas se suspenden en un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas formas de realización, el proceso aguas abajo presenta los siguientes pasos de fabricación posteriores a la producción del intermedio de FFT1: descongelar y agrupar el intermedio de FFT1, acidificación y clarificación, cromatografía de intercambio catiónico (CEX), filtración de flujo tangencial (FFT2), ultracentrifugación en CsCl para la Separación de Cápsides Llenas/Vacías, filtración de flujo tangencial (FFT3) para Concentración/Intercambio de Tampones, filtración del material de FFT 3 para generar la sustancia farmacológica, dilución y filtración de la sustancia farmacológica para producir el producto farmacológico, almacenamiento del producto farmacológico y llenado del producto farmacológico en viales.

En algunas formas de realización, el proceso aguas abajo divulgado en la presente puede ser usado para procesar un intermedio que comprende un AAV de SMN, un AAV de MECP2, o un AAV que codifica ARNsh dirigido a SOD1 según lo descrito en la presente.

1. Acidificación y Clarificación del Intermedio

En las formas de realización donde el intermedio está congelado, el proceso aguas abajo comienza descongelando el material del intermedio de FFT1. Un detergente, por ejemplo, Tween 20, puede usarse para promover la floculación de la mayor parte de las proteínas de la célula huésped y el ADN a pH ácido. El pH del detergente que contiene el intermedio de FFT1 puede entonces reducirse. El floculante y el precipitado que se forman cuando se baja el pH se pueden eliminar filtrando la solución a través de un filtro de profundidad y un filtro que elimine los contaminantes de moléculas grandes y los desechos celulares, por ejemplo, un filtro de 0,45 µm, pero que permita el paso de genomas de vector. Se puede usar cualquier filtro de profundidad adecuado.

En una forma de realización, Tween 20 se agrega lentamente a la solución de intermedio de FFT1 para lograr una concentración final de entre 10 - 20% de Tween 20. En algunas formas de realización, la composición objetivo después de la adición de Tween 20 es 36% de solución de Tween 20 en 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 1% Sacarosa m/v, pH 8,1. En algunas formas de realización, Tween 20 se agrega lentamente durante un lapso de aproximadamente 1 - 6 horas. En algunas formas

de realización, Tween 20 se agrega lentamente durante 3-6 horas. En algunas formas de realización, Tween 20 se agrega lentamente durante 4 horas. En algunas formas de realización, la solución de Tween 20/Intermedio FFT1 se deja incubar durante la noche a temperatura ambiente. En alguna forma de realización, la solución de Tween 20/Intermedio FFT1 se deja incubar durante 8-20 horas a temperatura ambiente. En un ejemplo de forma de realización, la solución de Tween 20/Intermedio FFT1 se deja incubar durante 12-20 horas a temperatura ambiente.

Luego de la incubación el pH del intermedio de FFT1 que contiene Tween 20 puede reducirse agregando cualquier ácido adecuado. En algunas formas de realización, 1M de glicina pH 2,5 se agrega para lograr un pH objetivo de $3,5 \pm 0,1$. En algunas formas de realización, el pH objetivo es pH 3,0 – 4,0, aproximadamente pH 3,3 - 3,7, aproximadamente pH 3,4 - 3,6, o aproximadamente pH 3,5. Una vez que el pH está dentro del rango aceptable, la solución puede pasar a través de filtros de cualquier tamaño. En un ejemplo de forma de realización, se usa un filtro de profundidad (por ejemplo, Clarisolve POD) en línea con un filtro de 0,45 μm (por ejemplo, un filtro Opticap XL10 Durapore) o un filtro PES de 0,8/0,45 μm .

2. Cromatografía de intercambio catiónico

En varias formas de realización, se usa una etapa de cromatografía de captura de intercambio catiónico (CEX), por ejemplo, para separar las cápsides virales de las proteínas de la célula huésped, el ADN de célula huésped, los lípidos de la célula huésped, Tween 20 y otras impurezas relacionadas con el proceso. Los principios de la cromatografía de intercambio catiónico son bien conocidos en la técnica, pero, brevemente, este método se basa en las interacciones carga-carga entre las partículas cargadas positivamente a aislar y la resina cargada negativamente. En general, la columna primero se equilibra pasando unos pocos diavolumenes de tampón hasta que el pH y la conductividad se estabilizan. Luego se carga la muestra y la columna se lava con un tampón de carga. Finalmente, se usa un tampón de elución para eluir la muestra de interés de la columna, y las fracciones que contienen la muestra son recolectadas. La presencia de la muestra de interés se puede detectar mediante mediciones de absorbancia óptica del eluyente.

En una forma de realización, la etapa CEX utiliza una columna CIMmultus S03-8000 Advanced Composite Column (sulfonilo) (poros de 2 μm). En una forma de realización, el pico de elución se recoge a partir de un fuerte aumento en OD280. El OD280 comenzará a aumentar cuando la conductividad esté entre 80-85 mS/cm. El eluato de CEX puede recogerse de acuerdo con procedimientos de rutina y en dos fracciones. En una forma de realización, la primera fracción

comienza con un fuerte aumento en OD280 y se recolecta para 1,5 volúmenes de recolección (CV). En otra forma de realización, la segunda fracción comienza inmediatamente después de la primera fracción y se recoge para 1,0 CV. Las dos fracciones se agrupan y luego se neutralizan a pH $8,0 \pm 0,30$. En una forma de realización, un tampón de neutralización comprende 1,0 M Tris pH $9,1 \pm 0,1$ a 20°C.

3. Filtración de Flujo Tangencial 2

En algunas formas de realización, se usa una etapa de filtración de flujo tangencial (FFT2) para concentrar, eliminar las impurezas proteicas e intercambiar el tampón por un tampón apropiado para la posterior etapa de ultracentrifugación en CsCl. Se puede usar cualquier membrana FFT adecuada. En una forma de realización, el paso FFT2 utiliza membranas de celulosa regeneradas PMCO 300kD.

En algunas formas de realización, la fase de concentración de este paso está diseñada para reducir el volumen del eluato de la CEX. En una forma de realización, el retenido se diluye 2 veces con un tampón de diafiltración y se concentra a su volumen inicial. En una forma de realización, el tampón de diafiltración es el tampón de diafiltración FFT2 NaCl que contiene Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM, Poloxámero 188 al 0,2%, Sacarosa al 1%, pH $8,1 \pm 0,1$ a 20 °C. En tales realizaciones, este proceso puede repetirse hasta que se complete la diafiltración con el nuevo tampón. En una forma de realización, el retenido se diluye 2 veces con un tampón de diafiltración que contiene CsCl y el producto retenido se concentra a su volumen inicial. En una forma de realización, el tampón de diafiltración que contiene CsCl es el tampón de diafiltración FFT2 CsCl que contiene Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, CsCl 3 M, Poloxámero 188 al 0,2%, pH $8,1 \pm 0,1$ a 20°C. En tales realizaciones, este proceso puede repetirse hasta que se complete la diafiltración con el nuevo tampón. Una vez que se completa la diafiltración de CsCl, el producto retenido puede concentrarse a un volumen prescrito que depende del volumen de retención del sistema. En algunas formas de realización, el enjuague, por ejemplo, dos enjuagues sucesivos de la membrana, se ejecuta para maximizar la recuperación del producto del sistema FFT2.

4. Ultracentrifugación en CsCl

En algunas formas de realización cuando se usa un AAV para la transducción de genes in vivo, el producto final de rAAV puede contener impurezas mínimas y partículas vacías. Dos métodos para purificar el vector de AAV son la ultracentrifugación utilizando un gradiente de iodixanol o un

gradiente de CsCl. Un estudio que comparó los dos métodos demostró que el iodixanol produjo vectores de AAV con mayor pureza, pero más cápsides virales vacías en comparación con CsCl. Strobel et al. “Comparative Analysis of Cesium Chloride- and Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications.” Human Gene Therapy Methods, 26(4):147-157. Si bien el uso de CsCl conduce a cantidades más bajas de cápsides virales vacías, el CsCl puede ser tóxico para las células y pueden ser necesarios múltiples pasos de purificación para eliminar el CsCl residual, lo que lleva a un largo tiempo de procesamiento (~ 3,5 días) en comparación con métodos más cortos como el iodixanol (~ 1 día) Un estudio diferente ha demostrado que los muchos pasos para eliminar el CsCl residual con frecuencia resultan en la pérdida dramática de rAAV, lo que lleva a bajos rendimientos y tasa de recuperación, impidiendo con frecuencia los otros beneficios del método. Hermens et al. “Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus by Iodixanol Gradient Ultracentrifugation Allows Rapid and Reproducible Preparation of Vector Stocks for Gene Transfer in the Nervous System.” Human Gene Therapy, 10:1885-1891. Además, si bien estos dos métodos funcionan bien en un laboratorio para producir muestras preclínicas, no son escalables y, por lo tanto, no son adecuados para la producción a gran escala de productos comerciales. Véase, por ejemplo, Tomono et al., “Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1).” Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 3:15058 (“purification methods using cesium chloride (CsCl) or iodixanol density ultracentrifugation are not suitable for large-scale production”).

En algunas formas de realización, se usa una etapa de ultracentrifugación, por ejemplo, para separar las cápsides vacías de las cápsides llenas. Inesperadamente, el método de ultracentrifugación en CsCl descrito en la presente fue escalable y adecuado para la producción a gran escala de vectores de AAV purificados. La ultracentrifugación puede ejecutarse por ultracentrifugación analítica y puede implicar el uso de tampones de gradiente. Los ejemplos de tampones de gradiente incluyen, pero no se limitan a, CsCl, sacarosa, iodixanol y otros conocidos en la técnica. La centrifugación se puede realizar en cualquier centrífuga capaz de alcanzar las fuerzas g deseadas, por ejemplo, un sistema automatizado Ultra Centrifuge Optima XPN 100 o un sistema equivalente equipado con rotor Tipo 50,2 Ti o rotor equivalente. Después de la ultracentrifugación, las cápsides vacías y las cápsides llenas se separan en diferentes bandas dentro del tubo, y pueden extraerse extrayendo material de una banda específica. En algunas formas de realización, el material filtrado purificado en FFT2 se centrifuga a 241,600-302,000 g (~40,000-50,000 rpm en rotor 50,2 Ti). En algunas formas de realización, el material filtrado purificado en FFT2 se centrifuga durante la noche. En algunas formas de realización,

el material filtrado purificado en FFT2 se centrifuga durante 16-24 horas. En algunas formas de realización, el material filtrado purificado en FFT2 se centrifuga durante 20-24 horas. En algunas formas de realización, el material filtrado purificado en FFT2 se centrifuga a 15-25°C. En una forma de realización, el material filtrado purificado en FFT2 se centrifuga a 302,000 g (50,000 rpm en rotor 5 50,2 Ti) durante 17 horas a 20°C. En algunas formas de realización, el tampón para la centrifugación en CsCl puede tener uno o más de los siguientes ingredientes, que comprenden (a) CsCl, que comprende además uno o más de (b) MgCl₂, (c) Poloxámero 188 y (d) Tris. En algunas formas de realización, el tampón para CsCl puede incluir todos de (a), (b), (c) y (d). En algunas formas de realización, el tampón para CsCl tiene un pH de 7,5-8,5, o pH 7,9-8,2. En una forma de realización, 10 un tampón adecuado para la centrifugación en CsCl es 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 3 M CsCl, 0,2% Poloxámero 188, pH 8,1 ± 0,10. Después de completar la etapa de centrifugación, los tubos pueden retirarse de la ultracentrífuga. En alguna forma de realización, la banda más alta, la Banda A, contiene las cápsides vacías. En algunas formas de realización, las siguientes bandas más altas, Bandas B, C y D, contienen las bandas de doblete de las cápsides completas. En algunas formas de realización, los 15 vectores virales de AAV son recolectados usando una jeringa. En una forma de realización, las bandas B, C y D se retiran con una aguja 18G montada a una jeringa de 30 ml insertada justo debajo de la banda D en el centro del tubo. En otras formas de realización, las bandas pueden analizarse para determinar la presencia de cápsides llenas o vacías usando técnicas conocidas en la técnica y/o según lo descrito en la presente, y las bandas que contienen cápsides llenas son recolectadas.

20

La proporción de cápsides virales vacías a no vacías se puede medir mediante técnicas de laboratorio estándar. En algunas formas de realización, la medición se realiza mediante mediciones de absorbancia óptica. En algunas formas de realización, la medición se realiza mediante mediciones de absorbancia UV. En algunas formas de realización, la cantidad total de proteínas de la cápside y la 25 cantidad total de ADN se pueden determinar a partir de mediciones de absorbancia UV. En algunas formas de realización, la medición se realiza mediante mediciones del índice de refracción óptica. En algunas otras realizaciones, la medición se realiza por ultracentrifugación analítica.

En una forma de realización, el vector viral AAV recolectado luego de la ultracentrifugación tiene 30 menos de 8 % de cápsides vacías, menos de 7 % de cápsides vacías, menos de 5%, menos de 3%, o menos de 1%. En una forma de realización, el vector viral AAV recolectado luego de la ultracentrifugación tiene 1-10 % de cápsides vacías. En una forma de realización, el vector viral AAV recolectado luego de la ultracentrifugación tiene 2-8 % de cápsides vacías. En una forma de

realización, el número de cápsides vacías es inferior al límite de detección. En otra forma de realización, el porcentaje de cápsides vacías se determina como un porcentaje del total de cápsides.

5. Filtración de flujo tangencial 3 para generar la sustancia farmacológica filtrada

5

En algunas formas de realización, se usa una etapa de filtración de flujo tangencial (FFT3) para eliminar el CsCl y concentrar las cápsides del vector llenas. La filtración de flujo tangencial puede realizarse usando membranas adecuadas. En una forma de realización, se utilizan membranas de celulosa regenerada de 300 kDa de PMCO. Las cápsides del vector pueden ser retenidas por las
10 membranas. La fase de concentración de la operación FFT3 puede diseñarse para reducir la concentración de CsCl residual y el volumen del pool de ultracentrifugación. En algunas formas de realización, una vez que se alcanza el volumen de retenido objetivo, se inicia la diafiltración. El retenido se diafiltra con hasta 10 diavolúmenes de un tampón de FFT3 adecuado. En una forma de realización un tampón de FFT3 adecuado puede incluir uno o más de los siguientes componentes,
15 que comprenden (a) Tris, (b) $MgCl_2$, (c) NaCl, o (d) Poloxámero 188. En una forma de realización, un tampón adecuado de FFT3 puede incluir todos de (a), (b), (c) y (d). En una forma de realización, el tampón de FFT3 tiene un pH de 7,5-8,5, pH 7,7-8,3, o pH 8,0. En una forma de realización un tampón adecuado de FFT3 comprende 20 mM Tris, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl, 0,001% Poloxámero 188, pH $8,0 \pm 0,1$ a 20°C. En otra forma de realización, un tampón adecuado de FFT3
20 comprende 20 mM Tris, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl, 0,005% Poloxámero 188, pH $8,0 \pm 0,1$ a 20°C. En una forma de realización, el retenido concentrado se filtra usando un filtro de 0,2µm Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade Filter (Mini Kleenpak) para producir una sustancia farmacológica filtrada. En algunas formas de realización, los métodos descriptos en la presente rinden más de 5×10^{15} vg, o más de 8×10^{15} vg o más de 1×10^{16} vg de rAAV por lote de fabricación.

25

Composiciones Farmacéuticas

Las partículas virales (por ejemplo, AAV) purificadas de acuerdo con los métodos descriptos en la presente pueden producirse con alto rendimiento y suficiente pureza para que puedan administrarse a un sujeto humano. En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración
30 de entre aproximadamente $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas de vector viral/mL (vg/mL), o aproximadamente $1,7 - 2,3 \times 10^{13}$ vg/mL. En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración de aproximadamente $1,9 - 2,1 \times 10^{13}$ vg/mL. En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración de aproximadamente $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL.

En algunas formas de realización, durante el proceso de producción del vector viral, se pueden generar cápsides virales vacías que no contienen material de ácido nucleico. Las composiciones farmacéuticas que comprenden bajas cantidades de cápsides virales vacías pueden ser ventajosas, ya que evitan exponer innecesariamente a pacientes, por ejemplo, lactantes, con sistemas inmunes inmaduros a material antigénico (cápsides vacías, proteína de la célula huésped, ADN de célula huésped) sin beneficio terapéutico. En algunas formas de realización, tales composiciones farmacéuticas pueden reducir las posibles reacciones a la infusión o respuestas inmunes más amplias y pueden mejorar la eficacia terapéutica. En comparación con las cápsides virales completas con material genómico, las cápsides vacías tienen densidades diferentes, lo que permite que las dos especies se separen por centrifugación en gradiente u otros métodos conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, las cápsides vacías se separan por ultracentrifugación. En algunas formas de realización, las cápsides vacías se separan por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. En otras formas de realización, las cápsides vacías se separan por ultracentrifugación en gradiente de iodixanol. En algunas formas de realización, las cápsides vacías se separan por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

La proporción de cápsides virales vacías a no vacías se puede medir mediante técnicas de laboratorio estándar. En algunas formas de realización, la proporción se mide por mediciones de absorbancia óptica. En algunas formas de realización, la proporción se mide mediante mediciones de absorbancia UV. En algunas formas de realización, la cantidad total de proteínas de la cápside y la cantidad total de ADN se pueden determinar mediante mediciones de absorbancia UV. En algunas formas de realización, la medición se determina mediante mediciones del índice de refracción óptica. En algunas otras formas de realización, la medición se determina por ultracentrifugación analítica.

Los altos niveles de cápsides vacías pueden plantear desafíos para la eficacia de los tratamientos con vectores virales. En una forma de realización, la composición farmacéutica tiene menos de 10 % de cápsides vacías, menos de 8 % de cápsides vacías, menos de 7%, menos de aproximadamente 5%, menos de 3%, menos de 1 % de cápsides vacías. En otra forma de realización, la composición farmacéutica tiene 1-10 % de cápsides vacías. En otra forma de realización, la composición farmacéutica tiene 2-8 % de cápsides vacías. En otra forma de realización, la composición farmacéutica tiene menos o hasta 6 % de cápsides vacías, 5 % de cápsides vacías, 4 % de cápsides vacías, 3 % de cápsides vacías, 2 % de cápsides vacías, o menos. En una forma de realización, el número de cápsides vacías es inferior al límite de detección. En otra forma de realización, el porcentaje de cápsides vacías se determina como un porcentaje del total de cápsides, por ejemplo,

- utilizando AUC. En algunas formas de realización, este bajo porcentaje de cápsides vacías mejora la eficacia del tratamiento y/o reduce los eventos adversos (por ejemplo, respuestas inflamatorias, daño hepático) luego de la administración a un paciente, por ejemplo, en comparación con las composiciones que tienen un mayor porcentaje de cápsides vacías. En algunas formas de realización, los métodos de preparación de vectores virales descritos en la presente proporcionan estos porcentajes mejorados de cápsides vacías, en comparación con los niveles obtenidos en métodos anteriores, por ejemplo, aquellos que no usan células adherentes y/o los métodos de purificación descritos en la presente.
- 10 Durante el proceso de producción del vector viral, la proteína residual de las células adherentes (por ejemplo células HEK293) utilizadas para generar los vectores virales puede no estar completamente separada. Las proteínas residuales de la célula huésped presentan un potencial de provocar una respuesta inmune. La cantidad de células huésped residuales se puede medir mediante cualquier técnica de laboratorio estándar que pueda distinguir entre las proteínas de la cápside viral y los
- 15 residuos de la proteína de célula huésped. En algunas formas de realización, la cantidad de proteínas residuales de la célula huésped puede medirse mediante cromatografía de exclusión iónica o de intercambio iónico. En algunas formas de realización, la medición se puede realizar mediante una transferencia Western con anticuerpos específicos de células parentales. En una forma de realización, la cantidad de proteína residual de la célula huésped puede medirse mediante un ensayo
- 20 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En algunas formas de realización, la cantidad de proteína residual de la célula huésped puede medirse mediante un kit comercial de ELISA. En algunas formas de realización, la cantidad de proteína residual de la célula huésped puede medirse mediante un kit de ELISA Cygnus Technologies HEK293 HCP.
- 25 En otra forma de realización, la proteína residual de la célula huésped en dicha composición farmacéutica es menor o igual a 5×10^6 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml, menor o igual a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/mL o 1×10^5 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml o menor o igual a 40 ng/ml por 1×10^{13} vg/ml. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende menos o hasta 5, 4, 3, 2, 1 o menos ng de proteína de célula huésped residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende menos o hasta 4 ng de
- 30 proteína de célula huésped residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

Durante el proceso de producción del vector viral, el ADN residual de la célula huésped de las células adherentes (por ejemplo células HEK293) o el ADN plasmídico residual transfectado para generar

los vectores virales puede no eliminarse por completo. El proceso de purificación (por ejemplo, acidificación, clarificación, filtración de flujo tangencial, etc.) elimina la mayor parte del ADN residual de la célula huésped o plasmídico. En una forma de realización, la medición de la cantidad de ADN residual de la célula huésped o plasmídico se realiza mediante PCR. En otra forma de realización, la medición de la cantidad de ADN residual de la célula huésped o plasmídico se realiza mediante PCR cuantitativa (qPCR) con cebadores específicos para la célula huésped o secuencias plasmídicas. En otra forma de realización, medición del ADN residual de la célula huésped o plasmídico se realiza mediante PCR de gotas digital (ddPCR). En una forma de realización, la cantidad de ADN plasmídico se determina usando un ensayo qPCR con cebadores específicos para la región del gen de resistencia a la kanamicina del plásmido. En otra forma de realización, la cantidad de ADN residual de la célula huésped se determina mediante kits comerciales de ensayo de qPCR, por ejemplo el kit resDNASEQ© Human Residual DNA Quantitation de ThermoFisher, Residual DNA Quantification Supermix de Biorad, o cualquier producto equivalente. La reducción de la cantidad residual de ADN de la célula huésped o plasmídico puede mejorar los resultados terapéuticos y tales composiciones pueden purificarse y/o seleccionarse para su uso en los tratamientos descritos en la presente.

En una forma de realización, el ADN residual de la célula huésped en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $1,7 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml, 1×10^5 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml. En una forma de realización, el ADN residual de la célula huésped en dicha composición farmacéutica es menor o igual a 3×10^5 , 2×10^5 , $1,1 \times 10^5$, 1×10^5 pg o menos por $1,0 \times 10^{13}$ vg. En ciertas formas de realización, el ADN residual de la célula huésped en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

En otra forma de realización, el ADN de plásmido residual en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $1,7 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml, 1×10^5 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml a $1,7 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml. En otra forma de realización, el ADN de plásmido residual en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

En una forma de realización, el ADN residual de la célula huésped en una composición farmacéutica es menor o igual a $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg y el ADN de plásmido residual en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

En una forma de realización, el ADN residual de la célula huésped en una composición farmacéutica es menor o igual a $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, y el ADN de plásmido residual en dicha composición farmacéutica es menor o igual a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, y la proteína de célula huésped residual en dicha composición farmacéutica es menor o igual a 4 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

5

En algunas formas de realización, la cantidad de endotoxina en la composición farmacéutica representa menos de aproximadamente 1 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,75 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,5 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,4 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,35 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,3 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,25 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,2 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,15 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,1 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menos de aproximadamente 0,05 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, o , menos de aproximadamente 0,02 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL. Los métodos para determinar la cantidad de endotoxina son conocidos en la técnica, por ejemplo, una prueba de lisado de amebocitos de limulus (LAL). En ciertas formas de realización, la endotoxina se analiza mediante U.S. Pharmacopeia (“USP”) <85> (se incorpora por completo a la presente como referencia).

10
15

En una forma de realización, la albúmina de suero bovino (BSA) en una composición farmacéutica representa menos de 0,5 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,3 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o menos de 0,22 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg. En una forma de realización, la Benzonase en dicha composición farmacéutica representa menos de 0,2 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 0,1 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, o menos de 0,09 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

20

En una forma de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende uno o más de los siguientes: menos de aproximadamente 0,09 ng de Benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente 30 µg/g (ppm) de cesio, aproximadamente 20-80 ppm de Poloxámero 188, menos de aproximadamente 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente $6,8 \times 10^5$ pg de ADN de plásmido residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente $1,1 \times 10^5$ pg de ADNhc residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de aproximadamente 4 ng de PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg, pH 7,7-8,3, aproximadamente 390-430 mOsm/kg, menos de aproximadamente 600 partículas de ≥ 25 µm de tamaño por envase, menos de aproximadamente 6000 partículas de ≥ 10 µm de tamaño por envase, aproximadamente $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genómico, un título infeccioso de aproximadamente $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg, un total de proteína de aproximadamente

25
30

100-300 μg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, supervivencia media de ≥ 24 días de ratones AME Δ 7 con aproximadamente $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg de dosis de vector viral, aproximadamente 70-130% de potencia relativa en base a un ensayo in vitro basado en células, y/o menos de aproximadamente 5% de cápsides vacías.

5

En una forma de realización una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende uno o más, por ejemplo, todos, de los siguientes: pH 7,7-8,3 (por ejemplo, medido de acuerdo con USP <791>), aproximadamente 390-430 mOsm/kg (por ejemplo, medido de acuerdo con USP <785>), menos de aproximadamente 600 partículas de $\geq 25 \mu\text{m}$ de tamaño por envase (por ejemplo, medido de acuerdo con USP <787>), menos de aproximadamente 6000 partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño por envase (por ejemplo, medido de acuerdo con USP <787>), aproximadamente $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genómico, un título infeccioso de aproximadamente $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg, un total de proteína de aproximadamente 100-300 μg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, supervivencia media de ≥ 24 días de ratones AME Δ 7 con aproximadamente $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg de dosis de vector viral, por ejemplo, en una prueba de funcionalidad in vivo, por ejemplo, según lo descrito en la presente, aproximadamente 70-130% de potencia relativa en base a un ensayo in vitro basado en células, y/o menos de aproximadamente 5% de cápsides vacías. En ciertas formas de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende una pureza total mayor que o igual a 95% (por ejemplo, según lo determinado por SDS-PAGE). En ciertas formas de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente no comprende una impureza relacionada no identificada a un nivel mayor que 2% (por ejemplo, según lo determinado por SDS-PAGE). En ciertas formas de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente comprende niveles de Endotoxina menores o iguales a 0,75 EU/mL (por ejemplo, medido de acuerdo con USP <85>). En ciertas formas de realización, una composición farmacéutica divulgada en la presente supera un ensayo de no crecimiento en una prueba de esterilidad, por ejemplo, medido de acuerdo con USP <71>.

Los altos niveles de proteína residual de la célula huésped, el ADN de la célula huésped, el ADN plasmídico y/o la endotoxina pueden plantear desafíos para la eficacia de los tratamientos con vectores virales. En algunas formas de realización, estas cantidades bajas de proteína residual de la célula huésped, ADN de la célula huésped, ADN plasmídico y/o endotoxina mejoran la eficacia del tratamiento y/o reducen los eventos adversos (por ejemplo, respuestas inflamatorias, daño hepático) luego de la administración a un paciente, por ejemplo, en comparación con composiciones que contienen mayores cantidades. En algunas formas de realización, los métodos de preparación de

vectores virales descritos en este la presente proporcionan estos niveles mejorados, en comparación con los niveles en métodos anteriores, por ejemplo, aquellos que no usan células adherentes y/o los métodos de purificación descritos en la presente. En algunas formas de realización, los métodos de la presente también permiten la preparación de vectores virales con porcentajes reducidos de cápsides vacías además de cantidades bajas de proteína residual de la célula huésped, ADN de la célula huésped, ADN plasmídico y/o endotoxina.

En algunas formas de realización, la cantidad de cesio residual luego de FFT, por ejemplo, la segunda FFT, es inferior a aproximadamente 50 µg/g. En algunas formas de realización, la cantidad de cesio residual luego de la FFT, por ejemplo, la segunda FFT, es inferior a aproximadamente 30 µg/g. En algunas formas de realización, la cantidad de cesio residual luego de la FFT, por ejemplo, la segunda FFT, es inferior a aproximadamente 20 ug/g. En algunas formas de realización, el cesio residual en la composición farmacéutica es menor o igual a 30 ug/g (ppm). En algunas formas de realización, la cantidad de residual CsCl puede medirse por espectrometría de masas, espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y/u otro método adecuado. En algunas formas de realización, la cantidad de cesio residual luego de la segunda FFT es inferior al límite de cuantificación, por ejemplo, usando ICP-MS.

En algunas formas de realización, la concentración de vectores virales de AAV recolectados luego de la segunda FFT es mayor o igual a aproximadamente 5×10^{12} vg/ml, mayor o igual a aproximadamente 1×10^{13} vg/ml, o mayor o igual a aproximadamente 3×10^{13} vg/ml.

En una forma de realización, una composición farmacéutica tiene uno o más de los siguientes: menos de 0,09 ng de Benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de 30 µg/g (ppm) de cesio, aproximadamente 20-80 ppm de Poloxámero 188, menos de 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $6,8 \times 10^5$ pg de ADN de plásmido residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos de $1,1 \times 10^5$ pg de ADNhc residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, y menos de 4 ng de PCHr por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica retiene una potencia de entre $\pm 20\%$, entre $\pm 15\%$, entre $\pm 10\%$, o entre $\pm 5\%$, de un estándar de referencia. En una forma de realización, la potencia se evalúa contra un estándar de referencia usando los métodos en Foust et al., Nat. Biotechnol., 28(3), pp. 271-274 (2010). Es posible utilizar cualquier estándar de referencia. En una forma de realización, la composición farmacéutica tiene potencia in vivo, según un ensayo con ratones AMEΔ7. En una forma de realización, un ratón al que se le administró una dosis de $7,5 \times 10^{13}$

vg/kg tiene una supervivencia media de mayor que 15 días, mayor que 20 días, mayor que 22 días o mayor que 24 días. En una forma de realización, la composición farmacéutica tiene una potencia relativa in vitro de acuerdo con un ensayo basado en células de 50-150%, 60-140% o 70-130% en relación con un estándar de referencia y/o un control adecuado.

5

Las partículas de virus purificadas de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, partículas virales) pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las composiciones de la divulgación pueden formularse para la administración a un sujeto mamífero, por ejemplo, un ser humano, usando técnicas conocidas en la técnica. En particular, los sistemas de administración pueden formularse para administración intramuscular, intradérmica, mucosa, subcutánea, intravenosa, intratecal, de depósito inyectable o tópica.

10

Cuando el sistema de administración se formula como una solución o suspensión, el sistema de administración se encuentra en un vehículo aceptable, por ejemplo, un portador acuoso. Puede usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,8%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas, o pueden filtrarse estérilmente. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tales, o liofilizarse, la preparación liofilizada se combina con una solución estéril antes de la administración.

15

20

Las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables para acercarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tampones, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un conservante. En algunas otras formas de realización, la composición farmacéutica no comprende un conservante.

25

El título genómico de los vectores virales, por ejemplo, los de las composiciones y formulaciones descritas en el presente documento, se puede determinar de varias maneras estándar. La PCR con cebadores específicos para el vector viral puede proporcionar mediciones relativas, aunque la PCR cuantitativa (qPCR) puede usarse para muestras más pequeñas y mediciones absolutas. La PCR de gotas digital (ddPCR) es un método para realizar PCR digital que se basa en la tecnología de gotitas

30

de emulsión de agua en aceite. Una muestra se fracciona en decenas de miles de gotitas, y la amplificación por PCR de las moléculas plantilla se produce en cada gotita individual. No es necesario hacer una curva estándar o tener cebadores con alta eficiencia de amplificación, por lo tanto, ddPCR no suele usar tanta muestra como las técnicas tradicionales basadas en PCR. En una forma de realización, el título genómico del vector viral se determina usando PCR. En otra forma de realización, el título genómico del vector viral se determina usando qPCR. En otra forma de realización, el título genómico del vector viral se determina usando ddPC. El método de determinación del título genómico viral usando ddPCR está descrito, por ejemplo, en Lock et al., “Absolute Determination of Single-Stranded and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vector Genome Titers by Droplet Digital PCR” *Human Gene Therapy Methods*, 25(2):115-125.

En algunas formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen al gen de SMN. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen al promotor de beta actina de pollo. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen al potenciador de CMV. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen a las secuencias ITR. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen a la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene aproximadamente un pH de 7,7-8,3 y tiene una osmolalidad de 390-430 mOsm/kg. En algunas formas de realización, el pH se mide usando un medidor de pH. En algunas formas de realización, el pH se mide potenciométricamente utilizando un microelectrodo con compensación de temperatura de acuerdo con los estándares establecidos por la United States Pharmacopeia (USP), por ejemplo, <791> (se incorpora por completo a la presente como referencia). En algunas formas de realización, la osmolalidad se mide usando depresión del punto de congelación de acuerdo con USP, por ejemplo, USP <785> (se incorpora por completo a la presente como referencia). En algunas formas de realización, la osmolalidad se mide usando un osmómetro de depresión de presión de vapor. En otras formas de realización, la osmolalidad se mide usando un osmómetro de membrana.

En una forma de realización, una formulación intravenosa tiene un pH entre 7,5 y 8,5, un título genómico de 2×10^{13} vg/ml - 6×10^{13} vg/ml, y una osmolalidad de 384 – 448 mOsm/kg. En otra forma de realización, una formulación intravenosa tiene un pH entre 7,5 y 8,5, un título genómico de $1,5 \times 10^{13}$ vg/ml – $3,5 \times 10^{13}$ vg/ml, y una osmolalidad de 384 – 448 mOsm/kg. En otra forma de realización, una formulación intravenosa tiene un pH entre 7,5 y 8,5, un título genómico de $1,8 \times 10^{13}$ vg/ml – $2,2 \times 10^{13}$ vg/ml, y una osmolalidad de 384 – 448 mOsm/kg. En una forma de realización, una formulación IV comprende aproximadamente 0,1-2,0 mM MgCl_2 . En una forma de realización, una formulación IV comprende aproximadamente 100-300 mM NaCl. En una forma de realización, una formulación IV comprende aproximadamente 0,001%-0,01% p/v de Poloxámero 188. En una forma de realización, una formulación IV es una formulación acuosa en 10-30 mM de tampón Tris, por ejemplo, a un pH de 7,5-8,5.

En una forma de realización, una formulación IV comprende 1 mM MgCl_2 , 200 mM NaCl, 0,005% p/v de Poloxámero 188, en 20 mM de tampón Tris a un pH de 8,0. En ciertas formas de realización, la formulación IV comprende un título genómico de aproximadamente 1×10^{13} a 3×10^{13} vg/mL o $1,7 \times 10^{13}$ a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL.

Usos de las composiciones farmacéuticas

En otras formas de realización, se divulgan métodos para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso central de un paciente, que comprende administrar un rAAV9 con un genoma que incluye el polinucleótido. En algunas formas de realización, el suministro es la administración intratecal de un polinucleótido al sistema nervioso central de un paciente que comprende administrar un rAAV9 con un genoma que incluye el polinucleótido. En algunas formas de realización, un agente de contraste no iónico de bajo osmolar también se administra al paciente. El agente de contraste no iónico de bajo osmolar aumenta la transducción de células diana en el sistema nervioso central del paciente. En algunas formas de realización, el genoma de rAAV9 es un genoma auto complementario. En otras formas de realización, el genoma de rAAV9 es un genoma monocatenario.

En algunas formas de realización, el polinucleótido se suministra a una región del cerebro. Las áreas del cerebro contempladas para el suministro incluyen, entre otras, la corteza motora y el tronco encefálico. En algunas formas de realización, el polinucleótido se suministra a la médula espinal. En algunas formas de realización, el polinucleótido se suministra a una neurona motora inferior. Las

realizaciones de la invención emplean rAAV9 para suministrar los polinucleótidos a las células nerviosas y gliales. En algunas formas de realización, la célula glial es una célula microglial, un oligodendrocito o un astrocito. En algunas formas de realización, el rAAV9 se utiliza para suministrar un polinucleótido a una célula de Schwann.

5

Los usos incluyen, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades de la neurona motora inferior, como la AME y ELA, así como la enfermedad de Pompe, trastornos de almacenamiento lisosómico, glioblastoma multiforme y enfermedad de Parkinson. Los trastornos de almacenamiento lisosómico incluyen, entre otros, deficiencia de activador/ gangliosidosis GM2, alfa-manosidosis, aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de colesteril éster, deficiencia crónica de hexosaminidasa A, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis, enfermedad de Gaucher (Tipo I, Tipo II, Tipo III), Gangliosidosis GM1 (infantil, infantil tardía/juvenil, adulta/crónica), enfermedad de células I/mucopolipidosis II, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre infantil/ISSD, deficiencia de hexosaminidasa juvenil A, enfermedad de Krabbe (inicio infantil, inicio tardío), leucodistrofia metacromática, Trastornos de mucopolisacaridosis (polidistrofia pseudo-hurler/mucopolipidosis IIIA, síndrome de MPSI Hurler, síndrome de MPSI Scheie, síndrome de MPS I Hurler-Scheie, síndrome de MPS II Hunter, síndrome de Sanfilippo Tipo A/MPS III A, síndrome de Sanfilippo Tipo B/MPS III B, síndrome de Sanfilippo Tipo C/MPS III C, síndrome de Sanfilippo Tipo D/MPS III D, Morquio Tipo A/MPS WA, Morquio Tipo B/MPS IVB, MPS IX Deficiencia de hialuronidasa, MPS VI Maroteaux-Lamy, Síndrome de MPS VII Sly, Mucopolipidosis I/Sialidosis, Mucopolipidosis IIIC, Mucopolipidosis tipo IV), Deficiencia de sulfatasa múltiple, Enfermedad de Niemann-Pick (Tipo A, Tipo B, Tipo C), Lipofuscinosis Neuronales Ceroides (enfermedad CLN6 (infantil tardía atípica, variante de inicio tardío, juvenil temprano), enfermedad de Batten-Spielmeyer-Vogt/NCL juvenil/CLN3, variante finlandesa infantil tardía CLN5, enfermedad de Jansky-Bielschowsky/enfermedad infantil tardía CLN2/TPP1, Enfermedad de Kufs/NCL/CLN4 de inicio en adultos, Epilepsia del norte/variante infantil tardía CLN8, Enfermedad de Santavuori-Haltia/CLN1/PPT, Beta-manosidosis, Enfermedad de Pompe/Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, Picnodisostosis, Enfermedad de Sandhoff/Inicio adulto/Gangliosidosis GM2, Enfermedad de Sandhoff/Gangliosidosis GM2 - Infantil, Enfermedad de Sandhoff/Gangliosidosis GM2 - Juvenil, Enfermedad de Schindler, Enfermedad de Salla/Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, Tay-Sachs/Gangliosidosis GM2, Enfermedad de Wolman.

En formas de realización adicionales, el uso de los métodos y materiales está indicado para el

tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, como Síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, o para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso, incluidos traumatismos/lesiones de la médula espinal y cerebrales, accidentes cerebrovasculares y cánceres cerebrales. En una forma de realización, el uso de los métodos y materiales está indicado para el tratamiento de la atrofia muscular espinal (AME).

Existen cuatro tipos de AME, que se clasifican convencionalmente por edad de inicio y función motora más alta alcanzada. Todas las formas de AME son de herencia autosómica recesiva y están causadas por mutaciones del gen de supervivencia de la neurona motora 1 (SMN1). Los humanos también llevan una segunda copia casi idéntica del gen de SMN denominada SMN2. Lefebvre *et al.* “Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene.” *Cell*, 80(1):155-65. Monani *et al.* “Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor-neuron specific disease.” *Neuron*, 48(6):885-896. Tanto los genes SMN1 como SMN2 expresan la proteína SMN, sin embargo, SMN2 contiene una mutación traslacionalmente silenciosa en el exón 7, lo que resulta en una inclusión ineficiente del exón 7 en las transcripciones de SMN2. Así, SMN2 produce proteína una SMN de longitud completa y una versión truncada de SMN que carece del exón 7, con la versión truncada como la forma predominante. Como resultado, la cantidad de proteína de longitud completa funcional producida por SMN2 es mucho menor (en un 70-90%) que la producida por SMN1. Lorson *et al.* “A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy.” *PNAS*, 96(11) 6307-6311. Monani *et al.* “A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2.” *Hum Mol Genet* 8(7):1177-1183. Aunque SMN2 no puede compensar por completo la pérdida del gen de SMN1, los pacientes con formas más leves de AME generalmente tienen números de copia SMN2 más altos. Lefebvre *et al.*, “Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy.” *Nat Genet* 16(3):265-269. Park *et al.*, “Spinal muscular atrophy: new and emerging insights from model mice.” *Curr Neurol Neurosci Rep* 10(2):108-117. Una salvedad es que el número de copias de SMN2 no es el único modificador fenotípico. En particular, la variante c.859G> C en el exón 7 del gen de SMN2 se ha informado como un modificador positivo de la enfermedad. Los pacientes con esta mutación particular tienen fenotipos de enfermedad menos graves. Prior *et al.*, “A positive modified of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene.” *Am J Hum Genet* 85(3):408-413.

La AME Tipo I (también denominada de inicio infantil o enfermedad de Werdnig-Hoffmann) se da cuando los síntomas de la AME están presentes al nacer o los 6 meses de vida. En este tipo, los bebés suelen tener un tono muscular bajo (hipotonía), un llanto débil y dificultad para respirar. A menudo

5 tienen dificultades para tragar y chupar, y no alcanzan el hito del desarrollo de poder sentarse sin ayuda. A menudo muestran uno o más de los síntomas de la AME seleccionados entre hipotonía, retraso en las habilidades motoras, control deficiente de la cabeza, postura redonda del hombro e hipermovilidad de las articulaciones. Típicamente, estos bebés tienen dos copias del gen de SMN2, una en cada cromosoma 5. Más de la mitad de todos los casos nuevos de AME son AME tipo I.

10 La AME Tipo II o intermedia se da cuando comienza entre los 7 y 18 meses de vida y antes de que el niño pueda pararse o caminar de manera independiente. Los niños con AME tipo 2 generalmente tienen por lo menos tres genes SMN2. La AME de inicio tardío (también conocida como AME de tipo III y IV, AME leve, AME de inicio en adultos y enfermedad de Kugelberg-Welander) produce niveles variables de debilidad. La AME Tipo III comienza después de 18 meses, y los niños pueden pararse y caminar de manera independiente, aunque pueden necesitar ayuda. La AME Tipo IV tiene su inicio en la edad adulta, y las personas pueden caminar durante la edad adulta. Las personas con AME tipo III o IV generalmente tienen entre cuatro y ocho genes SMN2, a partir de los cuales se
15 puede producir una buena cantidad de proteína SMN de longitud completa.

En una forma de realización, la expresión "tratamiento" comprende el paso de administrar por vía intravenosa, o por vía intratecal, una dosis efectiva, o dosis múltiples efectivas, de una composición que comprende un rAAV de acuerdo con lo descrito en la presente a un animal (incluido un ser
20 humano) que lo necesita. Si la dosis se administra antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En determinadas formas de realización, una dosis efectiva es una dosis que alivia (elimina o reduce) por lo menos un síntoma asociado con el trastorno/estado de enfermedad que se está tratando, que ralentiza o evita la progresión a un
25 trastorno/estado de enfermedad, que ralentiza o evita la progresión a un trastorno/enfermedad, que disminuye la extensión de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total) de la enfermedad, y/o que prolonga la supervivencia. En la presente se indican ejemplos de estados de enfermedad contemplados para el tratamiento.

30 En una forma de realización, las composiciones que comprenden rAAV de la invención se administran por vía intravenosa a un paciente que lo necesita que padece AME tipo I. En otra forma de realización, las composiciones que comprenden rAAV de la invención se administran por vía intratecal a un paciente que lo necesita que padece AME tipos II, III, o IV.

La presente invención divulga un método de tratamiento de AME tipo I en un paciente que lo necesita, mediante la administración del vector viral AAV9 por vía intratecal o intravenosa. En algunas formas de realización, el paciente tiene 0-9 meses de vida. En algunas otras formas de realización, el paciente tiene 0-6 meses de vida. En algunas formas de realización cuando el vector viral se usa para tratar

5 AME tipo I en un paciente, se determina el peso del paciente. En algunas formas de realización, el paciente tiene un peso corporal de menos de 8,5 kg. En algunas formas de realización, el paciente tiene un peso corporal de más de 2,6 kg. En algunas formas de realización, el paciente tiene un peso corporal de 2,6-8,5 kg.

10 En algunas formas de realización, el paciente tiene mutaciones, por ejemplo, una mutación nula, en una copia del gen de SMN1 (contemplando toda mutación que hace que el SMN1 codificado no sea funcional). En algunas formas de realización, el paciente tiene mutaciones, por ejemplo, una mutación nula, en dos copias del gen de SMN1. En algunas formas de realización, el paciente tiene mutaciones, por ejemplo, una mutación nula, en todas las copias del gen de SMN1. En algunas formas de

15 realización, el paciente tiene una delección en una copia del gen de SMN1. En algunas formas de realización, el paciente tiene una delección en dos copias del gen de SMN1. En algunas formas de realización, el paciente tiene mutaciones bialélicas de SMN1, es decir, ya sea una delección o sustitución de SMN1 en ambos alelos del cromosoma. En algunas formas de realización, el paciente tiene por lo menos una copia funcional del gen de SMN2. En algunas formas de realización, el

20 paciente tiene por lo menos dos copias funcionales del gen de SMN2. En algunas formas de realización, el paciente tiene por lo menos dos copias funcionales del gen de SMN2. En algunas formas de realización, el paciente tiene por lo menos tres copias funcionales del gen de SMN2. En algunas formas de realización, el paciente tiene por lo menos cuatro copias funcionales del gen de SMN2. En algunas formas de realización, el paciente tiene por lo menos cinco copias funcionales del

25 gen de SMN2. En algunas formas de realización, el paciente no tiene una sustitución c.859G>C en el exón 7 de por lo menos una copia del gen de SMN2. En algunas formas de realización, la secuencia genética del gen de SMN1 o SMN2 puede determinarse mediante secuenciación completa del genoma. En otras formas de realización, la secuencia genética y el número de copias del gen de SMN1 o SMN2 pueden determinarse mediante secuenciación de alto rendimiento. En algunas formas de

30 realización, la secuencia genética del gen de SMN1 o SMN2 puede determinarse mediante análisis de microarreglos. En algunas formas de realización, la secuencia genética del gen de SMN1 o SMN2 puede determinarse mediante secuenciación de Sanger. En algunas formas de realización, el número de copias del gen de SMN1 o SMN2 puede determinarse por hibridación fluorescente in situ (FISH).

En algunas formas de realización, el paciente muestra uno o más síntomas de la AME. Los síntomas de la AME pueden incluir hipotonía, retraso en las habilidades motoras, control deficiente de la cabeza, postura redonda del hombro e hipermovilidad de las articulaciones. En algunas formas de realización, el control deficiente de la cabeza se determina colocando al paciente sentada en anillo con asistencia en los hombros (adelante y atrás). El control de la cabeza se evalúa por la capacidad del paciente para sostener la cabeza en posición vertical. En algunas formas de realización, se observa movimiento espontáneo cuando el paciente está en posición supina y las habilidades motoras se evalúan por la capacidad del paciente para levantar sus codos, rodillas, manos y pies de la superficie. En algunas formas de realización, la fuerza de agarre del paciente se mide al colocar un dedo en la palma de la mano del paciente y levantar el paciente hasta que el hombro se separa de la superficie. La hipotonía y la fuerza de agarre se miden por la rapidez/resistencia temporal del paciente para mantener el agarre. En algunas formas de realización, el control de la cabeza se evalúa colocando la cabeza del paciente bajo una rotación máxima disponible y midiendo la capacidad del paciente para girar la cabeza hacia la línea media. En algunas formas de realización, la postura de los hombros se puede evaluar sentando al paciente con el apoyo de la cabeza y el tronco, y observando si el paciente flexiona los codos o los hombros para alcanzar un estímulo que se coloca al nivel del hombro a la altura de los brazos. En algunas formas de realización, La postura de los hombros también se puede evaluar colocando al paciente acostado de costado y observando si el paciente flexiona los codos o el hombro para alcanzar un estímulo que se coloca al nivel del hombro a la altura de los brazos. En algunas formas de realización, las habilidades motoras se evalúan observando si los pacientes flexionan sus caderas o rodillas al acariciarles, hacerles cosquillas o pellizcarles los pies. En algunas formas de realización, la flexión de los hombros, la flexión de los codos, la aducción de la cadera, la flexión del cuello, la extensión de la cabeza, la extensión del cuello y/o la curvatura espinal pueden evaluarse mediante medidas clínicas conocidas, por ejemplo, CHOP INTEND. Otros síntomas de la AME pueden evaluarse de acuerdo con medidas clínicas conocidas, por ejemplo, CHOP INTEND.

En algunas formas de realización, los pacientes son tratados después de mostrar síntomas de AME tipo I (por ejemplo, uno o más síntomas), según lo determinado usando una de las pruebas descritas aquí. En algunas formas de realización, los pacientes son tratados antes de mostrar síntomas de AME tipo I. En algunas formas de realización, los pacientes son diagnosticados con AME tipo I en base a pruebas genéticas, antes de que sean sintomáticos.

Las terapias combinadas también quedan contempladas en la presente. Combinación de acuerdo a la invención incluye tratamiento simultáneo o tratamientos secuenciales. Las combinaciones de

métodos pueden incluir la adición de ciertos tratamientos médicos estándar (por ejemplo, riluzol en ELA), al igual que las combinaciones con nuevas terapias. Por ejemplo, otras terapias para la AME incluyen oligonucleótidos antisentido (ASO) que alteran la unión al pre-ARNm y alteran sus patrones de empalme. Singh. et al., “A multi-exon-skipping detection assay reveals surprising diversity of splice isoforms of spinal muscular atrophy genes.” Plos One, 7(11):e49595. En una forma de realización, es posible usar nusinersen (Patentes Estadounidenses 8,361,977 y 8,980,853, que se incorporan a la presente como referencia). Nusinersen es un ASO aprobado que se dirige al intrón 6, exón 7 o intrón 7 del pre-ARNm de SMN2, modulando el empalme de SMN2 para producir de manera más eficiente la proteína SMN de longitud completa. En algunas formas de realización, el método de tratamiento que comprende el vector viral AAV9 se administra en combinación con un potenciador muscular. En algunas formas de realización, el método de tratamiento que comprende el vector viral AAV9 se administra en combinación con un neuroprotector. En algunas formas de realización, el método de tratamiento que comprende el vector viral AAV9 se administra en combinación con un fármaco antisentido basado en oligonucleótidos dirigido a SMN. En algunas formas de realización, el método de tratamiento que comprende el vector viral AAV9 se administra en combinación con nusinersen. En algunas formas de realización, el método de tratamiento que comprende el vector viral AAV9 se administra en combinación con un fármaco inhibidor de miostatina. En algunas formas de realización, el método de tratamiento que comprende el vector viral AAV9 se administra en combinación con stamulumab.

20

Si bien se contempla el suministro a un individuo que lo necesite después del nacimiento, también se contempla el suministro intrauterino a un feto.

Se contemplan métodos para tratar pacientes con AME tipo I usando las composiciones farmacéuticas que comprenden el vector viral. En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración de aproximadamente $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas del vector viral AAV9/mL (vg/mL). En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración de aproximadamente $1,7 - 2,3 \times 10^{13}$ vg/mL. En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración de aproximadamente $1,9 - 2,1 \times 10^{13}$ vg/mL. En algunas formas de realización, el vector viral se formula a una concentración de aproximadamente $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL.

30

En algunas formas de realización cuando el vector viral se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV (por ejemplo AAV de SMN) se administra al paciente a una dosis de aproximadamente $1,0 - 2,5 \times 10^{14}$ vg/kg. En algunas formas de realización cuando el vector viral se

usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV se administra al paciente a una dosis de aproximadamente $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg. En algunas formas de realización cuando el vector viral se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV se infunde en el paciente durante aproximadamente 45-70 minutos. En algunas formas de realización cuando el vector viral se usa para

5 tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV se infunde en el paciente durante aproximadamente 60 minutos. En algunas formas de realización cuando el vector viral se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV se infunde en el paciente utilizando una bomba de infusión, una bomba peristáltica o cualquier otro equipo conocido en la técnica. En algunas formas de realización cuando el vector viral se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV

10 se infunde en el paciente usando una bomba de jeringa.

Los títulos del vector viral de rAAV a administrar dependerán, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y el tipo o tipos de células a los que se dirigen, y pueden determinarse por métodos estándar en la técnica. Los títulos de rAAV pueden

15 oscilar entre aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} , o más partículas resistentes a la DNasa (DRP) por ml. Las dosis también pueden expresarse en unidades de genomas de vector (vg). El título genómico se puede determinar usando ddPCR según lo descrito en esta solicitud, en Lock

20 et al., o mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

Las dosis también pueden variar según el momento de la administración a la persona. Estas dosis de rAAV pueden oscilar entre aproximadamente 1×10^{11} vg/kg, aproximadamente 1×10^{12} vg/kg, aproximadamente 1×10^{13} vg/kg, aproximadamente 1×10^{14} vg/kg, aproximadamente 1×10^{15}

25 vg/kg, aproximadamente 1×10^{16} vg/kg, o más genomas de vector por kilogramo de peso corporal en un adulto. Para un neonato, las dosis de rAAV pueden oscilar entre aproximadamente 1×10^{11} vg/kg, aproximadamente 1×10^{12} vg/kg, aproximadamente 3×10^{12} vg/kg, aproximadamente 1×10^{13} vg/kg, aproximadamente 3×10^{13} vg/kg, aproximadamente 1×10^{14} vg/kg, aproximadamente 3×10^{14} vg/kg, aproximadamente 1×10^{15} vg/kg, aproximadamente 3×10^{15} vg/kg, aproximadamente

30 1×10^{16} vg/kg, aproximadamente 3×10^{16} vg/kg, o más genomas de vector por kilogramo de peso corporal.

Las dosis también pueden variar según el momento de la administración a la persona. Estas dosis de rAAV pueden oscilar entre aproximadamente 1×10^{11} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{12}

vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{13} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{14} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{15} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{16} vg/kg/semana, o más genomas de vector por kilogramo de peso corporal en un adulto. Para un neonato, las dosis de rAAV pueden oscilar entre aproximadamente 1×10^{11} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{12} vg/kg/semana, aproximadamente 3×10^{12} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{13} vg/kg/semana, aproximadamente 3×10^{13} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{14} vg/kg/semana, aproximadamente 3×10^{14} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{15} vg/kg/semana, aproximadamente 3×10^{15} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{16} vg/kg/semana, aproximadamente 3×10^{16} vg/kg/semana, o más genomas de vector por kilogramo de peso corporal por semana. Dosis de rAAV 1×10^{11} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{12} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{13} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{14} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{15} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{16} vg/1,5 kg/semana, o más genomas de vector por kilogramo de peso corporal en un adulto. Para un neonato, las dosis de rAAV pueden oscilar entre aproximadamente 1×10^{11} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{12} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 3×10^{12} vg/kg/semana, aproximadamente 1×10^{13} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 3×10^{13} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{14} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 3×10^{14} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{15} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 3×10^{15} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 1×10^{16} vg/1,5 kg/semana, aproximadamente 3×10^{16} vg/1,5 kg/semana, o más genomas de vector por 1,5 kilogramo de peso corporal por semana.

En una forma de realización, la dosis es de aproximadamente $1,1 \times 10^{14}$ genomas de vector por kg (vg/kg) de peso corporal del paciente. En una forma de realización, un paciente de 5 kg recibiría una dosis total de entre $0,5 \times 10^{14}$ y $5,0 \times 10^{14}$ genomas de vector. En una forma de realización, el vector viral se administra en una Solución salina tamponada con Tris. En una forma de realización, 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.

La dosis se puede determinar de varias maneras estándar. La PCR con cebadores específicos para el vector viral puede proporcionar mediciones relativas, pero qPCR puede usarse para muestras más pequeñas y mediciones absolutas. ddPCR es un método para realizar PCR digital que se basa en la tecnología de gotitas de emulsión de agua en aceite. Baker et al., “Digital PCR hits its stride.” *Nature Methods*, 9(6):541-544. Sykes et al., “Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution.” *Biotechniques*, 13(3)444-449. Una muestra se fracciona en decenas de miles de gotitas, y la

amplificación por PCR de las moléculas plantilla se produce en cada gotita individual. No es necesario hacer una curva estándar o tener cebadores con alta eficiencia de amplificación, por lo tanto, ddPCR no suele usar tanta muestra como las técnicas tradicionales basadas en PCR. Los ejemplos de equipos de ddPCR disponibles en el mercado incluyen, entre otros, BioRad QX100 ddPCR y RainDance Raindrop Digital PCR. En una forma de realización, la dosis se determina usando PCR. En otra forma de realización, la dosis se determina usando qPCR. En otra forma de realización, la dosis se determina usando PCR de gotas digital (ddPCR). En algunas formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen al gen de SMN. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados dirigidos al promotor de beta actina de pollo. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen al potenciador de CMV. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen a las secuencias ITR. En otras formas de realización, los métodos basados en PCR detectan y cuantifican el genoma viral de AAV9 encapsidado usando cebadores y sondas específicamente diseñados que se dirigen a la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

En un aspecto, la dosis se administra de acuerdo con la siguiente tabla, utilizando $2,0 \times 10^{13}$ vg/ml como la concentración objetivo del producto farmacológico.

Tabla 2: Dosificación

Rango de Peso del Paciente (kg)	Volumen de Dosis^a (mL)
2,6 – 3,0	16,5
3,1 – 3,5	19,3
3,6 – 4,0	22,0
4,1 – 4,5	24,8
4,6 – 5,0	27,5
5,1 – 5,5	30,3
5,6 – 6,0	33,0
6,1 – 6,5	35,8
6,6 – 7,0	38,5
7,1 – 7,5	41,3
7,6 – 8,0	44,0
8,1 – 8,5	46,8

^a NOTA: El volumen de la dosis se calcula utilizando el límite superior del Rango de Peso del Paciente.

En algunas formas de realización la composición farmacéutica que comprende el vector viral AAV se infunde en el paciente durante aproximadamente 20-70 minutos, por ejemplo durante
5 aproximadamente 45-70 minutos. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que comprende el vector viral AAV se infunde en el paciente durante aproximadamente 60 minutos. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que comprende el vector viral AAV se infunde en el paciente utilizando una bomba de infusión, una bomba peristáltica o cualquier otro equipo conocido en la técnica. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que
10 comprende el vector viral AAV se infunde en el paciente usando una bomba de jeringa.

También se contempla la selección previa de pacientes susceptibles de tratamiento, así como la administración del tratamiento a pacientes identificados de acuerdo con los criterios descritos en la presente. Los AAVs pueden generar una respuesta inmune celular y humoral. Como resultado de
15 ello, una fracción de pacientes potenciales para la terapia génica a base de AAV tiene anticuerpos preexistentes contra AAV. Jeune et al., "Pre-existing anti-Adeno-Associated Virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy." *Hum Gene Ther Methods*, 24(2):59-67. Boutin et al., "Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using vectores de AAV." *Hum Gene*
20 *Ther*, 21:704-712. Debido a que incluso niveles muy bajos de anticuerpos pueden evitar una transducción exitosa, los anticuerpos anti-AAV antecedentes representan un serio obstáculo para la aplicación universal de la terapia génica con AAV. En algunas formas de realización, los niveles de títulos de anticuerpos anti-AAV9 en un paciente se determinan antes de la administración del vector viral AAV. En algunas formas de realización, los niveles de títulos de anticuerpos anti-AAV9 en un
25 paciente se determinan mediante un inmunoensayo de unión ELISA. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpos anti-AAV9 iguales o inferiores a 1:100 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes de la administración del tratamiento. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpos anti-AAV9 iguales o inferiores a 1:50 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes de la
30 administración del tratamiento. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpo anti-AAV9 superiores a 1:100 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA luego del tratamiento y se monitorea durante 1-8 semanas o hasta que los títulos disminuyen

por debajo de 1:100. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpo anti-AAV9 superiores 1:100 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA luego del tratamiento y se monitorea durante 1-8 semanas o hasta que los títulos disminuyen por debajo de 1:50.

5

Un enfoque para superar el alto título de anticuerpos anti-AAV es el uso de medicamentos inmunosupresores. Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab en combinación con ciclosporina A es eficaz para reducir los títulos de anti-AAV. Mingozi et al., “Pharmacological modulation of humoral immunity in a nonhuman primate model of AAV gene transfer for hemophilia B.” *Mol Ther*, 20:1410-1416. Otro enfoque es el uso de plasmaféresis para eliminar los anticuerpos neutralizantes antes de la administración del vector. Monteilhet et al., “A 10 patient case report on the impact of plasmapheresis upon neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 6, and 8.” *Mol Ther*, 19(11):2084-2091. Durante la plasmaféresis, se extrae sangre de un paciente y el plasma y las células sanguíneas se separan por centrifugación o filtración de fibra hueca. Las células sanguíneas se devuelven al paciente junto con plasma tratado o fluidos de reemplazo, como una albúmina humana al 4,5% en solución salina. Un uso común de la aféresis terapéutica es la eliminación de inmunoglobulinas no deseadas, pero en este caso, la plasmaféresis representa un enfoque atractivo para eliminar los anticuerpos anti-AAV. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpo anti-AAV9 superiores a 1:100 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes o luego del tratamiento y se trata con plasmaféresis. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpo anti-AAV9 superiores a 1:50 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes o luego del tratamiento y se trata con plasmaféresis.

25 Los anticuerpos maternos preexistentes a AAV9 pueden transferirse a un paciente infantil a través de la leche materna o transferencia placentaria en el útero. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpo anti-AAV9 superiores a 1:100 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes o luego del tratamiento y se cambia a alimentación por fórmula. En algunas formas de realización, el paciente tiene títulos de anticuerpo anti-AAV9 superiores a 1:50 según lo determinado por un inmunoensayo de unión ELISA antes o luego del tratamiento y se cambia a alimentación por fórmula.

Antes y luego de la administración del tratamiento, la condición del paciente puede ser monitoreada. Algunos pacientes que han recibido tratamientos basados en AAV han experimentado

trombocitopenia, que es una condición caracterizada por un bajo recuento de plaquetas. La trombocitopenia se puede detectar mediante un recuento sanguíneo completo utilizando una muestra de sangre diluida en un hemocitómetro. La trombocitopenia también se puede detectar mediante un portaobjetos preparado con sangre del paciente (una película de sangre delgada o un frotis periférico) bajo el microscopio. El recuento normal de plaquetas humanas oscila entre 150,000 células/ml y aproximadamente 450,000 células/ml.

En algunas formas de realización, el paciente tiene recuentos de plaquetas superiores a aproximadamente 67,000 células/ml antes de la administración o superiores a aproximadamente 100,000 células/ml, o superiores a aproximadamente 150,000 células/ml. En algunas formas de realización, el paciente tiene recuentos de plaquetas inferiores a aproximadamente 150,000 células/ml antes de la administración o inferiores a aproximadamente 100,000 células/ml, o inferiores a aproximadamente 67,000 células/ml, y se monitorea durante 1-8 semanas o hasta que los recuentos de plaquetas aumenten por encima de aproximadamente 67,000 células/ml, o sean superiores a aproximadamente 100,000 células/ml, o superiores a aproximadamente 150,000 células/ml. En algunas formas de realización cuando los recuentos de plaquetas son inferiores a aproximadamente 67,000 células/ml luego de la administración del vector viral, el paciente puede tratarse con transfusión de plaquetas. En algunas formas de realización, el paciente no tiene trombocitopenia antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, el paciente tiene trombocitopenia luego de la administración del vector viral y se monitorea durante aproximadamente 1-8 semanas o hasta que el paciente no tenga trombocitopenia. En algunas formas de realización, el paciente tiene trombocitopenia luego de la administración del vector viral y se trata con una transfusión de plaquetas.

El monitoreo de la condición de los pacientes también puede incluir análisis de sangre estándar que miden los niveles de plaquetas, electroforesis de proteínas séricas, gamma-glutamyl transferasa (GGT) sérica, aspartato transaminasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total, glucosa, creatina quinasa (CK), creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), electrolitos, fosfatasa alcalina y amilasa. Los niveles de troponina I son una medida general para la salud del corazón, y los niveles elevados reflejan daño cardíaco o afecciones relacionadas con el corazón. En algunas formas de realización, se monitorean los niveles de troponina I luego de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes pueden tener niveles de troponina-I de menos de aproximadamente 0,3, 0,2, 0,15, o 0,1 µg/ml antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes pueden tener niveles de troponina-I de menos de

aproximadamente 0,176 µg/ml antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes pueden tener niveles de troponina-I superiores a aproximadamente 0,176 µg/ml luego de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes son sometidos a monitoreo cardíaco luego de la administración del vector viral hasta que los niveles de troponina-I son inferiores a aproximadamente 0,176 µg/ml.

La aspartato transaminasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) y la bilirrubina total son una medida general de la función hepática, mientras que la creatinina indica la función renal. Los niveles elevados de AST, ALT o bilirrubina total pueden indicar un mal funcionamiento hepático. En algunas formas de realización, el paciente tiene una función hepática normal antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, el paciente tiene niveles de transaminasas hepáticas de menos de aproximadamente 8-40 U/L antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, el paciente tiene niveles de AST o ALT de menos de aproximadamente 8-40 U/L antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, el paciente tiene niveles de bilirrubina de menos de 3,0 mg/dL antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes tienen niveles de creatinina de menos de 1,8 mg/dL antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes tienen niveles de hemoglobina (Hgb) entre 8-18 g/dL antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, el paciente tiene recuentos de glóbulos blancos (WBC) de menos de 20000 por mm³ antes de la administración del vector viral.

La eficacia del método de tratamiento puede determinarse utilizando una variedad de pruebas de habilidades motoras antes y después del tratamiento. En particular, la Prueba para Bebés de Trastornos Neuromusculares del Hospital de Niños de Filadelfia (CHOP INTEND) se desarrolló para evaluar las habilidades motoras de pacientes con AME tipo I. Glanzman et al., "The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): Test development and reliability." *Neuromuscular Disorders*, 20(3):155-161. La prueba CHOP INTEND fue desarrollada después de la evaluación de 26 bebés con AME Tipo I, edad media 11,5 meses (1,4–37,9 meses) con la Prueba de rendimiento motriz infantil (TIMP) y la Prueba de fuerza en la AME del Hospital de Niños de Filadelfia (CHOP TOSS), una evaluación motriz recientemente desarrollada para la AME. La prueba de la eficacia del tratamiento no se limita a la prueba CHOP INTEND, sino que también puede incluir otras pruebas de habilidades motoras conocidas en la técnica, incluyendo pero no limitado a TIMP, CHOP TOSS, las escalas motoras de desarrollo de Peabody, la prueba de evaluación del comportamiento neonatal de Brazelton, la Encuesta de desarrollo de hitos motores,

Capacidad capturada a través de la evaluación de video interactivo (ACTIVE), la escala de Bayley de desarrollo infantil y mediciones de potenciales de acción muscular compuesta (CMAP).

5 En algunas formas de realización, las pruebas basales antes del tratamiento se ejecutan usando la escala CHOP INTEND. En una forma de realización, la eficacia del tratamiento se determina usando la escala CHOP INTEND durante las visitas de seguimiento. En algunas formas de realización, CHOP INTEND incluye medidas de control de la cabeza, enderezamiento, movimientos del tronco en posición sentada, supina y boca abajo. En algunas formas de realización, CHOP INTEND incluye medidas de movimientos antigravedad al darse vuelta con asistencia, suspensión ventral y de pie con
10 soporte.

En muchos estudios de terapia génica que involucran vectores de AAV, se ha observado una respuesta de células T específica de antígeno al vector de AAV, y es de esperarse entre 2 y 4 semanas después de la transferencia génica. Una posible consecuencia de dicha respuesta de células T específicas de
15 antígeno es el aclaramiento de las células transducidas y la pérdida de la expresión transgénica. En un intento por amortiguar la respuesta inmune del huésped a la terapia basada en AAV, los pacientes pueden recibir inmunosupresores. En algunas formas de realización, los pacientes pueden recibir glucocorticoides antes de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, los pacientes pueden recibir un corticoesteroide antes de la administración del vector viral. En algunas
20 formas de realización, los pacientes pueden recibir un esteroide oral antes de la administración del vector viral. Los ejemplos de esteroides orales incluyen, entre otros, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, dexametasona e hidrocortisona. En algunas formas de realización, el esteroide oral es o comprende prednisolona. En algunas formas de realización, el paciente arranca con esteroides profilácticos por lo menos 24 horas antes de la administración del
25 vector viral. En algunas formas de realización, el paciente recibe esteroide oral durante por lo menos 30 días luego de la administración del vector viral. En algunas formas de realización, el esteroide oral se administra una vez por día. En algunas formas de realización, el esteroide oral se administra dos veces por día. En algunas formas de realización, el esteroide oral se administra a una dosis de aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/kg. En algunas formas de
30 realización, el esteroide oral se administra a una dosis de aproximadamente 0,1-10 mg/kg/día, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/kg/día. En algunas formas de realización, se monitorean los niveles de AST y ALT luego de la administración del vector viral. En tales formas de realización, el tratamiento con esteroide oral se administra cuando los niveles de AST y ALT exceden el doble del límite superior normal, por ejemplo, según lo determinado por estándares clínicos y métodos

conocidos en la técnica, o aproximadamente 120 IU/L. En algunas formas de realización, el tratamiento con esteroide oral se administra durante más de 30 días en la medida en que los niveles de AST y ALT excedan el doble del límite superior normal, por ejemplo, según lo determinado por estándares clínicos y métodos conocidos en la técnica, o excedan aproximadamente 120 IU/L.

5 Durante el tratamiento sostenido con corticosteroides, las glándulas suprarrenales disminuyen naturalmente la producción de cortisol. Si el tratamiento con corticosteroides se interrumpe abruptamente, el cuerpo puede experimentar una deficiencia de cortisol. En algunas formas de realización cuando el esteroide oral se administra a un paciente durante por lo menos 30 días, la dosis de esteroides se reduce lentamente de acuerdo con un cronograma. En algunas formas de realización,

10 la dosis de esteroide oral se reduce cuando los niveles de AST y ALT caer por debajo del doble del límite superior normal, por ejemplo, según lo determinado por estándares clínicos y métodos conocidos en la técnica, o aproximadamente 120 IU/L. En algunas formas de realización, la disminución comprende reducciones escalonadas a 0,5 mg/kg/día durante 2 semanas seguidas por 0,25 mg/kg/día durante 2 semanas más. En algunas otras formas de realización, la reducción del

15 esteroide oral se realiza a criterio del médico.

Kit

La invención además provee un kit para tratar AME en un paciente que lo necesita, en donde el kit

20 comprende una o más dosis de una composición farmacéutica que comprende una cantidad o dosis efectiva de un vector viral que comprende un polinucleótido de SMN divulgado en la presente y de acuerdo con el tipo de AME (también divulgado en la presente) el kit además comprende un agente de contraste (–por ejemplo, Omnipaque 180), e instrucciones sobre cómo usar la preparación o composición farmacéutica y el agente de contraste.

25 En algunas formas de realización, el kit contiene viales de una composición farmacéutica de vector viral. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de vector viral está a una concentración de aproximadamente $1,7 - 2,3 \times 10^{13}$ vg/mL. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de vector viral está a una concentración de aproximadamente $1,9 - 2,1 \times$

30 10^{13} vg/mL. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de vector viral está a una concentración de aproximadamente $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL. En algunas formas de realización, los viales contienen aproximadamente 5,9 mL de una composición farmacéutica de vector viral. En algunas formas de realización, los viales contienen aproximadamente 8,7 mL de una composición farmacéutica de vector viral. En algunas formas de realización, el kit no contiene un vial de 5,9 mL,

por lo menos un vial de 5,9 mL, por lo menos dos viales de 5,9 mL o por lo menos tres viales de 5,9 mL. En algunas formas de realización, el kit no contiene un vial de 8,7 mL, por lo menos un vial de 8,7 mL, por lo menos dos viales de 8,7 mL, por lo menos tres viales de 8,7 mL, por lo menos cuatro viales de 8,7 mL, por lo menos cinco viales de 8,7 mL, por lo menos seis viales de 8,7 mL.

5

En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, se determina el peso del paciente. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el peso del paciente es de por lo menos aproximadamente 2,6 kg. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el peso del paciente no es superior a aproximadamente 8,5 kg. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el peso del paciente es de aproximadamente 2,6 - 8,5 kg. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, se administra al paciente el vector viral AAV desde los viales en el kit. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, se administra al paciente el vector viral AAV desde los viales en el kit a una dosis de aproximadamente $1,0 - 2,5 \times 10^{14}$ vg/kg. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, se administra al paciente el vector viral AAV desde los viales en el kit a una dosis de aproximadamente $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV desde los viales en el kit se infunde en el paciente durante aproximadamente 45-70 minutos. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV desde los viales en el kit se infunde en el paciente durante aproximadamente 60 minutos. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV desde los viales en el kit se infunde en el paciente utilizando una bomba de infusión, una bomba peristáltica o cualquier otro equipo conocido en la técnica. En algunas formas de realización cuando el kit se usa para tratar AME tipo I en un paciente, el vector viral AAV desde los viales en el kit se infunde en el paciente usando una bomba de jeringa.

30

En una forma de realización, el vector se administra por vía intravenosa o intratecal. En una forma de realización, el vector se administra por vía intravenosa. En una forma de realización, el vector se administra por vía intravenosa junto con Omnipaque 180. En otra forma de realización, el vector se administra por vía intratecal junto con Omnipaque 180.

En otro aspecto, la presente invención contempla métodos de transducción de células diana de un paciente (incluyendo, pero no limitado a, células nerviosas o gliales) con rAAV.

La transducción de células de un paciente con rAAV descrita en la presente puede dar como resultado una expresión sostenida de un polipéptido o ARN codificado por el rAAV. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos de administración/suministro de rAAV (por ejemplo, que codifica una proteína SMN) a un paciente animal o humano. Estos métodos incluyen la transducción de células nerviosas y/o gliales con uno o más rAAV. La transducción puede llevarse a cabo con casetes de genes que comprenden elementos de control específicos para el tejido, por ejemplo, promotores que permiten la expresión específicamente dentro de las neuronas o específicamente dentro de los astrocitos. Los ejemplos incluyen enolasa específica neuronal y promotores de proteínas ácidas fibrilares gliales. También se pueden desarrollar promotores inducibles bajo el control de un medicamento ingerido.

En algunos aspectos, se contempla que la transducción de células aumente cuando se use un vector de la invención en combinación con un agente de contraste según lo descrito en la presente en relación con la transducción de un vector de la invención cuando no se usa en combinación con un agente de contraste. En varias formas de realización, la transducción de células se incrementa en por lo menos aproximadamente 1%, o por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 100%, por lo menos aproximadamente 120%, por lo menos aproximadamente 150%, por lo menos aproximadamente 180%, por lo menos aproximadamente 200%, por lo menos aproximadamente 250%, por lo menos aproximadamente 300%, por lo menos aproximadamente 350%, por lo menos aproximadamente 400%, por lo menos aproximadamente 450%, por lo menos aproximadamente 500% o más cuando un vector de la invención se usa en combinación con un agente de contraste según lo descrito en la presente, en relación con la transducción de un vector de la invención cuando no se usa en combinación con un agente de contraste. En formas de realización adicionales, la transducción de células se incrementa entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50%, o entre aproximadamente 1% y aproximadamente 500%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 200%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 300%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 400%, o entre aproximadamente 100% y aproximadamente 500%, o entre aproximadamente 150% y aproximadamente 300%, o entre aproximadamente 200% y

aproximadamente 500% cuando un vector de la invención se usa en combinación con un agente de contraste según lo descrito en la presente, en relación con la transducción de un vector de la invención cuando no se usa en combinación con un agente de contraste.

- 5 La invención además provee aspectos en los cuales la administración intratecal de un vector de la invención y un agente de contraste al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita da como resultado un aumento de la supervivencia del paciente en relación con la supervivencia del paciente cuando un vector de la invención se administra en ausencia del agente de contraste. En varias formas de realización, el vector de la invención y un agente de contraste se administran por separado por vía
- 10 intratecal al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita. En otras formas de realización, el vector y el agente de contraste están coformulados y se administran por vía intratecal al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita. En otras formas de realización, el vector y el agente de contraste se proveen en el mismo envase para su administración por vía intratecal al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita. En varias formas de realización, la administración de
- 15 un vector de la invención y un agente de contraste al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita da como resultado un aumento de la supervivencia del paciente de por lo menos aproximadamente 1%, por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%,
- 20 por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 100%, por lo menos aproximadamente 150%, por lo menos aproximadamente 200% o más con relación a la supervivencia del paciente al que se le administra un vector de la invención en ausencia del agente de contraste.
- 25 En algunos aspectos, se contempla que la transducción de células aumente adicionalmente al usar un vector de la invención en combinación con un agente de contraste y cuando el paciente se coloca en la posición de Trendelenberg (posición con la cabeza hacia abajo). En algunas formas de realización, por ejemplo, el paciente es inclinado en la posición con la cabeza hacia abajo a aproximadamente entre 1 grado y aproximadamente 30 grados, aproximadamente 15 a aproximadamente 30 grados,
- 30 aproximadamente 30 a aproximadamente 60 grados, aproximadamente 60 a aproximadamente 90 grados, o aproximadamente 90 hasta aproximadamente 180 grados) durante o luego de la infusión intratecal del vector. En varias formas de realización, la transducción de células se incrementa en por lo menos aproximadamente 1%, o por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%,

por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 100%, por lo menos aproximadamente 120%, por lo menos aproximadamente 150%, por lo menos aproximadamente 180%, por lo menos aproximadamente 200%, por lo menos aproximadamente 250%, por lo menos aproximadamente 300%, por lo menos aproximadamente 350%, por lo menos aproximadamente 400%, por lo menos aproximadamente 450%, por lo menos aproximadamente 500% o más cuando un vector de la invención se usa en combinación con un agente de contraste y la posición de Trendelenberg según lo descrito en la presente, en relación con la transducción de un vector de la invención cuando no se usa en combinación con un agente de contraste y la posición de Trendelenberg. En formas de realización adicionales, la transducción de células se incrementa en aproximadamente entre 10% y aproximadamente 50%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50%, o entre aproximadamente 1% y aproximadamente 500%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 200%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 300%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 400%, o entre aproximadamente 100% y aproximadamente 500%, o entre aproximadamente 150% y aproximadamente 300%, o entre aproximadamente 200% y aproximadamente 500% cuando un vector de la invención se usa en combinación con un agente de contraste y la posición de Trendelenberg según lo descrito en la presente, en relación con la transducción de un vector de la invención cuando no se usa en combinación con un agente de contraste y la posición de Trendelenberg.

La invención además provee aspectos en los cuales la administración por vía intratecal de un vector de la invención y un agente de contraste al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita colocado en la posición de Trendelenberg da como resultado un aumento adicional de la supervivencia el paciente en relación con la supervivencia del paciente cuando un vector de la invención se administra en ausencia del agente de contraste y la posición de Trendelenberg. En varias formas de realización, la administración de un vector de la invención y un agente de contraste al sistema nervioso central de un paciente que lo necesita colocado en la posición de Trendelenberg da como resultado un aumento de la supervivencia del paciente de por lo menos aproximadamente 1%, por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos

aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 100%, por lo menos aproximadamente 150%, por lo menos aproximadamente 200% o más en relación con la supervivencia del paciente cuando un vector de la invención se administra en ausencia del agente de contraste y la posición de Trendelenberg.

5

De acuerdo con la presente descripción y las reivindicaciones que se acompañan, las formas singulares de los artículos incluyen las plurales salvo que el contexto claramente indique lo contrario. Opcional u opcionalmente significa que el evento o circunstancia subsecuentemente descrito puede o no ocurrir, y que la descripción incluye casos en los cuales el evento o circunstancia ocurre y casos en los cuales ello no sucede. Por ejemplo, la frase la composición comprende opcionalmente una combinación significa que la composición puede comprender una combinación de diferentes moléculas o puede no incluir una combinación de modo que la descripción abarca tanto la presencia como la ausencia de la combinación (es decir, los elementos individuales de la combinación). Los rangos pueden expresarse entre aproximadamente un valor en particular y/o aproximadamente otro valor en particular. Al expresarse tal rango, otro aspecto incluye desde el valor en particular y/o hasta el otro valor en particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente aproximadamente, se entenderá que el valor en particular forma otro aspecto. Asimismo se entenderá que los puntos finales de cada uno de los rangos son significativos tanto en relación con el otro punto final, como independientemente del otro punto final.

20

La presente invención será adicionalmente ilustrada a través de los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitativos. El contenido de todas las referencias, patentes, y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como las Figuras, queda incorporado por completo como referencia a todo efecto.

25

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos deben considerarse ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención antes descrita.

30

Ejemplo 1 – Generación del Pre-Banco de Células Maestras para BPM

Métodos

Descongelación: Se descongeló un solo vial de células (1×10^6 células) en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 1 minuto y el contenido fue diluido en 5 mL de medio de crecimiento completo pre-entibiado. Las células fueron transferidas a un matraz T-25 cm^2 y cultivadas en un incubador a 37°C durante 4 días, con reemplazo del medio de cultivo por medio de crecimiento completo pre-entibiado cada día.

Selección de Adherencia Aumentada: Las células fueron cultivadas usando la siguiente técnica para seleccionar las células fuertemente adherentes. Una vez que las células alcanzaron 95% de confluencia en el matraz de 25 cm^2 , las células fueron subcultivadas. Las células fueron lavadas con 5 mL de PBS luego disociadas con 0,5-1 mL de HyQTase durante ~2 minutos a temperatura ambiente. La disociación se interrumpió agregando 5 mL de medio de crecimiento completo y se pipeteó repetidamente para disociar las aglomeraciones de células. La suspensión celular luego fue centrifugada durante 4 minutos a $200 \times g$. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue resuspendido en 10 mL de medio de crecimiento completo. Las células fueron transferidas a un matraz de 75 cm^2 . Luego de 4 horas de incubación en el incubador a 37°C , las células débilmente adherentes fueron lavadas por aspiración del medio de cultivo para eliminar las células débilmente adherentes y no adherentes. El medio de cultivo se reemplazó con 10 mL de medio de crecimiento completo pre-entibiado. Este proceso redujo la masa celular en hasta 35% del número de células, por inspección visual. Las células fueron incubadas durante 2 días más antes de ser subcultivadas nuevamente. Este proceso de selección, que consiste en el cambio de medio 4 horas luego de la siembra, fue ejecutado tres veces antes de la expansión de la población celular seleccionada (Figura 2 y Figure a). En la etapa de selección final, las células fueron sembradas en matraces $2 \times 175 \text{ cm}^2$, con un volumen final de 25 mL. Se advirtió una reducción en la pérdida de células luego de las últimas 4 horas después del cambio de medio de siembra.

Expansión de las células: Las células luego fueron expandidas una vez alcanzada la confluencia en los matraces $2 \times 175 \text{ cm}^2$. Las células fueron lavadas con 15 mL PBS luego disociadas con 3 mL HyQTase y se incubaron durante ~2 minutos a temperatura ambiente. La disociación se interrumpió agregando 10 mL de medio de crecimiento completo. La suspensión de células luego fue centrifugada para producir 2 pellets celulares una vez aspirado el sobrenadante. Cada pellet fue resuspendido en 8 mL de medio de crecimiento completo y 2 mL de esta suspensión celular concentrada se agregaron a matraces $8 \times 175 \text{ cm}^2$. Los matraces fueron preparados agregando 20 mL de medio de crecimiento completo, lo que dio como resultado un total de 22 mL de suspensión celular y una tasa de división 1:4. El siguiente paso de expansión utilizó el mismo procedimiento con las siguientes variaciones:

los matraces 4x175 cm² fueron expandidos a una tasa de división de 1:2 y los matraces 4x175 cm² fueron expandidos a una tasa de división de 1:3. Esto dio como resultado un total del 20 x 175 cm² matraces.

- 5 **Cosecha:** Las células se cosecharon de los matraces 20 x 175 cm². Las células fueron lavadas con 15 ml de PBS y luego disociadas con 3 ml de HyQTase conforme lo descripto anteriormente. La disociación celular se detuvo agregando 10 ml de medio de crecimiento completo y se recogió en tubos de 50 ml con suspensión celular de los matraces 4x175 cm² sumados a 1 tubo de 50 ml. Esto dio como resultado 5 x 50 ml tubos con 40 ml de suspensión celular en cada uno. Los tubos se
10 centrifugaron para crear pellets celulares, se aspiraron los sobrenadantes y se volvieron a suspender las células con 10 ml de medio de crecimiento completo, dando como resultado 50 ml de suspensión celular.

- El volumen se dividió en 2 tubos de 50 ml, con un total de 25 ml de suspensión celular en cada tubo.
15 Las muestras diluidas 1:2 se usaron para calcular los recuentos de células viables por tubo usando un hemocitómetro y azul de toluidina (tripano). La muestra del tubo 1 tuvo un recuento de células viables de $1,99 \times 10^6$ células/ml produciendo una concentración celular de $3,98 \times 10^6$ células/ml y la muestra del tubo 2 tuvo un recuento de células viables de $2,4 \times 10^6$ células/ml (un total de 1×10^8 células) produciendo una concentración celular de $4,8 \times 10^6$ células/mL (total $1,2 \times 10^8$ células). Así, se
20 cosecharon un total de $2,2 \times 10^8$ células. Ambos tubos se centrifugaron nuevamente (6 minutos, 200 x g) y los pellets se resuspendieron en 10 ml (Tubo 1) y 12 ml (Tubo 2) de medio de congelación, respectivamente, para ajustar la concentración celular a 1×10^7 células/ml. Las dos suspensiones celulares se agruparon y se colocaron alícuotas de 1 ml (cada una con 1×10^7 células) en 22 crioviales estériles (Tabla 3).

25

Tabla 3: Cálculo del total de células cosechadas

	Concentración celular para una muestra 1:2	Concentración celular para la cosecha	Total de células para la Cosecha
Tubo 1	$1,99 \times 10^6$ células/mL	$3,98 \times 10^6$ células/mL	1×10^8 células
Tubo 2	$2,4 \times 10^6$ células/mL	$4,8 \times 10^6$ células/mL	$1,2 \times 10^8$ células
Total	-	-	$2,2 \times 10^8$ células

Los viales llenos se transfirieron luego a una cámara de congelación con isopropanol fresco durante la noche en un congelador a -80°C para una congelación a velocidad controlada. Los viales congelados se transfirieron luego a nitrógeno líquido en fase de vapor en un tanque de nitrógeno líquido. Se transfirieron diez viales en hielo seco para depositarlos en una instalación de BMP.

5

Las células HEK293 de ATCC se descongelaron y se adaptaron con éxito para una mayor adherencia en 3 pases antes de la expansión y la formación exitosa de un banco de siembra. El banco de siembra se analizó para determinar el crecimiento y la presencia de agentes adventicios (micoplasma, hongos y bacterias). Las pruebas mostraron que el banco de siembra es adecuado para el Banco de Células Maestras en una instalación de BPM.

10

Ejemplo 2 – Proceso Aguas Arriba

Un proceso aguas arriba (véase, por ejemplo, el Figura 4) se usó para producir un derivado intermedio de un banco de células de trabajo, en donde el proceso aguas arriba comprende los pasos de (a) cultivar células adherentes, (b) transfectar las células cultivadas con tres plásmidos según lo ilustrado en la Figura 1 (por ejemplo, que comprenden AAV de SMN descrito en la presente) para permitir la producción del vector viral AAV, (c) lisar las células adherentes para aislar el vector viral AAV, (d) purificar las partículas virales mediante filtración para eliminar las células intactas o los restos celulares, y (e) someter el producto purificado de (d) a filtración de flujo tangencial, y (f) congelar la preparación intermedia resultante de partículas virales purificadas. En formas de realización alternativas, el AAV preparado con el proceso aguas arriba divulgado codifica un ARNsh dirigido a SOD1 o un MECP2 de acuerdo con lo descrito en la presente.

15

20

(a) Cultivo de las células adherentes

Las células HEK293 se descongelaron y expandieron a través de siete pases en matraces descartables con el uso de incubadoras de CO₂. Las células descongeladas se lavaron con medio de crecimiento de expansión celular, se centrifugaron y se resuspendieron con medio de crecimiento de expansión celular nuevo. Las células resuspendidas fueron sembradas en un matraz que contenía medio de crecimiento de expansión celular y se incubaron.

30

Cuando las células estuvieron confluentes, se lavaron con DPBS y se retiraron de los matraces con solución enzimática TrypLE Select. Se agregó medio de crecimiento de expansión celular para neutralizar la solución de enzima, y las células suspendidas se dividieron y se volvieron a sembrar

en nuevos matraces que contenían medio de crecimiento de expansión celular. Este proceso de expansión se repitió 7 veces. En la última iteración, las células suspendidas no se volvieron a sembrar en matraces, sino que la suspensión de células se inoculó en un biorreactor para una expansión adicional.

5

Un biorreactor de células adherentes iCELLis 500/200 m² o iCELLis 500/333 m² fue preparado para la inoculación antes de la inoculación. Las actividades de preparación incluyeron el desembalaje del biorreactor desechable, la inspección física, la prueba de fugas, el montaje del conjunto de tubería y equilibrar de la sonda. El medio de crecimiento de expansión celular se cargó para equilibrar el biorreactor. Una vez que se verificó que el pH (pH 6,9 a 7,5), la temperatura (35°C a 39°C) y el oxígeno disuelto (40-125%) estaban dentro de los rangos definidos, el biorreactor se sembró a una densidad de siembra objetivo de 4800-7000 células/cm² (para 200 m² de reactor) o 5000-12000 células/cm² (para 333 m² de reactor). La suspensión celular del paso anterior se agregó a los medios en una bolsa de medios de recirculación y se hizo circular a través del biorreactor.

15

(b) Transfección de las células adherentes

En los días 4, 5 o 6 desde el momento de la inoculación del biorreactor, se transfectaron células HEK293 adherentes con una coprecipitación de ADN de plásmido PEI triple. Los 3 plásmidos utilizados para esta transfección son pSMN, pAAV2/9 y pHELP. El medio de crecimiento DMEM utilizado para la expansión celular se retira del biorreactor y se reemplaza con medio de transfección. El vector scAAV9.CB.SMN se produce usando la transfección de ADN de plásmido triple en células embrionarias de riñón humano adherentes (HEK293) usando una coprecipitación de polietilenimina ("PEI") en un biorreactor de células adherentes a gran escala. El plásmido vector pSMN contiene el ADNc para la proteína de la neurona motora de supervivencia humana (SMN). Los 3 plásmidos utilizados para esta transfección son pSMN (222 mg), pAAV2/9 (333 mg) y pHELP (444 mg). Los plásmidos pueden transfectarse en una proporción de 1:1:1 mol. Se permitió que el medio de transfección se equilibrara en el biorreactor hasta que la temperatura del biorreactor fuese >30 °C antes de la adición de la coprecipitación de plásmido-PEI. El proceso de coprecipitación de Plásmido-PEI implica la adición de los plásmidos a los medios de transfección y la filtración de 0,2 µ en una bolsa de reacción. El PEI se agregó al medio de transfección y luego a la bolsa de reacción. La relación de PEI-plásmido es de aproximadamente 1:1 en peso. La reacción de PEI-Plásmido se mezcló manualmente para formar una suspensión homogénea y la reacción ocurre durante un período de 15-

30

30 minutos. Al final del tiempo de reacción, la coprecipitación de PEI-Plásmido se transfirió desde la bolsa de reacción al biorreactor. La coprecipitación de PEI-Plásmido se dejó mezclar en el biorreactor durante 1-2 horas (las duraciones alternativas se describen en el Ejemplo 7) antes de reiniciar la agitación. Los medios de transfección se recircularon en el biorreactor durante 18-24 horas antes del próximo cambio de medios.

Al día 6 del biorreactor, 18 a 24 horas después de la transfección, se drenó el biorreactor y la bolsa de medios de recirculación de Medios de Transfección se reemplazó con los medios de post transfección. El biorreactor se llenó con medios de post transfección con recirculación. El día 7, 18 - 24 horas después del cambio de medios el día 6, los medios de post transfección en la bolsa de recirculación se reemplazaron con una bolsa nueva de medios post transfección. El biorreactor no fue drenado durante este paso. La recirculación de los medios continúa hasta la cosecha, generalmente al día 9.

15 **(c) Lisado de las células adherentes transfectadas**

Después de 9 días en el biorreactor, se tomaron las muestras finales previas a la cosecha del reactor y se inició el proceso de lisis celular total. Se agregó Benzonase al biorreactor a una concentración final de 100 U/ml. La Benzonase se dejó mezclar en el reactor, y se incorporó tampón de lisis al reactor. El tampón de lisis se mezcló en el reactor a 15-25 °C durante 2 horas antes de transferir el contenido del biorreactor a la bolsa de cosecha. Se agregó una solución de sal de sacarosa (SSS) que apaga la reacción de Benzonase a la bolsa de cosecha y se mezcló durante 15 minutos. Luego se enjuagó el biorreactor con el tampón de enjuague de biorreactor durante 15 minutos y el enjuague fue recogido en la bolsa de recolección de cosecha, junto con la solución de lisis celular apagada. Una vez incorporado el enjuague a la bolsa de recolección, se mezcló el contenido durante 15 minutos y se tomaron muestras de la cosecha a granel.

(d) Preparación de las partículas virales por filtración y filtración de flujo tangencial

30 La cosecha a granel mezclada se filtró a través de un filtro de profundidad POD en una bolsa de recolección. Una vez filtrada toda la cosecha a granel, el filtro de profundidad se arrastra con Tampón FFT1. El conjunto de filtro de profundidad se mezcla y muestrea. Luego se filtró el conjunto de filtro de profundidad a través de un filtro de 0,45 µm para aclarar adicionalmente el material de cosecha a granel. El filtro de 0,45 µm se arrastra con Tampón FFT1.

Para la etapa FFT1, se lavaron 5,0 m² de casetes de membrana de celulosa regenerada con corte de PM de 300 kDa, se desinfectaron con solución de NaOH y se equilibraron con tampón FFT1. La fase de concentración de esta operación fue diseñada para reducir el volumen de la cosecha clarificada en aproximadamente 10x. Una vez que se alcanzó el volumen de retenido objetivo, se inició la operación de diafiltración. El retenido se diafiltró con 6 diavolumenes de tampón FFT1. Alternativamente, el retenido puede ser diafiltrado con más de 6 diavolumenes de tampón FFT1, por ejemplo, 10 diavolumenes, 12 diavolumenes o 15 diavolumenes. Una vez que se lograron 6 diavolumenes de flujo total de permeado, el retenido se concentró nuevamente y se cosechó en una bolsa de recolección. Se ejecutaron dos enjuagues sucesivos de la membrana para maximizar la recuperación del producto del sistema FFT para producir una sustancia farmacológica intermedia.

(e) Congelación del intermedio

El intermedio de FFT1 se dividió en alícuotas en botellas de PETG estériles de 1 o 2 litros en una campana LFH y luego se congeló en hielo seco o en un congelador y fue almacenado a -60°C.

Tabla 4: Tampones utilizados en el proceso aguas arriba

Nombre	Formulación	Etapas del proceso donde se utiliza
Medio de Crecimiento de Expansión Celular	DMEM con 10% FBS, 4,5 g/l glucosa, 4 mM L-glutamina	Expansión celular, pre-transfección en Biorreactor iCELLis
Medio de Transfección	DMEM sin FBS, sin calcio, sin L-glutamina y 4,5 g/L glucosa	Transfección en Biorreactor iCELLis
Medio de Post Transfección	OptiMEM con 2,3 g/L glucosa, 4 mM L-glutamina, y sin FBS	Post transfección en Biorreactor iCELLis
Tampón de Lisis	500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM MgCl ₂ , pH 8,0	Lisis celular en Biorreactor iCELLis
Solución de Sal de Sacarosa (SSS)	3700 mM NaCl, 10% Sacarosa	Clarificación
Tampón de Enjuague de Biorreactor	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Tween 20, 1% Sacarosa	Cosecha en biorreactor iCELLis
Tampón FFT1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Sacarosa	Clarificación, FFT1

Tampón de Sanitización FFT1	0,5 M NaOH	Sanitización de membrana FFT1
-----------------------------	------------	-------------------------------

5

Ejemplo 3 – Proceso aguas abajo

Un proceso aguas abajo (véase, por ejemplo, la Figura 5) se utilizó para procesar el intermedio de FFT1 en una sustancia farmacológica filtrada. En algunas formas de realización, el proceso aguas abajo divulgado en la presente puede ser utilizado para procesar un intermedio que comprende un AAV de SMN, un AAV de MECP2, o un AAV que codifica ARNsh dirigido a SOD1 según lo descrito en la presente. Las etapas del proceso aguas abajo incluyen: (a) acidificación y clarificación del intermedio (usando filtración), (b) purificación utilizando cromatografía de intercambio catiónico, (c) filtración por filtración de flujo tangencial (“FFT2”), (d) ultracentrifugación usando tampón de CsCl para separar las cápsides virales llenas y vacías, (e) recolectar los vectores virales de AAV, y (d) filtrar los vectores virales de AAV recolectados con un segundo paso de filtración de flujo tangencial (“FFT3”).

(a) Acidificación y Clarificación

El material intermedio de FFT1 del proceso aguas arriba (descongelado a temperatura ambiente si previamente estaba congelado) se bombeó a una bolsa con un mezclador. El producto intermedio de FFT1 se mezcló y se tomó una muestra para determinar el título. El producto intermedio de FFT1 se procesó inmediatamente mediante la adición de 11-14% de Tween 20. Tween 20 se usó para promover la floculación de la mayor parte de las proteínas y el ADN de la célula huésped en condiciones de pH ácido. La mezcla se dejó incubar durante 12-20 horas. Luego se redujo el pH mediante la adición de tampón de acidificación (glicina 1 M) a pH 3,3-3,7. El precipitado formado después de bajar el pH fue entonces eliminado filtrando la solución a través de un Clarisolve de 1,1 m² y un filtro de profundidad Millistak + C0HC de 2,2 m² y filtros de pulido de 0,45 µm. Este proceso dio como resultado el intermedio de FFT acidificado y clarificado.

(b) Purificación con cromatografía de intercambio catiónico

El paso de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) se usó para separar las cápsides virales de las proteínas, el ADN y otras impurezas del proceso, por ejemplo, los lípidos de las células huésped, TWEEN 20. Este paso utilizó una columna de cromatografía (8,0 L) CIMmultus S03-8000 Advanced Composite Column (sulfonilo) (poros de 0,2 μm) operada usando un sistema de cromatografía de proceso automatizado. Los tampones y las soluciones están descriptos en la siguiente tabla:

Tabla 5: Tampones y soluciones para un ciclo de CEX

Nombre de la solución	Composición	Objeto	Volumen (L) para un ciclo de CEX de 8 L
WFI	WFI	Enjuagues de la columna	200 L
Tampón CEX A	50 mM glicina, 500 mM NaCl, 1,0 % sacarosa, 0,20 % poloxámero 188, pH $3,5 \pm 0,1$ a 20°C	Equilibrio, lavado, elución	256 L
Tampón CEX B	50 mM glicina, 2,0 M NaCl, 1,0 % sacarosa, 0,20 % poloxámero 188, pH $3,5 \pm 0,1$ a 20°C	Equilibrio de la columna y elución	40 L
Solución de limpieza monolítica	1 M NaOH, 2 M NaCl	Sanitización de la columna, CIP	96 L
1 M acetato de amonio	1 M acetato de amonio	Recuperación del pH de la columna	40 L
Tampón de neutralización del pH a 9,0	1,0 M Tris pH $9,1 \pm 0,1$ a 20°C	Ajuste del pH del producto de CEX	0,5 L
Solución de almacenamiento	20% Etanol en WFI	Almacenamiento de la columna	40 L

El intermedio de FFT acidificado y clarificado (es decir, la carga de CEX) se cargó en una columna CEX limpia y equilibrada. Las condiciones fueron tales que los vectores virales se unen a la columna monolítica. El material no unido se lavó de la columna con tampón CEX A. El producto se eluyó de la resina con un gradiente de Tampón CEX B en Tampón CEX A. La recolección de la Fracción 1 se inició al comienzo del gradiente de elución para 10 volúmenes de columna (CV) a volumen definido

de 2,3-2,7 CV. La columna de cromatografía se descartó después de cada lote (es decir, la columna de cromatografía no se reutilizó). El producto eluido de CEX (Fracción 2) entonces se neutralizó utilizando Tampón de Neutralización a un pH de 7,7-8,3.

5 **(c) Filtrado con Filtración de Flujo Tangencial (FFT2)**

El paso FFT2 concentró el vector viral, eliminó las impurezas de las proteínas e intercambió el tampón por un tampón apropiado para el paso de ultracentrifugación en Cloruro de Cesio. El Eluato Neutralizado se procesó usando un sistema de FFT equipado con 0,3 m² de membrana de celulosa regenerada de PMCO de 300 kDa.

El volumen del eluato neutralizado de CEX se redujo a un volumen de retenido objetivo. Una vez que se alcanzó el volumen de retenido objetivo, se inició la diafiltración en modo FFT discontinuo (modo en lotes). El producto retenido se diluyó 2 veces con tampón de diafiltración de NaCl de FFT2, y el producto retenido se concentró hasta su volumen inicial. Esto se repitió hasta que se completó la diafiltración con Tampón de Diafiltración de NaCl de FFT2. El producto retenido luego se diluyó 2 veces con tampón de diafiltración de CsCl de FFT2 y el producto retenido se concentró hasta su volumen inicial. Esto se repitió hasta que se completó la diafiltración con Tampón de Diafiltración de NaCl de FFT2.

El retenido además fue concentrado hasta una masa final basada en el título físico del eluato neutralizado de CEX, el volumen de retención del sistema, el volumen de lavado del sistema y la densidad de retención para lograr la concentración deseada del vector objetivo y se recuperó en una bolsa de recolección. Un ciclo de enjuague del sistema con tampón de diafiltración de CsCl de FFT2 fue seguido por una purga del producto para maximizar la recuperación del producto del sistema FFT. Se tomó una muestra del retenido de FFT2, que contiene el retenido y el enjuague) para la medición del título físico. Los casetes de membrana de FFT2 se descartaron después de cada lote (es decir, las membranas FFT no se reutilizaron).

30 **Tabla 6: Tampones para FFT2**

Nombre de la solución	Composición
Tampón de Diafiltración de NaCl de FFT2	20 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 150 mM NaCl, 0,2% Poloxámero 188, 1% Sacarosa , pH 8,1 ± 0,1 a 20°C

Tampón de Diafiltración de CsCl de FFT2	20 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxámero 188, pH 8,1± 0,1 a 20°C
---	--

(d) Ultracentrifugación en CsCl

El objeto del paso de la ultracentrifugación fue eliminar las cápsides vacías de las cápsides llenas utilizando la ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. El retenido de FFT2 se incorporó a los tubos de ultracentrifugación y los tubos se sellaron. Los tubos se colocaron en una ultracentrífuga, como un sistema automatizado Optima XPN 100 Ultra Centrifuge o un sistema equivalente equipado con un rotor Tipo 50,2 Ti o un rotor equivalente. Los tubos llenos se centrifugaron a 45,000 rpm durante 22 horas a 20°C.

(e) Recolección de los vectores virales de AAV

Después de completar el paso de centrifugación, se retiraron los tubos de la ultracentrífuga y se colocaron en un gabinete de bioseguridad. Los tubos conteniendo el producto se montaron en soportes de anillo sobre un contenedor de residuos. Se colocó una lámpara directamente debajo del tubo para visualizar la banda de las cápsides vacías (Banda A, banda más alta), las bandas de doblete de cápsides llenas (Banda B y Banda C, bandas superior e inferior del doblete) y la banda más baja debajo del doblete (Banda D). Los tubos se pincharon con una aguja montada a una jeringa para ventilar los tubos, y las bandas B, C y D se retiraron con una aguja. El material recolectado se transfirió a una bolsa de recolección. El grupo ultracentrifugado recolectado (Grupo UC) se diluyó con tampón FFT2 para alcanzar una concentración de CsCl inicial consistente en el material de carga de FFT2. El Pool de UC diluido se procesa en el paso FFT3. El tampón para el paso de ultracentrifugación en Cloruro de Cesio se indica en la tabla a continuación:

Tabla 7: Tampón para Ultracentrifugación en CsCl

Nombre de la Solución	Composición
Tampón de Diafiltración en CsCl FFT2	20 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxámero 188, pH 8,1 ± 0,10

(f) Filtración con Filtración de Flujo Tangencial (FFT3)

La etapa FFT3 eliminó el CsCl y concentró el vector completo usando el Tampón de Formulación Final. Se utilizó un sistema de filtración de flujo tangencial en conjunto con 50 cm² de membranas de celulosa regeneradas de 300 kDa de PMCO. El vector viral fue retenido por las membranas.

- 5 El volumen del pool de UC diluido se redujo a un volumen de retenido objetivo. Una vez que se alcanzó el volumen objetivo, se inició la diafiltración continua a un volumen de retenido constante. El producto retenido se diafiltró con tampón FFT3. Se tomó una muestra del retenido diafiltrado para la medición del título físico. El producto retenido además fue concentrado a un peso de permeado, que se calculó mediante 1) el volumen de producto retenido en el sistema FFT al final de la diafiltración, 2) el título físico del Pool de UC Diluido, 3) una concentración de sustancia farmacológica objetivo (SF), 4) el volumen combinado de los lavados del sistema y los lavados del filtro, y 5) la densidad del tampón FFT3. Los casetes de membrana de FFT3 se descartaron después de cada lote (es decir, los casetes no se reutilizan).

15 **Tabla 8: Tampones para FFT3**

Nombre de la Solución	Composición
Tampón para FFT3 opción 1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxámero 188, pH 8,0 ± 0,1 a 20°C
Tampón para FFT3 opción 2	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,005% Poloxámero 188, pH 8,0 ± 0,1 a 20°C

- Se realizaron dos enjuagues sucesivos de 20 ml de las membranas FFT con el Tampón para FFT3 para recuperar el vector del sistema FFT. Los enjuagues se recuperaron a través de un filtro de grado de esterilización EKV Pall Supor® de 0,2 mm (Mini Kleenpak). Se realizó un enjuague del filtro con Tampón para FFT3 para recuperar cualquier vector remanente en el filtro y con el fin de ajustar el volumen final del Pool de Filtrado FFT3 (es decir, la Sustancia Farmacológica “DS”). La sustancia farmacológica se dividió en alícuotas en botellas de PETG de 125 o 250 ml y se congeló a <-60 °C.

Ejemplo 4 – Formulación y Llenado

- 25 El Producto Farmacológico (PF) fue una infusión intravenosa de dosis única, sin conservantes, estéril, de transparente a ligeramente opaca y de incolora a débilmente blanca, del vector AAV9 auto complementario no replicante a una concentración objetivo de 2,0 x 10¹³ vg/ml. El producto farmacológico contenía 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 0,005% p/v de Poloxámero 188.
- 30 El rango de pH de la solución fue de 7,7 a 8,3.

Tabla 9: Operación de la Unidad de Productos Farmacológicos – Composición de Tampones

Nombre de la Solución	Composición
Tampón de la Formulación del Producto Farmacológico, opción 1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxámero 188, pH 8,0 ± 0,1
Tampón de la Formulación del Producto Farmacológico opción 2	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,005% Poloxámero 188, pH 8,0 ± 0,1

El producto farmacológico fue colocado en viales estériles Crystal Zenith (CZ) de 10 ml, listos para
5 usar, tapados con tapones elastoméricos de clorobutilo estériles, listos para usar, y sellados con
sellos de aluminio estériles de 20 mm. Los viales se llenaron con un volumen de llenado nominal de
5,5 ml u 8,3 ml. El sobrellenado objetivo fue de 0,4 ml, y los viales se llenaron a 5,9 ± 0,1 ml o 8,7
± 0,1 ml.

Ejemplo 5 - Ensayo de potencia

La potencia relativa del producto farmacológico se midió usando un ensayo cuantitativo in vivo. El
ensayo utilizó un modelo de ratón establecido de la enfermedad de AME. Las parejas reproductoras
del ratón de la cepa AMEΔ7 (Jackson Laboratories, # 005025) son fenotípicamente normales, pero ~
25% de sus descendientes son homocigóticos para la mutación del gen de SMN objetivo y muestran
15 el fenotipo similar a AME. Al día 5, muestran signos de debilidad muscular y en la semana siguiente
desarrollan una marcha anormal y tendencia a caerse. Jackson Laboratories informa que la
supervivencia media para animales con el fenotipo similar a AME es de ~ 15 ± 2 días. Los estudios
piloto demostraron un tiempo medio de supervivencia para animales no tratados con fenotipo similar
a AME de 16,3 días (media geométrica; n = 3 estudios; 10 ratones por estudio).

El producto farmacológico biológicamente activo administrado por infusión intravenosa (IV) produce
un aumento en el tiempo de supervivencia en función de la dosis (vg/kg). La potencia del producto
farmacológico se midió en relación con el material de referencia (lote previo de vector). El título del
producto farmacológico y el material de referencia (genomas de vector/ml; vg/ml) se determinaron
25 por reacción en cadena de la polimerasa de gotas digital (ddPCR). El vector se diluyó en solución
salina para lograr cada uno de los tres niveles de dosis especificados que se administrarán a ratones
con el fenotipo similar a AME.

Los resultados de un ensayo se consideran aceptables si el ensayo pasa la idoneidad. La idoneidad del ensayo consiste en lo siguiente:

1. Límite de aceptación para la muestra de control negativo (15 ± 2 días, Supervivencia Media)
2. Límite de aceptación para la muestra de control positivo (> 40 días, Supervivencia Media)
3. Límites de aceptación sobre curva de respuesta a la dosis de Supervivencia Media del estándar de referencia

Se utilizó un lote previo de vector (en adelante, Lote Previo) en este estudio para determinar la correlación lineal entre la supervivencia media (días) del ratón AMEΔ7 al recibir el medicamento (en adelante, Lote de Muestra) a cinco niveles de dosis diferentes, incluyendo la Dosis 0 (cero) utilizando solución salina al 0,9% (grupo no tratado). La Tabla 10 ilustra la curva de calibración utilizando el lote de referencia de Lote Previo.

Tabla 10: Curva de calibración utilizando cinco niveles de dosis de AVXS-101

Estándar de referencia del lote previo a lo largo del tiempo

Dosis (vg/kg)	Supervivencia media (días)						
	0 meses			3 meses			6 meses
	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Replicado 1
	n=44	n=32	n=38	n=21	n=21	n=21	n=22
0	15	16	15	15	14	16	16
1.21E+13	24	23	25	21	21	21	22
7.38E+13	31	29	27	29	29	ND	28
1.18E+14	ND* (>103)	ND* (>115)	79	-	-	-	-
2.94E+14	ND* (>131)	-	-	ND* (>47)	ND* (>47)	ND* (>37)	ND* (>41)

* No determinado (ND) – La Supervivencia Media (días) no fue alcanzada al 24/08/2017

Los datos de este estudio demostraron que el rango lineal de la mediana de la curva dosis-respuesta de supervivencia fue de 0-7,4 vg/kg. La potencia relativa del Lote de Muestra del producto farmacéutico se estableció comparando la curva de regresión lineal del estándar de referencia del Lote Previo con la curva de regresión lineal del Lote de Muestra del producto farmacológico. Esto se logró utilizando la relación entre la intersección en y y la pendiente de cada línea de regresión lineal (es decir, Estándar de referencia y Artículo de prueba). El cálculo de la Potencia Relativa porcentual se describe en la ecuación (1) a continuación:

$$\% PR = [(Intersección-y/pendiente del Artículo de Prueba) \div (Intersección-y/pendiente del Estándar de Referencia)] \times 100 \quad (1)$$

El Lote Previo utilizado en el ensayo clínico de fase 1 fue utilizado como el lote de Estándar de Referencia y se le asignó una potencia de 100%.

Los datos anteriores establecieron los criterios preliminares de aceptación del ensayo utilizando la porción lineal de la curva de respuesta a la dosis de supervivencia media para determinar la potencia relativa de los lotes clínicos del producto farmacológico, de la siguiente manera:

- La curva de respuesta a la dosis de supervivencia media (días) se generó usando 5 niveles de dosis (vg/kg)
- Las dosis 0, 1,2E+13 y 7,4E+13 fueron seleccionadas para correr un modelo de respuesta a la dosis lineal.
- Los límites de adecuabilidad para la solución salina (grupo sin tratar) fueron una supervivencia media de 13 a 17 días.
- Los límites de adecuabilidad para la muestra de estándar de referencia se establecieron como:
 - o Pendiente $\geq 2,0E-13$
 - o Intersección-y $\geq 16,00$ (días)
 - o Intersección-y/Relación de Pendiente $\geq 8,5E+13$
 - o $R^2 \geq 0,7$

El modelo de ratón $\Delta 7$ se utilizó para demostrar la eficacia de la terapia de la AME, incluido el producto farmacológico. Con una supervivencia media de 15 días $\pm$ 2 días, los animales de control tratados con solución Tampón para FFT3 (vehículo) proporcionan un control de referencia confiable a partir del cual la potencia del producto puede medirse como un aumento en la supervivencia media.

El trabajo de desarrollo con el producto farmacológico identificó tres (3) dosis (excluyendo la dosis tratada con el vehículo) determinadas por Genomic Titer usando PCR de Gotas Digital (ddPCR) que afectan la supervivencia en el modelo de ratón con una correlación lineal cuando la dosis administrada (vg/kg) se transforma logarítmicamente y se traza contra la Supervivencia Media (en días) del ratón neonatal AME $\Delta 7$ tratado. Véanse los títulos estándar (vg/mL) en la Tabla 11 para los estándares de títulos bajo, medio y alto. Además, la solución de Tampón FFT (vehículo) se utiliza tanto para el punto de la curva de calibración cero (0) como para un control negativo. También se incluyó como control positivo una dosis que demostró una supervivencia ≥ 40 días (más que la dosis que demuestra duplicar la supervivencia media).

Tabla 11: Dosis Objetivo

Dosis (vg/kg)	Supervivencia Media (días)	Estándares y Controles
Solución de Tampón para FFT3 (Vehículo)	15 $\pm$ 2	Control Negativo (sin tratar)

1,10x10 ¹⁴	≥ 40 días Supervivencia Media	Control Positivo
1,00x10 ¹²	16±2	Estándar-1
1,2x10 ¹³	22 ± 3	Estándar -2
7,5x10 ¹³	31 ± 3	Estándar -3

Preparaciones de solución de dosis (refiérase a la Tabla 12 por el ejemplo del esquema de dilución).

Control Negativo -- La Solución Tampón para FFT3 (Tampón de formulación final del Producto Farmacológico) se usa como Control Negativo

5 Control Positivo -- El lote de Artículo de Prueba se prepara a 1,10x10¹⁴ vg/kg usando Solución Tampón para FFT3. Véase la Tabla 12 por el ejemplo de esquema de dilución.

Soluciones de Estándar de Referencia -- El lote de Estándar de Referencia se prepara en tres concentraciones delineadas en la Tabla 11 usando la Solución Tampón para FFT3.

Tabla 12: Estándar de Referencia y Esquema de Dilución de Artículo de Prueba (Ejemplo)

Dosis (vg/kg)	Estándar de Referencia /Título de ddPCR del Artículo de Prueba (vg/mL)	Conversión a vg/μL	Estándar de Referencia/Volumen del Artículo de Ensayo a usar (μL)	Solución Salina (μL)	Volumen de Dosis Total (μL)
1,2x10 ¹³	5,0x10 ¹³	5,0x10 ¹⁰	2,6	47,4	50,0

10

Preparación del artículo de prueba: El artículo de prueba se diluyó usando Solución Tampón para FFT3. Las diluciones se calcularon para generar las dosis de prueba (vg/kg) delineadas en la Tabla 11 por ratón en un volumen final total de 50 μl. Se prepararon diluciones para 12 ratones a la vez con un volumen adicional como Control Positivo dirigido a aumentar la vida mínima de los ratones tratados a ≥40 días de Supervivencia Media (días).

15

Límites de aceptación en las muestras de control

Control Negativo (ratones sin tratar) -- El límite de aceptación del ensayo para el grupo de Control Negativo fue que los ratones AMEΔ7 alcancen la supervivencia media de 15±2 días. Además, todo ratón que fallezca en ≤10 días será excluido del análisis.

20

Control Positivo (grupo tratado a la dosis clínica objetivo) -- El límite de aceptación del ensayo para el grupo de Control Positivo fue que, como mínimo, la vida de los ratones tratados

alcanzara ≥ 40 días de Supervivencia Media. Además, todo ratón que fallezca en ≤ 10 días será excluido del análisis.

Límites de aceptación en la curva de respuesta a la dosis del Estándar de Referencia

- 5 Los criterios de idoneidad del ensayo se determinarán para la curva de respuesta a la dosis lineal estándar de referencia que representa la Supervivencia Media (días) frente a la dosis administrada (vg/ml). Véase la Tabla 13 por los criterios de idoneidad del ensayo.

Tabla 13: Criterios de Idoneidad del Ensayo (Curva del Respuesta a la Dosis Lineal del Estándar de Referencia)

Lote Testeado	Pendiente	Intersección	Relación Intersección/Pendiente	R ²	Potencia Asignada
Estándar de Referencia	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,5$	$\geq 8,5 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	100,0
Artículo de Prueba	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,0$	$\geq 8,0 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	-

- 10 Relación Intersección-Y/Pendiente -- Una curva de regresión lineal de la Supervivencia Media (días) versus la dosis administrada (vg/kg) para el Estándar de Referencia y el Artículo de Prueba es determinada. Se calcula la relación de Intersección-y a la pendiente para cada regresión lineal.

Resultados de los informes

- Informe Cualitativo de los Resultados de Potencia Relativa -- Los criterios de Idoneidad del Ensayo se evalúan para cada ensayo antes de la determinación de una lectura de un solo punto de la Supervivencia Media (días) a ≥ 40 días para el material de Control Positivo. Si la Supervivencia Media del grupo de Control Positivo es ≥ 40 días, el Artículo de Prueba puede ser utilizado si se cumplen los siguientes criterios.

- 20 Informe Cuantitativo de los Resultados de Potencia Relativa -- Los criterios de Idoneidad del Ensayo se evalúan para cada ensayo antes de la determinación cuantitativa de la Potencia Relativa para el Artículo de Prueba. La potencia relativa para el Artículo de Prueba se puede reportar una vez que el control Positivo alcanza ≥ 40 días y se logra la Supervivencia Media de 31 ± 3 días para el grupo de ratones que representa la dosis estándar superior de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg. La Potencia Relativa Porcentual (% PR) para un Artículo de Prueba se calculará utilizando la intersección en y la pendiente de respuesta a la dosis de la regresión lineal de Supervivencia Media (días) de la siguiente manera:

$$\% \text{ PR} = 100\% * [(\text{Artículo de Prueba intersección en y/pendiente}) \div (\text{Estándar de Referencia intersección en y/pendiente})]$$

Ejemplo 6: Estudio de inactivación de tensioactivo

Para separar la influencia del pH bajo y la interpolación, se usó una muestra de sustancia farmacológica Intermedia de FFT1 que tiene un pH de 7,6 y Tween-20 al 4-8% para el estudio de inactivación con tensioactivo. La concentración de Tween-20 en el Intermedio de FFT1 es aproximadamente 2,5 veces menor que en el proceso completo cuando Tween-20 se agrega al Intermedio de FFT1 antes de la acidificación. Esta concentración más baja de Tween-20 se consideró el peor escenario para la inactivación dirigida por tensioactivo en el proceso de la sustancia farmacológica. El artículo de prueba para el paso de inactivación del virus por tratamiento con tensioactivo fue el Intermedio de FFT-1 que contiene 4-8% de Tween-20. Para evaluar la capacidad de inactivación del virus mediante el paso de tratamiento con tensioactivo, se utilizaron XMuLV y PRV con el fin de enriquecer el artículo de prueba con virus en experimentos duplicados. El virus se cuantificó usando un ensayo de infectividad de formación de placa.

El paso de fabricación de FFT1 genera un rango de concentración de tensioactivo de 4-8% Tween-20. Se formó un pool del Intermedio de FFT1, y se agregó 12% más de Tween-20 al Intermedio de FFT1 a una temperatura operativa de 16-20°C con mezcla durante 12-20 horas. El proceso de aclaramiento viral se realizó a una concentración de 4-8% Tween-20 y a una temperatura controlada de $16,0^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. La duración del proceso de inactivación fue de 120 minutos versus el tiempo de proceso típico de 16 horas.

Para el proceso de inactivación, la carga de inactivación se preparó midiendo el volumen del artículo de prueba, equilibrándolo a la temperatura objetivo y luego enriqueciendo con virus. Se retiraron muestras de la carga de inactivación enriquecida en seis (6) puntos temporales para demostrar la cinética de la inactivación a lo largo del tiempo: <1 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, y 120 minutos. Después de la recolección, cada muestra se diluyó en medio de crecimiento para detener la inactivación del virus, y se analizó el virus. Para aumentar la sensibilidad del ensayo a los 90 minutos y 120 minutos, también se analizaron grandes volúmenes de muestras de estos puntos temporales para detectar virus. Debido a la presencia de Tween-20 en el artículo de prueba para este paso, el título de la carga de inactivación se calculó a partir del título del virus de enriquecimiento y el volumen del virus enriquecido.

Se demostró que la efectividad de la inactivación del virus mediante el tratamiento con tensioactivo (Tween-20) es efectiva según lo demuestran los valores de LRV mayores a $4 \log^{10}$ para ambos virus en el punto de tiempo de 90 minutos. La cinética de inactivación por tratamiento con tensioactivo se

ilustra en la Figura 6 y la Figura 7 en forma de gráficos de la tasa de inactivación del virus en el transcurso de 120 minutos durante el tratamiento con tensioactivo Tween-20.

Ejemplo 7: Efecto de una mayor densidad de siembra, transfección y cosecha previa y tiempos de mezcla de ADN/PEI en la producción de sustancias farmacológicas

Se evaluó el efecto de una mayor densidad de siembra, transfección y cosecha un día antes y los tiempos de mezcla de ADN/PEI en la producción de la sustancia farmacológica. Cada condición se evaluó por duplicado en un biorreactor de 1,6m².

MATERIALES Y MÉTODOS

Escalado de las Células

Las células HEK 293 fueron descongeladas y resuspendidas en DMEM suplementado con 10% de FBS. Las células se centrifugaron a 209 x g, 5 min, a temperatura ambiente, luego se retiró el sobrenadante y se agregó DMEM nuevo+10% de FBS. Las células se contaron para determinar la densidad y viabilidad de las células viables y se sembraron en 2 matraces T de 175cm² y se incubaron a 37,0°C, 5% de CO₂ durante tres días hasta que los cultivos alcanzaron ~ 90% de confluencia. Para cada paso de las células, se eliminaron los medios agotados, los matraces se lavaron con PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) a 0,08 ml/cm², y luego los matraces se trataron con TrypLE Select (0,04 ml/cm²) y se incubaron a 37,0°C, 5% CO₂ durante 2-3 minutos. La tripsina se inactivó con DMEM + FBS al 10% (0,04 ml/cm²). Las células se expandieron y sembraron según el diagrama de la Figura 8.

Inoculación y Monitoreo de las Células

Los biorreactores se inocularon por duplicado con células HEK 293 a una densidad objetivo de 8,000 células/cm² y 12,000 células/cm² en medios de crecimiento (DMEM con alto contenido de glucosa + 10% Australian Origin FBS + 1:100 Penicilina Estreptomicina (Pen Strep) con agitación. Los parámetros del proceso se fijaron en pH 7,23, 37,0°C, 55% oxígeno disuelto (OD) y una velocidad lineal de 2cm/s. 24 horas después de la siembra, la recirculación con medio de crecimiento DMEM (0,188 ml/cm²) se activó a una velocidad de recirculación (12,5 ml/min). Las muestras diarias tomadas para pH, metabolitos y nutrientes fuera de línea se leyeron usando un Nova BioFlex. Al día cuatro (12,000 células/cm²), al día cinco (8,000células/cm²) y al día nueve luego de la siembra, se eliminaron tres fibras y se lisaron con 1:1:1 v/v PBS, solución A100 y B100 (ChemoMetec) y se

procedió al recuento (NucleoCounter NC-200) de núcleos totales para monitorear el crecimiento del cultivo.

Transfección

5 Al día cuatro (12,000 células/cm²) y día cinco (8,000 células/cm²) después de la inoculación celular, se detuvo la recirculación y las células en cada biorreactor se transfectaron con ADN de plásmido y Polietilenimina (PEI). El ADN y PEI se mezclaron en una relación de 1:1 mg/mg. Los ADN de Plásmido se transfectaron en una relación en masa de 1:1,5:2 agregándose plásmido pSMN, plásmido pAAV2/9 y plásmido pHELP a medios DMEM -/-; alta glucosa, -CaCl₂, - L-glutamina y 0,2 µM
10 filtrados y mezclados por inversión. Se agregó PEI a medios DEMEM -/- y se mezcló por inversión. Luego se agregó PEI al ADN, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para las 8,000 células/cm² (control) y 12,000 células/cm². El ADN/PEI se incubó durante 1 hora y 2 horas para las otras dos condiciones de 8,000 células/cm². Esta mezcla de complejo de ADN/PEI se usó para transfectar dos biorreactores para cada una de las cuatro condiciones. Se agregó
15 complejo de ADN/PEI a cada biorreactor y se incubó a los parámetros del proceso durante dos horas. Dos horas después de la transfección el circuito de recirculación se volvió a encender.

Medios de Intercambio Post Transfección

24 horas después de la transfección, todos los medios en biorreactores y circuitos de recirculación
20 fueron retirados y reemplazados por OptiMEM + 1:100 Pen Strep (0,132 mL/cm²) y recirculados durante 24 horas a los parámetros del proceso. 48 horas después de la transfección, todos los medios se eliminan solamente de la recirculación y se reemplazan con OptiMEM + 1:100 Pen Strep (12 mL/min) recirculándose a los parámetros del proceso.

Cosecha

Al día ocho (12,000 células/cm²) y día nueve (8,000 células/cm²) después de la inoculación celular, se agregó Benzonase (100 U/mL), se arrastró con Tampón de Lisis (HEPES 50 mM, Tween 20 al 1%), y se incubó durante dos horas a los parámetros del proceso. Los biorreactores se drenaron y se incorporó solución de sal de Sacarosa (NaCl 500 mM, 1% p/v de sacarosa), y se mezcló por inversión.
30 Los biorreactores se lavaron con tampón de enjuague biorreactor (500 mM NaCl, 1% p/v de Sacarosa, 20 mM Tris Base, 1% v/v Tween 20, 1 mM MgCl_{2,6}H₂O) durante aproximadamente 15 minutos a los parámetros del proceso. Los biorreactores se drenaron y el tampón de enjuague del biorreactor se combinó con la cosecha en bruto cruda, se mezcló por inversión y se muestreó para el ensayo de ddPCR.

Filtración de Profundidad y Filtración de Flujo Tangencial

Al día ocho (12,000 células/cm²) y día nueve (control 8,000 células/cm²), luego de la inoculación celular, los biorreactores fueron cosechados, se tomaron muestras y el lisado crudo fue agrupado para cada condición (n = 2 biorreactores). El lisado agrupado luego se aclaró a través de Millistak C0HC Pod, filtro de 270 cm² y Millipak 40, 0,45 µm, Durapore, filtro de pulido de 200 cm² (EMD Millipore). Se tomaron muestras luego de C0HC+0,45 y se congelaron a -80,0 °C. El lisado clarificado se concentró luego a través de flujo tangencial con un filtro Pellicon® 2 Módulo de Ultrafiltración PLCMK C 0,1m² (EMD Millipore). Se usaron al menos 6 diavolumenes para diafiltrar el producto final. Se obtuvieron muestras de filtración posteriores a FFT1 y se congelaron a -80,0°C. Todas las muestras se usaron para el título de AAV2/9 y proteína de la célula huésped.

Los plásmidos se usaron para producir Sustancia Farmacológica en biorreactores. Los datos representan cada condición por duplicado, número de biorreactor correspondiente y condición según la Tabla 14.

Tabla 14: Números de biorreactor y condiciones correspondientes.

Número de Biorreactor	Densidad de Siembra células/cm ²	Día de Transfección	Tiempo de Incubación de PEI/ADN (minutos)	Día de cosecha
221, 222	12,000	4	20	8
223, 224*	8,000	5	20	9
225, 226	8,000	5	60	9
227, 228	8,000	5	120	9

Crecimiento celular: Las células se contaron el día de la siembra (Día 0), y los núcleos se contaron el día 4 (12,000 células/cm²), día 5 (8,000 células/cm²) y día 9 luego de la siembra. Los datos indican que las células en todos los reactores crecieron exponencialmente entre el día 0 y el día 5. Después de la transfección, el recuento de núcleos del día 9 sugiere que el biorreactor 221 aumentó 2,0 veces el total de núcleos del día 5 al día 9. Todos los demás reactores (222 a 228) no exhibieron un crecimiento significativo entre el día 5 y el día 9. El aumento en el crecimiento en el biorreactor 221 puede ser un artefacto basado en la distribución desigual de las células en las fibras individuales utilizadas para el recuento total de núcleos. Es posible que las células en todos los biorreactores crecieran de manera similar según los datos de metabolitos que se indican en las Figuras 9A-E.

pH, Nutrientes y Metabolitos: El consumo de glucosa mostró la misma tendencia en todos los cultivos de biorreactores, lo que sugiere que a pesar del aumento en la curva de crecimiento del biorreactor 221, las células consumieron glucosa a tasas similares. El pH para los biorreactores sembrados a 12,000 células/cm² promedió 7,06 y 8,000 células/cm² promedió 7,18 durante los primeros tres días. El pH disminuyó ligeramente con el aumento del metabolismo de los nutrientes, y aumentó al día 9 en concurrencia con el aumento de los niveles de iones de amonio. El lactato aumentó hasta el día 5 (biorreactores 221, 223, 224, 225, 227) y el día 6 (biorreactores 222, 226, 228) luego se estabilizó hacia el final de la producción, lo que sugiere la utilización de lactato como fuente de energía en esta etapa.

Títulos de Producción

Los genomas virales del material de cosecha se midieron mediante gota digital (ddPCR). Los títulos fueron aproximadamente 1,5 veces más altos en los biorreactores sembrados a 12,000 células/cm² con una medida de título promedio de 6,37E+10vg/mL (n=2) frente a los biorreactores de control sembrados a 8,000 células/cm² con una medida de título promedio de 4,33E+10vg/ml (n=2). Los datos de títulos sugieren que la siembra a una densidad más alta, la transfección y la cosecha un día antes respaldan mayores rendimientos de producción de sustancia farmacológica. El rendimiento del título para ADN/PEI incubado durante una hora exhibió una disminución de 1,4 veces en el título promedio medido (3,17E10vg/mL n = 2) y para la incubación de dos horas el título promedio medido fue una disminución de 1,6 veces (2,67E10vg/mL n = 2) en comparación con el control en el que se incubó ADN/PEI durante 20 minutos (4,33E10vg/ml n = 2). Los datos sugieren que un mayor tiempo de incubación conduce a una disminución del título. Esto puede deberse a que el ADN y la PEI forman complejos grandes que no pueden transfectar eficazmente las células HEK293. La producción de virus por ml y los valores de área de superficie se indican en la Figura 10, en comparación con la producción en un proceso conocido como control positivo.

El título viral medido en cada etapa de los pasos de clarificación y concentración se indica en la Figura 11. La proteína residual de la célula huésped en cada etapa durante el paso de FFT1 se indica en las Figuras 12A-B.

Ejemplo 8: Efecto de la Densidad de Siembra sobre la Producción de Sustancia Farmacológica

Se evaluó el efecto de la densidad de siembra en la producción de sustancia farmacológica. Se evaluaron cuatro densidades de siembra y cada densidad de siembra se duplicó en un biorreactor.

5

Escalado de las Células

Las células HEK 293 fueron descongeladas y resuspendidas en DMEM suplementado con 10% de FBS. Las células se centrifugaron a 209 x g, 5 min, a temperatura ambiente, luego se retiró el sobrenadante y se agregó DMEM nuevo+10% de FBS. Las células se contaron para determinar la densidad y viabilidad de las células viables y se sembraron en 2 matraces T de 175cm² y se incubaron a 37,0°C, 5% de CO₂ durante cuatro días hasta que los cultivos alcanzaron ~ 90% de confluencia. Para cada paso de las células, se eliminaron los medios agotados, los matraces se lavaron con PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) a 0,08 ml/cm², y luego los matraces se trataron con TrypLE Select (0,04 ml/cm²) y se incubaron a 37,0°C, 5% CO₂ durante 2-3 minutos. La tripsina se inactivó con DMEM + FBS al 10% (0,04 ml/cm²). Las células se expandieron y sembraron según el diagrama de la Figura 13.

Inoculación y Monitoreo de las Células

Los biorreactores se inocularon con células HEK 293 a cuatro densidades objetivo, cada una por duplicado 8,000 células/cm², 9,350 células/cm², 10,700 células/cm² y 12,050 células/cm² en 700 ml de medios de crecimiento (DMEM de alta glucosa + 10% Australian Origin FBS + 1:100 Pen Strep) con agitación. Los parámetros del proceso se establecieron en pH 7,23, 37,0°C, 55% oxígeno disuelto (OD) y una velocidad lineal de 2 cm/s. 24 horas después de la siembra, la recirculación con medios de crecimiento DMEM (volumen total actual 0,188 ml/cm²) se activó a una velocidad de recirculación (12,5 ml/min). Se tomaron muestras diarias de pH, metabolitos y nutrientes fuera de línea utilizando un Nova BioProfile 400. El día cinco y nueve días después de la siembra, se eliminaron tres fibras y se lisó con solución 1:1:1 v/v de PBS, A100 y B100 (ChemoMetec) y se procedió al recuento (NucleoCounter NC-200) de núcleos totales para controlar el crecimiento del cultivo.

Transfección

Al día cinco después de la inoculación celular, se detuvo la recirculación y los medios en cada cámara de biorreactor se reemplazaron con 600 ml de medio DMEM -/- (alta glucosa, -CaCl₂, -L-glutamina). Cada reactor fue transfectado con ADN de plásmido y Polietilenimina (PEIpro) en una relación en masa de 1:1. Los ADN de Plásmido se mezclaron bajo una relación en masa de 1:1,5:2 (pSMN - 3,56

mg, pAAV2/9 - 5,34 mg, y pHELP - 7,1 mg), agregados a 300 mL de medios DEMEM -/-, 0,2 μ M filtrados y mezclados por inversión. Se agregó PEI (16 mL) a los 300 mL de medios DEMEM -/- y se mezcló por inversión. Las mezclas de PEI y ADN se combinaron, mezclaron por inversión e incubados a temperatura ambiente durante 20 minutos. Cada 600 ml de mezcla de complejo PEI/ADN se usó para transfectar dos Biorreactores, repitiéndose para cada densidad de siembra correspondiente. El complejo PEI/ADN fue incorporado a cada biorreactor y se incubó a los parámetros del proceso durante dos horas. El circuito de recirculación fue encendido nuevamente dos horas después de la transfección (12,5 mL/min).

10 Intercambio de Medio de Post Transfección

24 horas después de la transfección, todos los medios en biorreactores y circuitos de recirculación fueron retirados y reemplazados por OptiMEM (0,132 mL/cm²) y recirculados (12,5 mL/min) durante 24 horas a los parámetros del proceso. 48 horas después de la transfección, los medios en la botella de recirculación fueron intercambiados con OptiMEM nuevo y recirculados a los parámetros del proceso (12 mL/min).

Cosecha

Al día nueve luego de la inoculación celular, se agregó Benzonase (100 U/mL), se arrastró con Tampón de Lisis (50 mM HEPES, 1% Tween 20), y se incubó durante dos horas a los parámetros del proceso. Los biorreactores fueron drenados y se incorporó Solución de Sal de Sacarosa (500mM NaCl, 1% p/v de Sacarosa), y se mezcló por inversión. El biorreactor fue lavado con tampón de enjuague biorreactor (500 mM NaCl, 1% p/v de Sacarosa, 20 mM Tris Base, 1% v/v Tween 20, 1 mM MgCl₂·6H₂O) durante 15 minutos a los parámetros del proceso. Los biorreactores se drenaron y el tampón de enjuague del biorreactor se combinó con la cosecha bruta en crudo, se mezcló por inversión y se muestreó para el ensayo ddPCR.

Los plásmidos se usaron para producir Sustancias Farmacológica en los biorreactores. Los reactores se sembraron a diferentes densidades, y se transfectaron y cosecharon en el mismo horario (día 5, día 9 después de la siembra, respectivamente). Los datos representan duplicados de cada densidad de siembra, según lo ilustrado en la Tabla 15 a continuación:

30 **Tabla 15: Densidad de Siembra Inicial, Número de Biorreactor**

8,000 células/cm ²	221, 222
9,350 células/cm ²	223, 224
10,700 células/cm ²	225, 226
12,050 células/cm ²	227, 228

Crecimiento Celular:

Las células se contaron el día de la siembra (Day 0), y los núcleos se contaron al día 5 y 9 luego de la siembra. Los datos indican que las células en todos los reactores crecieron exponencialmente entre el día 0 y el día 5. A pesar de las diferencias en las densidades de siembra iniciales, los recuentos de núcleos no indican diferencias importantes en el número de células entre los grupos al día 5. Después de la transfección, el recuento de núcleos del día 9 sugiere que cinco de los reactores (221, 224, 225, 226, 228) duplicaron el total de núcleos desde el día 5 hasta el día 9. Dos reactores (222, 223) aumentaron 1,4 veces el total de núcleos, según lo indicado en la Figura 14A. El reactor 227 aumentó 3,8 veces el total de núcleos del día 5 al día 9. Esta diferencia puede ser un artefacto basado en la distribución desigual de las células entre las fibras individuales utilizadas para los recuentos. Es posible que las células en todos los reactores crezcan de manera similar en base a los datos de metabolitos indicados en las Figuras 14B-E.

pH, Nutrientes y Metabolitos:

El consumo de glucosa (Figura 14B) mostró la misma tendencia en todos los cultivos de biorreactores, lo que sugiere que a pesar de las diferencias en las densidades de siembra iniciales, los cultivos consumieron glucosa a tasas similares. El pH fuera de línea (Figura 14C) permaneció constante (pH 7,25) durante los primeros tres días en todos los cultivos, disminuyó con un mayor metabolismo de nutrientes y aumentó después del día 8 en forma concurrente con un aumento en los niveles de iones de amonio (Figura 14E). El lactato (Figura 14D) aumentó hasta el día 6 y luego se estabilizó hacia el final de la producción, lo que sugiere la utilización de lactato como fuente de energía en esta etapa. No se observaron diferencias significativas en los perfiles de metabolitos entre los reactores sembrados a diferentes densidades de partida. Esto podría deberse a que la diferencia en las densidades de siembra iniciales es mínima, <1,2 veces de diferencia.

Títulos de Producción

Los genomas virales del material de cosecha se midieron mediante gota digital (ddPCR). Los títulos fueron comparables entre las densidades iniciales de siembra de 8,000 células/cm² y 10,070 células/cm², con un promedio de $3,99E + 10 \pm 2,1E + 09$ vg/mL ($n = 2$) y $3,70E + 10 \pm 7,4E + 09$ vg/mL ($n = 2$), respectivamente. Por una razón no identificable, los reactores sembrados a 9,350 células/cm² exhibieron una medida de título promedio de $5,02E + 08$ vg/mL ($n = 2$), aproximadamente 2 registros más bajos que los títulos promedio de los reactores sembrados en densidades de flanco. Es probable que esta diferencia sea el resultado de un error operativo no identificado durante la

transfección o la cosecha, más que la falta de productividad a esta densidad de siembra. Los reactores replicados sembrados a 12,050 células/cm² demostraron una diferencia de dos veces entre sí, con un reactor en el rango observado para las densidades de siembra más bajas, 3,2E + 10 vg/ml, mientras que el segundo produjo un título de solo 1,4E + 10 vg/ml . La producción de virus por ml y los valores del área de superficie se indican en la Figura 15A.

Se evaluaron la densidad de siembra y la producción de sustancia farmacológica, conforme se indica en la Figura 15B. Las células HEK 293 sembradas en el rango de 8E + 03 a 10E + 03 células/cm² mostraron perfiles de crecimiento, pH, consumo de glucosa, lactato y generación de amoníaco consistentes. Además, se produjeron títulos comparables que sugieren una densidad de siembra ligeramente más alta que no tiene un impacto negativo en la producción. Por otro lado, los reactores sembrados a la densidad más alta de 12x10³ células/cm² exhibieron más variabilidad entre duplicados, incluyendo un título promedio más bajo en comparación con otras condiciones, lo que sugiere que el enfoque utilizado en este experimento puede no ser óptimo para la producción. Estos resultados apoyan la siembra de células a una densidad que oscila entre 8x10³ y 1x10⁴ células/cm² para experimentos de biorreactor.

Ejemplo 9: Evaluación de Comparabilidad

La comparabilidad entre el producto farmacológico AVXS-101 utilizado en los estudios clínicos de Fase 1 (Proceso A) y el producto farmacológico utilizado en los estudios clínicos pivotaes (Proceso B) se evaluó como el objetivo principal con un objetivo secundario para determinar la consistencia de fabricación utilizando el Proceso B mediante la comparación de los Lotes de producto 600156 y 600307. La Figura 16 representa los flujos de los procesos de fabricación Fase 1 (Proceso A) y Fase 3 ensayo (Proceso B) y las diferencias entre ellos.

La evaluación de comparabilidad se realizó utilizando el producto farmacológico clínico de Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613 fabricado en Nationwide Children's Hospital (NCH) y el producto farmacológico Lote 600156 fabricado en AveXis.

30

Producto

Se evaluaron los siguientes lotes de material, tal como se resume en la Tabla 16. La evaluación incluyó una comparación directa de los atributos de calidad resultantes del producto farmacológico

clínico de Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613 usando el Proceso A y el producto farmacológico AVXS-101 Lote 600156 usando el Proceso B. Además, los resultados de las pruebas de lanzamiento del lote 600156 con el lote 600307 se evaluaron de manera integral para determinar la reproducibilidad y la consistencia del proceso de escalado.

5

Tabla 16: Producto Farmacológico AVXS-101 a ser Evaluado en cuanto a la Comparabilidad Entre el Proceso A (Fase 1) y el Proceso B (Fase 3) y Consistencia de Fabricación para el Proceso B

Uso	Número de Lote	Fecha de fabricación	Fecha de fabricación	Condición de almacenamiento
Estudio Fase 1	NCHAAV9SMN0613	10/12/13	Proceso A	≤ -60°C
Estudio Fase 3	Lote de AVXS-101 600156	07/11/17	Proceso B	≤ -60°C
	Lote de AVXS-101 600307	04/12/17	Proceso B	≤ -60°C

10

Generalidades del Proceso de Fabricación

La Figura 17A-B proporciona un resumen de los resultados de comparabilidad.

15

Evaluación de Comparabilidad y Consistencia de Fabricación

Los materiales del Proceso A y Proceso B fueron evaluados como comparables y los materiales de Proceso B fueron evaluados como consistentes. También se determinó que los materiales del Proceso B tienen beneficios adicionales, por ejemplo, para la producción a escala industrial.

20

Métodos de Prueba

pH

25

El análisis del pH se realizó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Los resultados de ambos procesos oscilaron entre 7,9 y 8,0. Esto demostró que el pH de los materiales de Proceso A y Proceso B eran comparable y que los materiales de Proceso B son consistentes.

30

Aspecto

El Aspecto por inspección visual fue determinado sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Las diferencias aparentes en los resultados

de apariencia entre el Proceso A y Proceso B se debieron a diferentes concentraciones de vectores (título genómico). El lote NCH AAV9SMN0613 tenía una concentración de vector más baja que los lotes de Proceso B. Como resultado de ello, el lote NCH AAV9SMN0613 fue más diluido, lo que condujo a una solución más clara e incolora, mientras que las observaciones de incoloras a blancas y ligeramente opacas para los lotes de Proceso B resultan de una concentración aproximadamente 4 veces mayor de partículas virales en solución por ml.

10

Teniendo en cuenta la diferencia de concentración, se determinó que la apariencia de los materiales del Proceso A y Proceso B fue comparable y que los materiales del Proceso B fueron consistentes.

Osmolalidad

15

La osmolalidad por depresión del punto de congelación se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Los resultados de ambos procesos oscilaron entre 410-415 mOSm/kg. Esto demostró que la osmolalidad de los materiales del Proceso A y el Proceso B fue comparable y que los materiales del Proceso B fueron consistentes.

Partículas Subvisibles

20

Las partículas subvisibles por oscurecimiento de luz se ejecutaron con el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Los resultados de ambos procesos estuvieron muy por debajo de los límites recomendados en la monografía de la USP para productos farmacológicos inyectables. Esto demostró que los recuentos de partículas subvisibles para los materiales del Proceso A y el Proceso B fueron comparables y que los materiales de Proceso B fueron consistentes.

25

Título Genómico

30

El título genómico por ddPCR se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Se esperaba que el título genómico para los lotes de AVXS-101 fluctuara en función de las concentraciones objetivo en la fabricación. El título genómico producido por el Proceso B ($3,7 \times 10^{13}$ vg/ml y $4,0 \times 10^{13}$ vg/ml) fue por lo menos 3 veces mayor que el del Proceso A ($1,1 \times 10^{13}$ vg/ml), por lo tanto, el Proceso B fue un mejor método para fabricación a gran escala de AVXS-101.

Título Infeccioso

El título infeccioso por TCID₅₀ se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). El Proceso B ($1,3 \times 10^{10}$ IU/mL y $6,7 \times 10^9$ IU/ml) produjo en promedio un 66% más de título infeccioso que el Proceso A ($5,9 \times 10^{10}$ IU/mL), que puede ser ventajoso, por ejemplo, para la fabricación a gran escala de rAAV, por ejemplo, AVXS-101.

5

Proteína Total

La Proteína Total por micro BCA se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Normalizados a $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, los resultados de ambos procesos oscilaron entre 167-179 µg/mL. Los valores de proteína total normalizados demostraron que los materiales del Proceso A y el Proceso B eran comparables y que los materiales del Proceso B eran consistentes.

10

Potencia Relativa *In vivo*

El lote NCHAAV9SMN0613 se usó como material de referencia para el ensayo. En base a la curva estándar de referencia, cada resultado de potencia obtenido para el Lote 600156 y el Lote 600307 fue del 97% y 96% respectivamente. Estos resultados demostraron que los materiales del Proceso A y Proceso B eran comparables y que los materiales de Proceso B eran consistentes.

15

Identidad por Transferencia Western

La identidad por Transferencia Western se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Se evaluó que el perfil de transferencia y los valores de peso molecular aparente para las bandas principales (VP1, VP2 y VP3) eran comparables para los materiales del Proceso A y Proceso B y también se evaluó que los materiales del Proceso B eran consistentes.

20

% de Cápsides Vacías por AUC

El % de Cápsides Vacías por AUC se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). El resultado para el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A) fue 7%. Los resultados para los Lotes 600156 y 600307 (Proceso B) fueron 2% y 4% respectivamente. El Proceso B (2% y 4%) produjo aproximadamente dos veces menos de cápsides vacías medido de acuerdo con AUC que el Proceso A (7%). En consecuencia, el Proceso B fue capaz de producir una composición mejorada que comprende una menor concentración de cápsides vacías.

30

Identidad y Pureza por SDS-PAGE

La Identidad y Pureza por SDS-PAGE se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). El % de Pureza Total de ambos procesos fueron $\geq 98\%$ y los patrones de bandas así como el peso molecular aparente para cada una de las tres proteínas de la cápside fueron altamente consistentes. Estos resultados demostraron que los materiales del Proceso A y el Proceso B eran comparables y que los materiales del Proceso B eran consistentes.

Proteína Residual de la Célula Huésped

La Proteína Residual de la Célula Huésped por ELISA se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Los resultados para todos los lotes probados fueron $<LOQ$ (8 ng/mL) para el ensayo. Estos resultados demostraron que los materiales del Proceso A y el Proceso B eran comparables y que los materiales del Proceso B eran consistentes.

Albúmina de Suero Bovino Residual (BSA)

BSA Residual se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Los resultados para todos los lotes probados fueron $<LOQ$ (0,50 ng/mL) para el ensayo. Estos resultados demuestran que los materiales del Proceso A y Proceso B son comparables y que los materiales del Proceso B son consistentes.

Benzonase Residual

Benzonase Residual por ELISA se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Los resultados para todos los lotes probados fueron $<LOQ$ (0,20 ng/mL) para el ensayo. Estos resultados demuestran que los materiales del Proceso A y Proceso B son comparables y que los materiales del Proceso B son consistentes.

ADN Residual de Célula Huésped

El ADN Residual de la Célula Huésped por qPCR se ejecutó sobre el Lote NCHAAV9SMN0613 (Proceso A), el Lote 600156 (Proceso B) y el Lote 600307 (Proceso B). Normalizado a $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, el resultado para el Proceso A fue $3,7 \times 10^5$ pg/mL mientras que los resultados para el Proceso B fueron $0,76 \times 10^5$ pg/mL y $0,68 \times 10^5$ pg/mL, respectivamente. Por lo tanto, el Proceso B produjo vectores virales con significativamente menos ADNhc residual, lo que puede ser ventajoso, por ejemplo, para la fabricación a gran escala de rAAV, por ejemplo, AVXS-101.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó sobre los atributos de calidad cuantitativa. Las comparaciones se realizaron por pares entre el lote del Proceso A (NCHAAV9SMN0613) y cada lote del Proceso B (600156 y 600307) como se detalla a continuación. Estos resultados se ilustran en las Figuras 18 y 19.

Estos estudios demuestran que el Proceso B es un método superior para producir vectores virales. El Proceso B produjo consistentemente una mayor cantidad de vectores virales (medida de acuerdo con título genómico y título infeccioso) con pocas impurezas (menos ADNhc residual) con menos cápsides vacías.

Secuenciación de próxima generación

También se ejecutó una secuenciación de próxima generación (NGS) para establecer la identidad (determinar y/o confirmar la secuencia genómica) y evaluar si existieron variantes de secuencia (subpoblaciones) para el material de Fase 3 del producto farmacológico AVXS-101 del Proceso B. La alineación del conjunto de datos de secuencia con la secuencia de referencia proporcionada por el Patrocinador (pscSMN) reveló una amplitud completa (100%) y una profundidad de cobertura suficiente en toda la longitud del genoma para permitir la detección de variantes. Se observaron un total de cuatro posiciones de variantes menores, sin embargo, estas parecen representar errores de secuencia dentro de regiones difíciles de secuenciar (por ejemplo, las repeticiones terminales invertidas (ITR) de los AAV que son notoriamente difíciles de secuenciar debido a su alto contenido de GC y secuencias palindrómicas), en lugar de variantes verdaderas. Refiérase a la Tabla 17 para ver los resultados de la secuenciación.

Tabla 17: Resultados de la Secuenciación de ADN de AVXS-101 Fase 3 Lote 600156 del Proceso B

# total de lecturas utilizadas para el mapeo	Secuencia de referencia	Longitud de referencia (Bases)	# Total de lecturas mapeadas	% de Población mapeada	Profundidad promedio de cobertura	Longitud de consenso generada por mapeo	% de cobertura de referencia	% de similitud con la referencia	Número total de posiciones no mapeadas o de baja calidad
44,705,268	AVXS-101	5,991	48,854,239	98,1	1,606,995,7	5,991	100	100	0

Perfil de Estabilidad del Lote NCHAAV9SMN0613 Fase 1

El lote NCHAAV9SMN0613 fue almacenado durante 12 meses a $\leq -60^{\circ}\text{C}$. En cada punto de tiempo, se analizó el lote. No se observan tendencias desfavorables. La Figura 20 ilustra los resultados de estabilidad hasta la fecha.

5 Se completó un estudio de comparabilidad para AVXS-101 utilizado en los estudios clínicos de Fase 1. La evaluación se realizó con el producto farmacológico de Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613 fabricado en Nationwide Children y el producto farmacológico AVXS-101 Lote 600156 fabricado en AveXis. Además, la consistencia de fabricación se evaluó utilizando los lotes del Proceso B 600156 y 600307. Tanto para la evaluación de comparabilidad (Proceso A vs Proceso B) como para la
10 consistencia de fabricación (Lotes del Proceso B 600156 vs 600307), el estudio evaluó la identidad, calidad, pureza y potencia del material del ensayo clínico AVXS-101 utilizando el proceso y los métodos analíticos recientemente mejorados para permitir una evaluación sólida de comparabilidad y consistencia de fabricación.

15 El análisis estadístico se realizó sobre los atributos de calidad cuantitativa. Las comparaciones se realizaron por parejas entre el Proceso A Lote NCHAAV9SMN0613 y el Proceso B Lote 600156. El Proceso B fue un mejor método que produjo mayores cantidades de vectores virales con una pureza más alta que el Proceso A. Por ejemplo, en comparación con el Proceso A, los vectores virales producidos por el Proceso B tenían un título infeccioso 48% más alto, nivel genómico 8% más alto,
20 92% menos de partículas subvisibles de más de 10 μm de tamaño, 50% menos de partículas subvisibles de más de 25 μm de tamaño, 100% menos de cápsides vacías y 11% menos de residuos ADNhc. Todos los resultados fueron consistentes en relación con el Límite de Prueba para cada atributo de calidad.

25 Además, para establecer la consistencia de fabricación usando el Proceso B, se realizó una comparación por pares usando los lotes 600156 y 600307. El resultado de esta comparación inicial por pares entre el Proceso B Lote 600156 y 600307 exhibe consistencia en la fabricación. Todos los resultados también fueron consistentes en relación con el Límite de Prueba para cada atributo de calidad.

30

En base a la evaluación de resultados, los atributos de calidad resultantes del producto farmacológico clínico Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613 usando el Proceso A y el producto farmacológico AVXS-101 Lote 600156 usando el Proceso B demostraron que el Proceso B produce mayores cantidades de vectores virales y una pureza mejorada, lo cual puede ser ventajoso, por ejemplo, para la fabricación

a gran escala de rAAV. Además, se descubrió que los dos lotes de material generados a partir del Proceso B (Lotes 600156 y 600307) eran reproducibles además de exhibir consistencia de fabricación.

Ejemplo 10: Análisis de Ultracentrifugación Analítica (AUC)

- 5 El material de la Fase 1 (Proceso A, Lote NCHAAV9SMN0613) y la Fase 3 (Proceso B, Lotes 600156 y 600307) fueron analizados utilizando el método AUC. Los perfiles de AUC (analizados por duplicado) para NCHAAV9SMN0613, 600156 y 600307 se ilustran en la Figura 21, Figura 22 y Figura 23, respectivamente.
- 10 El análisis AUC de cada material exhibe coeficientes de sedimentación similares para las cápsides vacías y llenas con el Material de Fase 1 (Proceso A, Lote NCHAAV9SMN0613) que indican un contenido elevado de cápsides vacías (7%) en comparación con el material de Fase 3 (Proceso B, lotes 600156 y 600307) con contenido de cápsides vacías de 2% y 4% respectivamente. Esto se debe a la capacidad de la etapa de fabricación de ultracentrifugación en gradiente de CsCl en el Proceso B
- 15 para separar de manera más eficaz las cápsides vacías de las cápsides llenas en comparación con el paso de fabricación de ultracentrifugación en gradiente de iodixanol empleado por el Proceso A.

Los lotes de producción de AVXS-101 que utilizan la presentación clínica y comercial exhiben consistentemente tres bandas visibles de cápsides cuando se someten al proceso de purificación en gradiente de CsCl utilizando ultracentrifugación, tanto en el material de ensayo clínico de Fase-1

20 producido en el Nationwide Children's Hospital (NCHAAV9SMN0613) como en cada lote de producción posterior en AveXis. En base a los perfiles de AUC para el producto farmacológico clínico Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613 usando el Proceso A y el producto farmacéutico AVXS-101 Lote 600156 usando el Proceso B, estos materiales se consideran comparables. Además, los

25 perfiles de AUC para dos lotes de material generados a partir del Proceso B (Lotes 600156 y 600307) se evaluaron como consistentes.

Ejemplo 11 – Proceso Aguas Arriba

- 30 Un proceso aguas arriba se utilizó para producir derivado intermedio de un banco de células de trabajo, en donde el proceso aguas arriba comprende los pasos de (a) cultivar las células, (b) transfectar las células cultivadas con tres plásmidos según lo ilustrado en la Figura 1, (c) cosechar las partículas virales expandidas de las células luego de un período de cultivo, (d) purificar las partículas virales mediante filtración para eliminar las células intactas o los restos celulares, (e) someter el

eluyente del paso (d) a filtración de flujo tangencial, y (f) congelar la preparación intermedia resultante de partículas virales purificadas.

Antes de la transfección, las células fueron expandidas en medios de cultivo adecuados, en matraces o en un biorreactor adecuado, o en ambos. Un medio de cultivo es DMEM con 10% de FBS, 4,5 g/L de glucosa, 4 mM de L-glutamina. En una forma de realización, las células adherentes se cultivan en matraces inicialmente y luego se transfieren a un biorreactor iCELLis para la expansión adicional de las células adherentes en el interior del biorreactor.

Luego de la expansión celular, las células adherentes HEK293 se transfectaron con una coprecipitación triple de ADN de plásmido y PEI. Los 3 plásmidos utilizados para esta transfección son; pSMN, pAAV2/9 y pHELP. El medio de crecimiento DMEM utilizado para la expansión celular se reemplaza con medios de transfección DMEM modificados. Los medios de transfección DMEM no contenían FBS, ni calcio, ni L glutamina y 4,5 g/L de glucosa. El vector scAAV9.CB.SMN se produjo usando triple transfección de ADN de plásmido en células adherentes HEK293 usando una coprecipitación de PEI en un biorreactor de células adherentes a gran escala. El vector plásmido de pSMN contiene el ADNc para la SMN humana. Los 3 plásmidos utilizados para esta transfección son; pSMN (222 mg), pAAV2/9 (333 mg) y pHELP (444 mg). Se permitió que el medio de transfección se equilibrara en el biorreactor hasta que la temperatura del biorreactor fuese $> 30^{\circ}\text{C}$ antes de la adición de la coprecipitación de PEI-plásmido. El proceso de coprecipitación de PEI-Plásmido implicó la adición de los plásmidos a los medios de transfección y la filtración de $0,2\ \mu$ en una bolsa de reacción. El PEI se agregó al medio de transfección y luego a la bolsa de reacción. La reacción de PEI-Plásmido se mezcló manualmente para formar una suspensión homogénea y la reacción se produce durante un período de 15-30 minutos. Al final del tiempo de reacción, se agregó la coprecipitación de PEI-plásmido al biorreactor. La coprecipitación de PEI-Plásmido se dejó mezclar en el biorreactor durante 1-2 horas antes de reiniciar la recirculación. Los medios de crecimiento DMEM se recircularon en el biorreactor durante 18-24 horas antes del próximo cambio de medios.

El genoma del rAAV de SMN (nucleótidos 980-3336 de la SEQ ID NO: 1) tiene en secuencia una ITR de AAV2, el promotor de la β -actina de pollo con un potenciador de citomegalovirus, un intrón SV40, el ADN de codificación de SMN de acuerdo con (Número de Acceso a GenBank NM_000344.2), una secuencia de señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino y otra ITR de AAV2. También se contemplan sustituciones conservadoras de nucleótidos del ADN de

SMN (por ejemplo, un cambio de guanina a adenina en la posición 625 del Número de Acceso a GenBank NM_000344.2). El genoma carece de ADN de AAV rep y cap, es decir, no hay ADN de AAV rep o cap entre las ITR del genoma. El polipéptido SMN contemplado incluye, pero no se limita a, el polipéptido SMN1 humano establecido en el número de base de datos de proteínas NCBI NP_000335.1. El vector rAAV9 SMN está descrito en Foust et al., Nature Biotechnology 28(3): 271-274 (2010), en donde la secuencia del inserto del genoma del vector se ilustra como los nucleótidos 980-3336 de la SEQ ID NO: 1).

Al día de biorreactor 6, 18 – 24 horas después de la transfección, el biorreactor fue drenado y la bolsa de medios de recirculación DMEM se reemplazó con 200 litros de medio de post transfección OptiMEM nuevo. El biorreactor se volvió a llenar con 64 litros y se reinició la recirculación en el mismo. Al día 7, 18 - 24 horas después del cambio de medios el día 6, el medio de post transfección OptiMEM en la bolsa de recirculación (~135 litros) se reemplazó con una bolsa nueva de medio OptiMEM. El biorreactor no fue drenado durante este paso. La recirculación de los medios continuó hasta la cosecha el día 9.

Luego de 9 días en el biorreactor, las muestras finales previas a la cosecha se tomaron del reactor y se inició el proceso de lisis celular. Se agregó Benzonase al biorreactor a una concentración final de 100 U/ml. Después de que se dejara mezclar la Benzonase en el reactor, se incorporaron 7,1 litros de solución de lisis al reactor. La solución de lisis se mezcló en el reactor durante 2 horas antes del primer paso de cosecha. Al final de la lisis de 2 horas, los contenidos del biorreactor se transfirieron a la bolsa de cosecha. Se agregaron 8,9 litros de solución de sacarosa salina (SSS) a la bolsa de cosecha y se mezclaron durante 15 minutos. La solución SSS apagó la Benzonase en los medios de cosecha. Luego se enjuagó el biorreactor con el tampón de enjuague de biorreactor. Para el enjuague del biorreactor, se agregaron 64 litros de tampón de enjuague de biorreactor al biorreactor y se mezcló durante 15 minutos. Luego el enjuague se transfirió a la bolsa de recolección de cosecha común. Una vez que se ha agregado el enjuague a la bolsa de recolección, los contenidos se mezclan durante 15 minutos y se toman muestras de cosecha a granel.

La cosecha a granel mezclada se filtró a través del filtro de profundidad en una bolsa de recolección. Una vez filtrada toda la cosecha a granel, el filtro de profundidad se arrastró con 50 litros de tampón de diafiltración FFT1. El conjunto de filtro de profundidad fue mezclado y muestreado. Luego se filtró el conjunto de filtro de profundidad a través de un filtro de 0,45 µm para aclarar adicionalmente el material de cosecha a granel. El filtro de 0,45 µm se arrastró con 6 litros de tampón FFT1.

Para la etapa FFT1, se lavaron 5,0 m² de casetes de membrana de celulosa regenerada con peso molecular de corte de 300 kDa, se desinfectaron con solución de NaOH y se equilibraron con tampón de FFT1. La fase de concentración de esta operación fue diseñada para reducir el volumen de la cosecha clarificada aproximadamente 10 veces. Una vez que se alcanzó el volumen de retenido
5 objetivo, se inició la operación de diafiltración. El retenido se diafiltró con 6 diavolúmenes de tampón de FFT1. Una vez que se lograron 6 diavolúmenes de flujo total de permeado, el retenido se concentró nuevamente y se cosechó en una bolsa de recolección. Se ejecutaron dos enjuagues sucesivos de la membrana para maximizar la recuperación del producto del sistema FFT con el fin de producir una
10 sustancia farmacológica intermedia. El intermedio de FFT1 se dividió en alícuotas en botellas PETG estériles de 1 o 2 litros en una campana LFH y luego se congeló en hielo seco o en un congelador y se almacenó a -60°C.

Tabla 18: Tampones usados en el Proceso Aguas Arriba

Nombre	Formulación	Etapas del proceso en la/s que se usa
Medio de Crecimiento de Expansión Celular	DMEM con 10% FBS, 4,5 g/l glucosa, 4 mM L-glutamina	Expansión celular, pre-transfección en Biorreactor iCELLis
Medio de Transfección	DMEM sin FBS, sin calcio, sin L-glutamina y 4,5 g/l glucosa	transfección en Biorreactor iCELLis
Medio de Post Transfección	OptiMEM con 2,3 g/l glucosa, 4 mM L-glutamina, y sin FBS	Post transfección en Biorreactor iCELLis
Tampón de Lisis	500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM MgCl ₂ , pH 8,0	Lisis celular en Biorreactor iCELLis
Solución de Sal de Sacarosa (SSS)	3700 mM NaCl, 10% Sacarosa	Clarificación
Tampón de Enjuague de Biorreactor	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Tween 20, 1% Sacarosa	Cosecha en biorreactor iCELLis
Tampón FFT1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Sacarosa	Clarificación, FFT1
Tampón de Sanitización FFT1	0,5 M NaOH	Sanitización de membrana FFT1

Ejemplo 12 – Proceso Aguas Abajo

- 5 Un proceso aguas abajo se utilizó para procesar el intermedio en una sustancia farmacológica filtrada. Las etapas del proceso aguas abajo incluyeron un paso de acidificación y clarificación (usando filtración), seguido por cromatografía de intercambio catiónico, filtración de flujo tangencial (“FFT2”), ultracentrifugación en CsCl y un paso de filtración de flujo tangencial adicional (“FFT3”) para producir una sustancia farmacológica filtrada donde las partículas de AAV purificadas se
- 10 suspenden en un portador farmacéuticamente aceptable. Específicamente, el proceso aguas abajo presentó los siguientes pasos de fabricación posteriores a la producción del intermedio de FFT1: descongelar y formar un pool del intermedio de FFT1, acidificación y clarificación, cromatografía de intercambio catiónico (CEX), filtración de flujo tangencial (FFT2), ultracentrifugación en CsCl para la Separación de Cápsidas Llenas/Vacías, filtración de flujo tangencial (FFT3) para
- 15 Concentración/Intercambio de Tampones, filtración del material del pool de FFT 3 para generar sustancia farmacológica, dilución y filtración de la sustancia farmacológica para producir un producto farmacológico, almacenamiento del producto farmacológico y envasado del producto farmacológico en viales.

El material intermedio de FFT1 fue descongelado y suavemente mezclado. Tween 20 se usó para promover la floculación de la mayor parte de las proteínas de la célula huésped y el ADN a pH ácido. El pH del pool de intermedio de FFT1 conteniendo Tween 20 al 15% se redujo para cromatografía CEX (pH 3,5). El precipitado formado después de bajar el pH, luego se eliminó filtrando la solución a través de filtros de profundidad y 0,45 µm.

Se agregó lentamente Tween 20 (solución de Tween 20 al 36% en 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 1% Sacarosa m/v, pH 8,1) a una solución del Intermedio de FFT1 durante 4 horas para lograr una concentración final de 20% Tween 20. Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente (RT) el pH del intermedio de FFT1 que contiene Tween 20 fue reducido agregando aproximadamente 4 g de 1M glicina pH 2,5 por kg de pool enriquecido de intermedio de FFT1/Tween con el fin de lograr un pH objetivo de 3,5 ±0,1. Una vez que el pH estuvo dentro del rango aceptable, se pasó la solución a través del filtro de profundidad Clarisolve POD en línea con un filtro Opticap XL10 Durapore de 0,45 µm o un filtro PES de 0,8/0,45 µ a lo que siguió un lavado de los filtros dos veces el volumen de retención del filtro POD más un volumen de retención del filtro de pulido con Tampón de CEX A.

El paso de cromatografía de captura de intercambio catiónico (CEX) se usó para separar las cápsides virales de la proteína, el ADN y otras impurezas del proceso. Este paso utilizó una columna de cromatografía CIMmultus S03-8000 Advanced Composite Column (Sulfonilo) (Poros 2µm) (8,0 L) operada usando un sistema de cromatografía de proceso automatizado. Los tampones y las soluciones se describen en la siguiente tabla:

Tabla 19: Tampones y soluciones para un ciclo de CEX

Nombre de la solución	Composición	Objeto	Volumen (L) para un Ciclo de CEX de 8L
WFI	WFI	Enjuagues de la columna	200 L
Tampón A de CEX	50 mM glicina, 500 mM NaCl, 1,0 % sacarosa, 0,20 % poloxámero 188, pH 3,5 ± 0,1 a 20°C	Equilibrio, lavado, elución	256 L

Tampón B de CEX	50 mM glicina, 2,0 M NaCl, 1,0 % sacarosa, 0,20 % poloxámero 188, pH 3,5 ± 0,1 a 20°C	Equilibrio y elución de la columna	40 L
Solución de limpieza monolítica	1 M NaOH, 2 M NaCl	Sanitización de la Columna, CIP	96 L
1 M acetato de amonio	1 M acetato de amonio	Recuperación del pH de la columna	40 L
Tampón de neutralización del pH a 9,0	1,0 M Tris pH 9,1 ± 0,1 a 20°C	Ajuste del pH del producto de CEX	0,5 L
Solución de almacenamiento	Etanol al 20% en WFI	Almacenamiento de la columna	40 L

La carga de la columna CEX fue determinada por el contenido de proteína del intermedio de FFT1 clarificado, acidificado. La carga de proteína para la columna CEX se estableció en el 70% de la capacidad máxima de la columna.

El pico de elución se recogió manualmente comenzando con un fuerte aumento en OD280. El OD280 aumentó cuando la conductividad oscilaba entre 80-85 mS/cm. El volumen aproximado de eluato CEX (producto) fue de ~ 20 litros o 2,5 CV (volúmenes de columna). El eluato CEX se recogió en dos fracciones. La primera fracción comenzó con un fuerte aumento en OD280 y se recogió para 1,5 CV. La segunda fracción comenzó inmediatamente después de la primera fracción y se recogió para 1,0 CV. Las dos fracciones se neutralizaron a pH 8,0 ± 0,30 utilizando tampón de neutralización de pH 9,0.

El paso FFT2 se concentró, se eliminaron las impurezas de la proteína e intercambió el tampón por un tampón apropiado para el paso de ultracentrifugación en Cloruro de Cesio. Se utilizó un sistema de filtración de flujo tangencial en conjunto con membranas de celulosa regenerada de 0,4 m² (dos ciclos de CEX) o 0,2 m² (un ciclo CEX) con PMCO 300k.

La fase de concentración de esta operación redujo el volumen de eluatos de la CEX. Una vez que se alcanzó el volumen de retención objetivo, se inició la diafiltración en modo FFT discontinuo (modo en lotes). El producto retenido se diluyó 2X y se diafiltró con 8 diavolúmenes de tampón de diafiltración NaCl de FFT2 y después con 8 diavolúmenes de tampón de diafiltración CsCl de FFT2 en modo FFT discontinuo. Una vez que se completó la diafiltración con CsCl, el producto retenido

se concentró a un volumen prescrito de acuerdo con el volumen de retención del sistema. Se ejecutaron dos enjuagues sucesivos de la membrana para maximizar la recuperación del producto del sistema FFT2.

- 5 La velocidad de alimentación del retenido se estableció en 5 L/m²/min (500 mL/min por casete de 0,1 m²) con una tasa de conversión del 20% en permeado (una tasa de flujo de permeado de 100 ml por 500 ml de tasa de alimentación de retenido). El caudal de permeado se controló mediante una abrazadera en el tubo de permeado para mantener un caudal de permeado del 20% del caudal de alimentación de retenido.

10 **Tabla 20: Tampones para FFT2**

Nombre de la Solución	Composición
Tampón de diafiltración de NaCl de FFT2	20mM Tris, 2mM MgCl ₂ , 150mM NaCl, 0,2% Poloxámero 188, 1% Sacarosa , pH 8,1 ± 0,1 a 20°C
Tampón de diafiltración de CsCl de FFT2	20mM Tris, 2mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxámero 188, pH 8,1± 0,1 a 20°C

- La ultracentrifugación puede usarse para separar las cápsides vacías de las cápsides llenas utilizando ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Para la etapa de ultracentrifugación en CsCl se utilizó un sistema automatizado Ultra Centrifuge Optima XPN 100 Ultra o un sistema equivalente equipado con rotor Tipo 50,2 Ti o rotor equivalente. El material filtrado purificado de FFT2 se agregó lentamente a tubos de ultracentrífuga a lo largo del interior de la pared del tubo sin introducir burbujas en la solución. Los tubos llenos se sellaron con un sellador térmico manual y se centrifugaron a 302,000 g (50,000 rpm en rotor 50,2 Ti) durante 17 horas a 20 °C. Después de completar el paso de centrifugación, se retiraron los tubos de la Ultra Centrífuga y se colocaron en un gabinete de bioseguridad. Los productos que contienen tubos se montaron en soportes de anillo sobre un contenedor de residuos. Se colocó una lámpara debajo del tubo y la banda de las cápsides vacías (la Banda A es la banda más alta), las bandas dobles de las cápsides llenas (bandas B y C bandas superior e inferior del doblete), y la banda más baja debajo del doblete se marcaron en los tubos Las bandas B, C y D se eliminaron con una aguja 18G montada a una jeringa de 30 ml insertada justo debajo de la banda D hacia la mitad del tubo. El material recolectado se transfirió a una botella PETG estéril de 1 L. El material de todos los tubos de la centrífuga se agrupó en una botella de PETG estéril de 1 litro para producir el pool para ultracentrifugación (UC). El Tampón para el paso de ultracentrifugación en Cloruro de Cesio se indica en la tabla a continuación:

Tabla 21: Tampón para Ultracentrifugación en CsCl

Nombre de la Solución	Composición
Tampón de Diafiltración en CsCl FFT2	20mM Tris, 2mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxámero 188, pH 8,1 ± 0,10

El paso FFT3 eliminó el CsCl y concentró el vector completo usando el tampón de formulación final.

- 5 Se utilizó un sistema de filtración de flujo tangencial en conjunto con dos membranas de celulosa regenerada de 50 cm² y con PMCO 300k. La fase de concentración de la operación FFT3 se diseñó para reducir la concentración de CsCl residual y el volumen del Pool de UC. Una vez que se alcanzó el volumen de retenido objetivo, se inició la diafiltración. El producto retenido se diafiltró con 10 diavolumenes de Tampón para FFT3. Una vez que se completó la diafiltración, el retenido
- 10 concentrado se transfirió a un tubo cónico secundario a través de un filtro Pall Supor® EKV Grado de Esterilización (Mini Kleenpak) de 0,2 µm.

Se ejecutó un enjuague sucesivo de la membrana para recuperar el vector del sistema FFT3. Se agregó Tampón para FFT3 al tubo cónico primario que previamente contenía el retenido de FFT3. Este

15 material fue recirculado a través de las membranas de celulosa. Después de la recirculación, el lavado se transfirió al tubo cónico secundario a través del filtro de grado de esterilización Pall Supor® EKV de 0,2 µm (Mini Kleenpak). El concentrado de FFT3 y el pool parcial se mezclaron para lograr una concentración final de vector de $\geq 4,5 \times 10^{13}$ vg/mL de Sustancia Farmacológica (Pool de retenido de FFT3 + dos enjuagues).

20

Se ejecutó un enjuague sucesivo de la membrana para maximizar la recuperación del producto del sistema FFT3. Se agregó Tampón para FFT3 al tubo cónico primario que previamente contenía el material retenido de FFT3 y el material de enjuague inicial. Este material fue recirculado a través de las membranas de celulosa. La descarga secundaria se transfiere a un tubo cónico secundario a través

25 del filtro Pall Supor® EKV Grado Esterilización (Mini Kleenpak) de 0,2 µm hasta que se alcanza el peso determinado en el tubo cónico secundario. La solución concentrada final se denomina Sustancia Farmacológica (SF).

Tabla 22: Tampones para FFT3

Nombre de la Solución	Composición
Tampón para FFT3	20mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxámero 188, pH 8,0 ± 0,1 a 20°C

La sustancia farmacológica se filtró con un filtro Pall Supor® EKV grado de esterilización (Mini Kleenpak) en una botella de vidrio estéril de 1 L utilizando un conjunto de un solo uso esterilizado. Antes de la filtración del pool de FFT3, el filtro se enjuagó pasando Tampón para FFT3 a través del mismo utilizando una bomba peristáltica y descartando en una bolsa de descarga de residuos. La Sustancia Farmacológica (SF) luego se filtró a través del filtro lavado usando una bomba peristáltica y se recogió en la botella de vidrio estéril de 1 litro. En base a la concentración objetivo de DS a 5×10^{13} vg/mL, se agregó Tampón para FFT3 al tubo cónico secundario que contenía la sustancia farmacológica y pasó a través del filtro para preparar el producto farmacéutico diluido (“PF”) a una concentración objetivo de $3,5 \times 10^{13}$ vg/mL.

10

El Tampón para FFT3 utilizado en el enjuague del filtro y la dilución de la sustancia farmacológica para preparar el producto farmacéutico se compone de la siguiente formulación.

Tabla 23: Operación de la Unidad de Productos Farmacológicos - Composición del Tampón

Nombre de la Solución	Composición
Tampón para FFT3	20mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxámero 188, pH 8,0 ± 0,1

15 El producto farmacológico se introdujo en viales de 5 ml estériles, listos para usar, Crystal Zenith (CZ), que se taparon con tapones estériles, listos para usar, y se sellaron con sellos estériles listos para usar.

Ejemplo 13 – Ensayo de Potencia

20

La potencia relativa del producto farmacológico se midió usando un ensayo cuantitativo in vivo. El ensayo utilizó un modelo de ratón establecido de la enfermedad de AME. Las parejas reproductoras del ratón de la cepa AMEΔ7 (Jackson Laboratories, # 005025) son fenotípicamente normales, pero ~ 25% de sus descendientes son homocigóticos para la mutación del gen de SMN objetivo y muestran el fenotipo similar a AME. Al día 5, muestran signos de debilidad muscular y en la semana siguiente desarrollan una marcha anormal y tendencia a caerse. Jackson Laboratories informa que la supervivencia media para animales con el fenotipo similar a AME es de $\sim 15 \pm 2$ días. Los estudios piloto demostraron un tiempo medio de supervivencia para animales no tratados con fenotipo similar a AME de 16,3 días (media geométrica; n = 3 estudios; 10 ratones por estudio).

30

El producto farmacológico biológicamente activo administrado por infusión intravenosa (IV) produce un aumento en el tiempo de supervivencia en función de la dosis (vg/kg). La potencia del producto farmacológico se midió en relación con el material de referencia (lote previo de vector). El título del

producto farmacológico y el material de referencia (genomas de vector/ml; vg/ml) se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa de gotas digital (ddPCR). El vector se diluyó en solución salina para lograr cada uno de los tres niveles de dosis especificados que se administrarán a ratones con el fenotipo similar a AME.

5 Los resultados de un ensayo se consideran aceptables si el ensayo pasa la idoneidad. La idoneidad del ensayo consiste en lo siguiente:

1. Límite de aceptación para la muestra de control negativo (15 ± 2 días, Supervivencia Media)
2. Límite de aceptación para la muestra de control positivo (> 40 días, Supervivencia Media)
- 10 3. Límites de aceptación sobre curva de respuesta a la dosis de Supervivencia Media del estándar de referencia

Se utilizó un lote previo de vector (en adelante, Lote Previo) en este estudio para determinar la correlación lineal entre la supervivencia media (días) del ratón AME Δ 7 al recibir el producto farmacológico a cinco niveles de dosis diferentes, incluyendo la Dosis 0 (cero) utilizando solución salina al 0,9% (grupo no tratado). La Tabla 24 ilustra la curva de calibración utilizando el lote de
15 referencia de Lote Previo.

Tabla 24: Curva de calibración utilizando cinco niveles de dosis de AVXS-101

Rendimiento en el Tiempo del Estándar de Referencia NCH0613							
Dosis (vg/kg)	Supervivencia media (días)						
	0 meses			3 meses			6 meses
	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Replicado 1
	n=44	n=32	n=38	n=21	n=21	n=21	n=22
0	15	16	15	15	14	16	16
1.21E+13	24	23	25	21	21	21	22
7.38E+13	31	29	27	29	29	ND	28
1.18E+14	ND* (>103)	ND* (>115)	79	-	-	-	-
2.94E+14	ND* (>131)	-	-	ND* (>47)	ND* (>47)	ND* (>37)	ND* (>41)

* No determinado (ND) – La Supervivencia Media (días) no fue alcanzada al 24/08/2017

Los datos de este estudio demostraron que el rango lineal de la mediana de la curva dosis-respuesta de supervivencia fue de 0-7,4 vg/kg. La potencia relativa del Lote de Producto Farmacéutico 816836 se estableció comparando la curva de regresión lineal del estándar de referencia del Lote Previo con la curva de regresión lineal del lote de producto farmacológico 816826. Esto se logró utilizando la razón de la intersección en y y la pendiente de cada línea de regresión lineal (es decir, Estándar de referencia y Artículo de prueba). El cálculo de la Potencia Relativa porcentual se describe en la
25 ecuación (1) a continuación:

$$\% \text{ PR} = \left[\frac{\text{(Intersección-y/pendiente del Artículo de Prueba)}}{\text{(Intersección-y/pendiente del Estándar de Referencia)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

El Lote NCH0613 utilizado en el ensayo clínico de fase 1 fue utilizado como el lote de Estándar de Referencia y se le asignó una potencia de 100%.

5

Los datos anteriores establecieron los criterios preliminares de aceptación del ensayo utilizando la porción lineal de la curva de respuesta a la dosis de supervivencia media para determinar la potencia relativa de los lotes clínicos del producto farmacológico, de la siguiente manera:

10

- La curva de respuesta a la dosis de supervivencia media (días) se generó usando 5 niveles de dosis (vg/kg)
- Las dosis 0, 1,2E+13 y 7,4E+13 fueron seleccionadas para correr un modelo de respuesta a la dosis lineal.
- Los límites de adecuabilidad para la solución salina (grupo sin tratar) fueron una supervivencia media de 13 a 17 días.

15

- Los límites de adecuabilidad para la muestra de estándar de referencia se establecieron como:
 - o Pendiente $\geq 2,0\text{E}-13$
 - o Intersección-y $\geq 16,00$ (días)
 - o Intersección-y/Relación de Pendiente $\geq 8,5\text{E}+13$
 - o $R^2 \geq 0,7$

20

El modelo de ratón $\Delta 7$ se utilizó para demostrar la eficacia de la terapia de la AME, incluido el producto farmacológico. Con una supervivencia media de 15 días $\pm$ 2 días, los animales de control sin tratar o tratados con solución salina proporcionan un control de referencia confiable a partir del cual la potencia del producto puede medirse como un aumento en la supervivencia media. El trabajo de desarrollo con el producto farmacológico identificó tres (3) dosis (excluyendo la dosis tratada con el vehículo) determinadas por Genomic Titer usando PCR de Gotas Digital (ddPCR) que afectan la supervivencia en el modelo de ratón con una correlación lineal cuando la dosis administrada (vg/kg) se transforma logarítmicamente y se traza contra la Supervivencia Media (en días) del ratón neonatal AME $\Delta 7$ tratado. Véanse los títulos estándar (vg/mL) en la Tabla 26 para los estándares de títulos bajo, medio y alto. Además, la solución de Tampón FFT (vehículo) se utiliza tanto para el punto de la curva de calibración cero (0) como para un control negativo. También se incluyó como control positivo una dosis que demostró una supervivencia ≥ 40 días (más que la dosis que demuestra duplicar la supervivencia media).

25

30

Tabla 25: Dosis Objetivo

Dosis (vg/kg)	Supervivencia Media (días)	Estándares y controles
Solución salina	15±2	Control Negativo (sin tratar)
1,50x10 ¹⁴	≥ 40 días Supervivencia Media	Control Positivo
0 (solución salina)	15±2	Estándar-1
1,2x10 ¹³	22 ± 3	Estándar -2
7,5x10 ¹³	31 ± 3	Estándar -3

5 Preparaciones de solución de dosis (refiérase a la Tabla 26 por el ejemplo del esquema de dilución).

Control Negativo – La solución salina al 0,9% se usa como en Control Negativo

Control Positivo -- El lote de Artículo de Prueba se prepara a 1,5x10¹⁴ vg/kg usando solución salina.

10 Soluciones de Estándar de Referencia – El lote de Estándar de Referencia se prepara en tres concentraciones indicadas en la Tabla 25 usando la solución salina.

Tabla 26: Estándar de Referencia y Esquema de Dilución de Artículo de Prueba (Ejemplo)

Dosis (vg/kg)	Estándar de Referencia /Título de ddPCR del Artículo de Prueba (vg/mL)	Conversión a vg/μL	Estándar de Referencia/Volumen del Artículo de Ensayo a usar (μL)	Solución Salina (μL)	Volumen de Dosis Total (μL)
1,2x10 ¹³	5,0x10 ¹³	5,0x10 ¹⁰	2,6	47,4	50,0

15 Preparación del artículo de prueba: El artículo de prueba se diluyó usando la Solución Salina. Las diluciones se calcularon para generar las dosis de prueba (vg/kg) delineadas en la Tabla 26 por ratón en un volumen final total de 50 μl. Se prepararon diluciones para 10 ratones a la vez con un volumen adicional como Control Positivo dirigido a aumentar la vida mínima de los ratones tratados a ≥40 días de Supervivencia Media (días).

Límites de aceptación en las muestras de control

20 Control Negativo (ratones sin tratar) -- El límite de aceptación del ensayo para el grupo de Control Negativo fue que los ratones AMEΔ7 alcancen la supervivencia media de 15±2 días. Además, todo ratón que fallezca en ≤10 días será excluido del análisis. Si se usan más de 7 ratones en un grupo, un máximo de 2 ratones puede ser excluido por fallecimiento ≤ 10 días.

Control Positivo (grupo tratado a la dosis clínica objetivo) -- El límite de aceptación del ensayo para el grupo de Control Positivo fue que, como mínimo, la vida de los ratones tratados alcanzara ≥ 40 días de Supervivencia Media. Además, todo ratón que fallezca en ≤ 10 días será excluido del análisis. Si se usan más de 7 ratones en un grupo, un máximo de 2 ratones puede ser excluido por fallecimiento ≤ 10 días.

Límites de aceptación en la curva de respuesta a la dosis del Estándar de Referencia

Los criterios de idoneidad del ensayo se determinarán para la curva de respuesta a la dosis lineal estándar de referencia que representa la Supervivencia Media (días) frente a la dosis administrada (vg/ml). Véase la Tabla 27 por los criterios de idoneidad del ensayo.

Tabla 27: Criterios de Idoneidad del Ensayo (Curva del Respuesta a la Dosis Lineal del Estándar de Referencia)

Lote Testeado	Pendiente	Intersección	Relación Intersección/Pendiente	R ²	Potencia Asignada
Estándar de Referencia	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,5$	$\geq 8,5 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	100,0
Artículo de Prueba	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,0$	$\geq 8,0 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	-

Relación Intersección-Y/Pendiente – Se determina una curva de regresión lineal de la Supervivencia Media (días) versus la dosis administrada (vg/kg) para el Estándar de Referencia y el Artículo de Prueba. Se calcula la relación de Intersección-y a la pendiente para cada regresión lineal.

Resultados de los informes

Informe Cualitativo de los Resultados de Potencia Relativa -- Los criterios de Idoneidad del Ensayo se evalúan para cada ensayo antes de la determinación de una lectura de un solo punto de la Supervivencia Media (días) a ≥ 40 días para el material de Control Positivo. Si la Supervivencia Media del grupo de Control Positivo es ≥ 40 días, el Artículo de Prueba puede ser utilizado si se cumplen los siguientes criterios.

Informe Cuantitativo de los Resultados de Potencia Relativa – Los criterios de Idoneidad del Ensayo se evalúan para cada ensayo antes de la determinación cuantitativa de la Potencia Relativa para el Artículo de Prueba. La potencia relativa para el Artículo de Prueba se puede reportar una vez que el control Positivo alcanza ≥ 40 días y se logra la Supervivencia Media de 31 ± 3 días para el grupo de ratones que representa la dosis estándar superior de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg. La Potencia Relativa Porcentual

(% PR) para un Artículo de Prueba se calculará utilizando la intersección en y la pendiente de respuesta a la dosis de la regresión lineal de Supervivencia Media (días) de la siguiente manera:

$$\% \text{ PR} = 100\% * [(\text{Artículo de Prueba intersección en y/pendiente}) \div (\text{Estándar de Referencia intersección en y/pendiente})]$$

Ejemplo 14- Terapia de reemplazo de genes de dosis única para la atrofia muscular espinal: Un Estudio de Dosis

10 La atrofia muscular espinal (AME) es una enfermedad monogénica infantil grave que resulta de la pérdida o disfunción del gen que codifica la neurona motora de la supervivencia 1 (SMN1). La incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 1 de cada 10,000 nacimientos vivos, con una frecuencia de portador de 1 en 54. La AME se caracteriza por la degeneración y pérdida de las neuronas motoras inferiores, lo que conduce a la atrofia muscular. La enfermedad se divide en

15 cuatro subtipos (1 a 4) según la edad de inicio y el logro de los hitos. La AME tipo 1 (AME1) es la forma más grave y la causa genética de muerte más común entre los bebés. Hay dos formas de SMN; SMN1 es el gen primario responsable de la producción funcional de la proteína SMN. SMN2 excluye preferentemente el exón 7 durante el empalme y, como resultado, produce solo una pequeña fracción de proteína SMN funcional en comparación con SMN1. En consecuencia, el

20 número de copias de SMN2 modifica el fenotipo de la enfermedad, y la presencia de dos copias de SMN2 está asociada con AME1. Los lactantes con deleciones bialélicas de SMN1 y dos copias de SMN2 tienen un riesgo del 97% de padecer AME1.

Estudios recientes de la historia natural de AME1 (cohorte histórica) mostraron que la edad media al inicio de los síntomas entre los lactantes con la enfermedad era de 1,2 meses (rango, 0 a 4 meses),

25 y la enfermedad se caracterizó por hipotonía, debilidad severa desde la primera infancia e incapacidad sentarse sin ayuda. En los lactantes con AME1 que tienen dos copias de SMN2, la edad media al fallecimiento o la necesidad de ventilación no invasiva durante por lo menos 16 horas por día durante lo menos 14 días consecutivos (considerado equivalente a ventilación permanente) fue de 10,5 meses. En una cohorte de niños afectados, solo el 25% sobrevivió sin soporte ventilatorio

30 permanente por 13,6 meses, y el 8% sobrevivió sin este soporte por 20 meses. Otro estudio histórico prospectivo y multicéntrico patrocinado por los Institutos Nacionales de Salud (NeuroNEXT) que incluyó pacientes con dos copias de SMN2 mostró una mediana de supervivencia libre de traqueotomía de 8 meses (intervalo de confianza del 95%, 6 a 17). Todos los pacientes con AME1 tienen una disminución precipitada en las funciones respiratorias y de deglución después del

5 nacimiento y, en última instancia, requieren soporte nutricional mecánico (a través de una sonda nasogástrica o gastrostomía) para mantener una nutrición adecuada y reducir los riesgos respiratorios asociados con la aspiración. En el caso de los pacientes con AME1 en los que la aparición de los síntomas ocurre antes de los 3 meses de vida, la mayoría de ellos requieren asistencia alimentaria antes de los 12 meses de vida.

10 Los pacientes con AME1 tampoco alcanzan hitos importantes en la función motora y tienen una disminución en la función, de acuerdo con la escala CHOP INTEND (Prueba para bebés de trastornos neuromusculares del Hospital de Filadelfia), que varía de 0 a 64, donde las puntuaciones más altas que indican mejor función motora, una herramienta que es sensible a cambios menores en la función motora, tales como los movimientos antigravedad de las extremidades. En un análisis histórico de 34 pacientes con AME1, todos menos 1 de los pacientes no alcanzaron una puntuación de por lo menos 40 después de 6 meses de vida. En la cohorte NeuroNEXT, las puntuaciones de CHOP INTEND disminuyeron en una media de 10,7 puntos entre los 6 meses y 12 meses de vida.

15

Las estrategias terapéuticas para aumentar los niveles de proteína SMN en las neuronas motoras se han centrado en mejorar la efectividad de SMN2. Un enfoque ha sido el suministro al sistema nervioso central de nusinersen (Ionis Pharmaceuticals/Biogen), un oligonucleótido antisentido que se desarrolló para inhibir el empalme del exón 7 en SMN2. Se ha demostrado que este medicamento mejora la debilidad en el modelo murino de AME severa y aumenta la vida media de los ratones afectados de 16 días a 25 días. En diciembre de 2016, nusinersen fue aprobado por la Food and Drug Administration para el tratamiento de la AME. Este fármaco se administra mediante inyecciones intratecales repetidas después de cuatro dosis de carga en los primeros 2 meses de vida.

20

25 Un posible tratamiento alternativo para AME1 es la terapia génica, en forma de una administración intravenosa única que suministra una copia de SMN en un virus adenoasociado auto complementario serotipo 9 (scAAV9). (La región de codificación de este virus recombinante forma una plantilla intramolecular de ADN bicatenario [o autocomplementario]). Este enfoque ha inducido la expresión de SMN en neuronas motoras y tejidos periféricos, lo que ha contrarrestado los efectos de la AME en un modelo murino y extendido la supervivencia promedio en este modelo de 15 días a 28,5 días con una dosis baja ($6,7 \times 10^{13}$ vg por kilogramo de peso corporal) y no más de 250 días con dosis más altas del vector ($2,0 \times 10^{14}$ y $3,3 \times 10^{14}$ vg por kilogramo).

30

Además de cruzar la barrera hematoencefálica y dirigirse a las neuronas del sistema nervioso central en todas las regiones de la médula espinal, la administración sistémica de la terapia génica mediada por AAV9 puede ser ventajosa, dado que la proteína SMN se expresa de manera ubicua y AME1 afecta a múltiples sistemas (por ejemplo, el sistema nervioso autónomo y entérico, el sistema cardiovascular y el páncreas), junto con muchos tipos de células (por ejemplo, corazón, páncreas y músculo esquelético). La característica auto complementaria del vector combinado con un potenciador de citomegalovirus híbrido - promotor de beta actina de pollo permite la expresión rápida y sostenida de SMN. En abril de 2014, iniciamos un estudio de terapia de reemplazo de genes en bebés con AME1 que recibieron una dosis única de scAAV9 con el suministro del gen de neurona motora de la supervivencia humana (hSMN), bajo el control del promotor de beta actina de pollo (scAAV9.CB.hSMN) (AVXS-101).

Métodos

Procedimientos del estudio y pacientes: a los fines del estudio, todos los pacientes tenían un diagnóstico genéticamente confirmado de AME1, deleciones homocigóticas del exón 7 de SMN1 y dos copias de SMN2. Se excluyeron los pacientes con el modificador de la enfermedad c.859G → C en el exón 7 de SMN2. Los pacientes seleccionados presentaron aparición de enfermedad desde el nacimiento hasta los 6 meses de vida, caracterizada por hipotonía según lo determinado por la evaluación clínica acompañada de un retraso en las habilidades motoras, control deficiente de la cabeza, postura del hombro redondeado e hipermovilidad de las articulaciones. Los pacientes con infecciones virales activas (incluyendo VIH o serología positiva para hepatitis B o C) o enfermedades concomitantes que creaban riesgos innecesarios para la transferencia de genes fueron excluidos del estudio. También se excluyeron los pacientes que necesitaban soporte ventilatorio invasivo (traqueotomía con presión positiva) u oximetría de pulso <95% de saturación en la visita de selección.

Los pacientes se inscribieron en dos cohortes, de acuerdo con la dosis de terapia génica que se administró. Los pacientes de la cohorte 1 recibieron una dosis baja ($6,7 \times 10^{13}$ vg por kilogramo) y se enrolaron en el transcurso de cinco meses; los de la cohorte 2 recibieron una dosis alta ($2,0 \times 10^{14}$ vg por kilogramo) y se enrolaron en el transcurso de un año. El día 30 después de la dosificación, el ensayo IFN- γ ELISpot en el paciente 1 en la cohorte 1 detectó una respuesta de células T y mostró un pico repentino en las células formadoras de manchas (SFC) por 106 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que fue > 50 dirigido contra la cápside de AAV9

(normal, <50 SFC por 10⁶ PBMC). Se inició prednisolona a 2 mg/kg y se mantuvo durante 35 días hasta que la respuesta de las células T y las transaminasas séricas se redujeron. Como resultado, se modificó el protocolo experimental, y los pacientes 2 a 15 recibieron prednisolona oral en una dosis de 1 mg por kilogramo por día durante aproximadamente 30 días, comenzando 24 horas antes de la administración del vector genético. El tratamiento continuó con prednisolona mantenida hasta que las enzimas AST y ALT cayeron por debajo del nivel de 120 UI/L y la respuesta de las células T cayó por debajo de 100 SFC por 10⁶ PBMC, momento en el cual la prednisolona se reduciría según el criterio clínico.

El vector fue suministrado en solución salina normal (aproximadamente 10 a 20 ml por kilogramo) que se infundió por vía intravenosa durante un período de aproximadamente 60 minutos. Al momento del enrolamiento, algunos pacientes requerían alimentación enteral por medio de una gastrostomía o sonda nasogástrica, cuya elección se basó en la preferencia de los padres o el médico primario. Una vez enrolados en el estudio, a todos los pacientes que requirieron soporte nutricional se les colocó un tubo de gastrostomía, y los tubos no se retiraron durante el estudio.

Resultados: El resultado primario fue la determinación de la seguridad sobre la base de cualquier evento adverso relacionado con el tratamiento de grado 3 o superior. El resultado secundario fue el tiempo hasta la muerte o la necesidad de asistencia ventilatoria permanente. Este último se definió como por lo menos 16 horas de asistencia respiratoria por día continuamente durante lo menos 14 días en ausencia de una enfermedad aguda reversible o un estado perioperatorio. Los resultados exploratorios incluyeron logros de hitos motores (particularmente, sentarse sin asistencia) y puntuaciones de CHOP INTEND.

El mantenimiento de puntuaciones de más de 40 puntos se ha considerado clínicamente significativo en la AME en la aplicación de la escala CHOP INTEND. Sentado y sin asistencia se evaluó y se clasificó de acuerdo con los siguientes criterios: sentado sin asistencia durante menos de 5 segundos, de acuerdo con el ítem 22 de la subprueba de motricidad gruesa Bayley Scales of Infant and Toddler Development ("sentado sin asistencia"); sentado sin asistencia durante lo menos 10 segundos, de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ("sentado sin asistencia según los criterios de la OMS"); y sentado sin asistencia durante por lo menos 30 segundos, de acuerdo con el ítem 26 de las Escalas de Bayley mencionadas anteriormente ("sentado funcionalmente independiente"). Los principales hitos motores se confirmaron mediante el examen de grabaciones de video de los pacientes a través de un auditor independiente por Ability Captured

Through Interactive Video Evaluation-mini (ACTIVE-mini). Se registraron los potenciales de acción muscular compuesta (CMAP) de electrodos de superficie al inicio del estudio y cada 6 meses después de la infusión. El estado patológico de los músculos se cuantificó mediante Miografía de impedancia eléctrica (EIM).

5

Análisis estadístico: Se realizaron análisis de seguridad en todos los pacientes, que también se incluyeron en el análisis primario de supervivencia (según lo definido y en el protocolo) y en los análisis de cambios en la escala CHOP INTEND desde el inicio hasta 1 mes y 3 meses. Tales cambios desde la línea de base hasta cada visita de estudio se analizaron con el uso de un modelo de efectos mixtos para medidas repetidas. El modelo mixto incluyó los efectos fijos de cohorte y visita y una covariable de la puntuación inicial. Los logros importantes y el apoyo nutricional y ventilatorio se analizaron en la cohorte 2. Los análisis estadísticos se realizaron con el uso del software SAS, versión 9.4. Todas las comparaciones con cohortes históricas fueron únicamente descriptivas.

10

15

Resultados

Pacientes: De los 16 pacientes que fueron seleccionados, 1 fue excluido debido a títulos de anticuerpo anti-AAV9 persistentemente elevados ($> 1:50$). De los 15 pacientes incluidos en el estudio, 3 se enrolaron en la cohorte de dosis baja 1 y 12 se inscribieron en la cohorte de dosis alta 2. La edad media de los pacientes al momento del tratamiento fue de 6,3 meses (rango, 5,9 a 7,2) en la cohorte 1 y 3,4 meses (rango, 0,9 a 7,9) en la cohorte 2 (Tabla 28).

20

Tabla 28: Características demográficas y clínicas de los 15 pacientes

Característica	Cohorte 1 (N=3)	Cohorte 2 (N=12)
Edad promedio (rango) – meses	6,3 (5,9-7,2)	3,4 (0,9-7,9)
Peso promedio (rango) - kg	6,6 (6,0-7,1)	5,7 (3,6-8,4)
Sexo - nro. (%)		
Masculino	1 (33)	5 (42)
Femenino	2 (67)	7 (58)
Raza - nro. (%)		
Blanca	3 (100)	5 (42)
Otra	0	1 (8)
Edad media al inicio de los síntomas (rango) - meses	1,7 (1,0-3,0)	1,4 (0-3,0)
Edad media al diagnóstico genético (rango) - días	33 (4-85)	60 (0-136)

Puntuación promedio en la escala CHOP INTEND (rango)	16 (2-27)	28 (12-50)
Pacientes con apoyo clínico - nro. (%)		
Nutricional	3 (100)	5 (42)
Ventilatorio	3 (100)	2 (17)

- Supervivencia y ventilación permanente: Al final del estudio, todos los pacientes habían alcanzado una edad de por lo menos 20 meses y no requerían ventilación mecánica permanente; la mediana de edad en su última evaluación pulmonar fue de 30,8 meses en la cohorte 1 y 25,7 meses en la cohorte 2. Por el contrario, solo el 8% de los pacientes en una cohorte histórica no requirió ventilación mecánica permanente. A los 29 meses de vida, un paciente en la cohorte 1 requirió ventilación permanente debido a hipersalivación. Después de la ligadura de las glándulas salivales, la necesidad de uso de ventilación no invasiva se redujo en un 25% a 15 horas por día.
- 10 Evaluaciones de la función motora: Todos los pacientes de las cohortes 1 y 2 habían aumentado las puntuaciones desde la línea de base en la escala CHOP INTEND y mantuvieron estos cambios durante el estudio. Los pacientes en la cohorte 2 tuvieron aumentos medios de 9,8 puntos a 1 mes y 15,4 puntos a los 3 meses ($P < 0,001$ para ambas comparaciones); 11 pacientes alcanzaron y mantuvieron puntuaciones de más de 40 puntos. Al punto de corte del estudio el 7 de agosto de 15 2017, los pacientes en la cohorte 1 tuvieron un aumento promedio de 7,7 puntos desde una línea base promedio de 16,3 puntos, y aquellos en la cohorte 2 tuvieron un aumento promedio de 24,6 puntos desde una línea base promedio de 28,2 puntos.
- 20 Hitos motores en la cohorte 2: Un total de 11 de 12 pacientes en la cohorte 2 pudieron sentarse sin asistencia durante por lo menos 5 segundos, 10 durante por lo menos 10 segundos y 9 durante por lo menos 30 segundos (Tabla 31). Un total de 11 lograron el control de la cabeza, 9 pudieron darse la vuelta y 2 pudieron gatear, ponerse de pie, pararse independientemente y caminar de manera independiente. Once pacientes lograron la capacidad de hablar. Ningún paciente en las cohortes históricas había logrado ninguno de estos hitos motores y rara vez había logrado la capacidad de 25 hablar.

Tabla 29: Supervivencia libre de eventos e hitos motores y otros entre los 12 pacientes de la cohorte

5 2.

Variable	Edad al ingresar al estudio	Supervivencia libre de eventos	Hitos motores							Otros logros			
			Lleva la mano a la boca	Controla la cabeza	Se da vuelta	Se sienta con asistencia	Se sienta sin asistencia			Habla	Traga	No una NIV	Sin soporte nutricional
	mes						≥ 5 s.	≥ 10 s.	≥ 30 s.				
Número de Paciente													
4	5,6	31,1	+	+	+	+	+			+	+		
5	4,2	28,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1,9	26,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	3,6	28,1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
8	7,9	32,4	+										
9	4,9	28,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0,9	25,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	2,3	23,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
12	2,6	23,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	0,9	22,1	+	+		+	+	+	+	+	+		
14	4,1	22,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	2,1	20,6	+	+		+	+	+	+	+	+		
Pacientes con resultado (%)													
Este estudio		100	100	92	75	92	92	83	75	92	92	58	50
Estudios de historia natural		8 por 20 meses	NA	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	8 por 20 meses

Estado pulmonar y nutricional en la cohorte 2: Entre los 12 pacientes en la cohorte 2, 10 no necesitaron ventilación no invasiva al inicio del estudio en comparación con 7 que eran independientes de la asistencia ventilatoria en la última visita de seguimiento (Tabla 29). Al inicio del estudio, 7 pacientes no necesitaron alimentación enteral, incluido 1 que luego requirió la colocación de una sonda de gastrostomía después de la terapia de reemplazo génico, posiblemente en asociación con cirugía de escoliosis. De los 5 pacientes que habían recibido alimentación enteral antes de la terapia de reemplazo génico, en el último seguimiento, 11 de los 12 pacientes habían logrado o retenido la capacidad de tragar de forma independiente y 4 pudieron alimentarse por vía oral.

Seguridad: Al final del estudio, se observaron un total de 56 eventos adversos graves en 13 pacientes en las dos cohortes. De estos eventos, los investigadores determinaron que 2 eventos fueron eventos de grado 4 relacionados con el tratamiento en base a los valores de laboratorio, de

acuerdo con los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (Tabla 30). El paciente 1 en la cohorte 1 tuvo aumentos en los niveles séricos de aminotransferasa (31 veces el límite superior del rango normal para la alanina aminotransferasa (ALT) y 14 veces el límite superior para la aspartato aminotransferasa (AST)) sin otras anormalidades de la función hepática (es decir, bilirrubina total e indirecta y fosfatasa alcalina) y sin manifestaciones clínicas. Según se ha descrito, estos aumentos fueron atenuados por el tratamiento con prednisolona, que luego se administró en los pacientes restantes. Un paciente en la cohorte 2 requirió prednisolona adicional para atenuar los niveles elevados de ALT y AST en suero (35 veces el límite superior del rango normal para ALT y 37 veces para AST). De los 241 eventos adversos no graves, 3 se consideraron relacionados con el tratamiento y consistieron en aumentos asintomáticos de los niveles séricos de aminotransferasa en 2 pacientes (ALT y AST, ambos menos de 10 veces el límite superior del rango normal), que se resolvieron sin más tratamiento con prednisolona (Tabla 0. No hubo otras anormalidades en las pruebas de función hepática. De los 15 pacientes, 14 tenían enfermedades respiratorias, lo cual en niños con AME1 con frecuencia provocan la muerte o la necesidad de traqueotomía.

Tabla 30: Eventos adversos.

Evento	Cohorte 1 (N=3)		Cohorte 2 (N=12)		Todos los pacientes (N=15)	
	Eventos	Pacientes	Eventos	Pacientes	Eventos	Pacientes
	nro.	nro. (%)	nro.	nro. (%)	nro.	nro. (%)
Todo evento adverso	44	3 (100)	253	12 (100)	297	15 (100)
Todo evento adverso grave	7	3 (100)	49	10 (83)	56	13 (87)
Evento adverso asociado con el tratamiento	1	1 (33)	4	3 (25)	5	4 (27)
Evento adverso común						
Infección del tracto respiratorio superior	3	1 (33)	26	10 (83)	29	11 (73)
Vómitos	0	0	11	8 (67)	11	8 (53)
Constipación	4	4 (33)	9	7 (58)	10	8 (53)
Pirexia	1	1 (33)	10	6 (50)	11	7 (47)
Congestión nasal	0	0	8	6 (50)	8	6 (40)
Reflujo gastroesofágico	1	1 (33)	6	5 (42)	7	6 (40)
Infección por enterovirus	1	1 (33)	7	4 (33)	8	5 (33)

Neumonía	0	0	11	5 (42)	9	5 (33)
Infección por rinovirus	1	1 (33)	10	4 (33)	11	5 (33)
Tos	0	0	9	5 (42)	9	5 (33)
Otitis media	6	2 (67)	3	2 (17)	9	4 (27)
Nivel elevado de aminotransferasa	1	1 (33)	3	3 (25)	4	4 (27)
Insuficiencia respiratoria	1	1 (33)	5	3 (25)	6	4 (27)
Infección por el virus de la parainfluenza	1	1 (33)	4	3 (25)	5	4 (27)
Erupción	0	0	5	4 (33)	5	4 (27)
Atelectasia	0	0	4	4 (33)	4	4 (27)
Gastroenteritis viral	0	0	4	4 (33)	4	4 (27)
Rinorrea	0	0	4	3 (25)	4	3 (20)
Bronquiolitis	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Diarrea	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Infección en el oído	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Lesión por caída	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Rinovirus humano	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Faringitis estreptocócica	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Virus sincitial respiratorio						
Neumonía	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Bronquiolitis	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Infección viral del tracto respiratorio superior	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)

Una sola infusión intravenosa de vector del virus adenoasociado que contiene ADN que codifica SMN en pacientes con AME1 resultó en una supervivencia más larga que en las cohortes históricas con esta enfermedad. Los 15 pacientes superaron la mediana de edad de supervivencia previamente informada sin ventilación permanente por 10,5 meses para pacientes con AME1 con dos copias SMN2. Todos los pacientes también superaron el punto de referencia de 20 meses, en cuyo momento solo el 8% de los pacientes con esta enfermedad generalmente sobreviven sin ventilación permanente. 4 De los 12 pacientes en la cohorte 2, todos menos 1 lograron hitos de la función motora que no han sido reportado en cohortes históricas. La función motora lograda fue

clínicamente significativa, tal como lo evidencia el alimentarse (mano a boca), sentarse y hablar. La mayoría de los pacientes que no requerían atención de apoyo al momento del enrolamiento estaban libres de apoyo nutricional (6 de 7 pacientes) y de ventilación (7 de 10 pacientes) en la última visita de seguimiento. En las dos cohortes, los pacientes tuvieron aumentos en la puntuación en la escala CHOP INTEND desde la línea de base. Durante el primer mes en la cohorte 2, el aumento promedio fue de 9,8 puntos, en comparación con una disminución de una media de más de 10 puntos entre los 6 y 12 meses de vida en la cohorte histórica en el estudio NeuroNEXT.

Los estudios preclínicos de la terapia de reemplazo del gene *SMN* en el modelo de ratón *SMN Δ 7* mostraron mejoras en la supervivencia y la función motora con el tratamiento temprano, presumiblemente en un momento en que las neuronas motoras aún están intactas. Los hallazgos clínicos en nuestro estudio de tratamiento temprano reflejaron la dirección de aquellos en los estudios preclínicos. Dos pacientes pudieron gatear, pararse y caminar sin ayuda después del tratamiento temprano. Ambos pacientes tenían antecedentes familiares de AME, lo que probablemente contribuyó al diagnóstico temprano. Si bien todos los pacientes de las dos cohortes en nuestro estudio han seguido teniendo mejoras en la función motora, los datos preclínicos y clínicos sugieren un beneficio para el tratamiento temprano y la detección de recién nacidos con AME.

Los eventos adversos graves causados por la terapia de reemplazo de genes AAV se limitaron a niveles elevados de aminotransferasa sérica sin otras anomalías de las enzimas hepáticas aproximadamente 3 semanas después del tratamiento en dos pacientes; otros dos pacientes tuvieron aumentos que no alcanzaron el límite para la definición de eventos adversos graves (es decir, > 10 veces el rango normal). Los aumentos de las enzimas hepáticas se atenuaron con el tratamiento con prednisolona. Un paciente no pasó la selección debido a la presencia de anticuerpo anti-AAV9, lo cual es consistente con estudios de población que sugieren una baja tasa de seropositividad anti-AAV9 entre niños y adultos jóvenes y tasas crecientes de seropositividad anti-AAV9 entre personas mayores de 40 años. Sin embargo, la presencia de anticuerpos contra el virus puede ser una limitación de la terapia de reemplazo de genes AAV.

Este estudio utilizó un diseño de un solo grupo con una cohorte histórica como control, que es una de las pocas opciones cuando la historia natural de una enfermedad está bien caracterizada y es letal. Para enrolar una muestra homogénea similar a la de los estudios históricos publicados, restringimos la inscripción para incluir solo pacientes sintomáticos con AME1 que tenían

mutaciones SMN1 bialélicas y dos copias de SMN2 y no se inscribieron pacientes con el modificador genético c.859G → C en el exón 7 de SMN2, ya que este modificador genético predice un fenotipo más leve de la enfermedad. Sin embargo, esta terapia de reemplazo de genes no necesita limitarse a pacientes sintomáticos o pacientes con un subtipo genómico específico.

5

En conclusión, una infusión intravenosa única de una dosis alta de vector viral adenoasociado que contiene ADN que codifica SMN en pacientes con AME1 dio como resultado una supervivencia prolongada, una función motora mejorada y un aumento de las puntuaciones en la escala CHOP INTEND a niveles que no se habían observado anteriormente en esta enfermedad. Dichas mejoras dieron como resultado un porcentaje menor de pacientes que necesitaron atención de apoyo respecto de los estudios históricos. En los seguimientos de hasta 2 años, no se informó la disminución del efecto o la regresión clínica en la función motora. Varios pacientes tuvieron aumentos transitorios y asintomáticos en los niveles de aminotransferasa. Se necesitan más estudios para evaluar la seguridad a largo plazo y la durabilidad de la terapia de reemplazo génico en

10

15

Ejemplo 15 - Farmacocinética de scAAV9.CB.hSMN

Los estudios farmacocinéticos clínicos convencionales no son aplicables a los productos de terapia de reemplazo de genes. Sin embargo, los estudios de eliminación de vectores scAAV9.CB.hSMN, que evalúan la cantidad de vectores eliminados del cuerpo a través de fluidos y desechos, son una medida que se puede usar en lugar de los estudios farmacocinéticos convencionales para las terapias de reemplazo de genes.

20

25

La eliminación del vector después de la infusión con scAAV9.CB.hSMN se investigó en múltiples puntos en el tiempo durante el estudio clínico. Se recogieron muestras de saliva, orina y materia fecal semanalmente hasta el día 30 y luego mensualmente hasta el mes 12 y posteriormente cada 3 meses. Se usaron muestras de 5 pacientes para el análisis de eliminación del vector scAAV9.CB.hSMN por reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas durante la visita del mes 18. Los 5 pacientes analizados en cuanto a la eliminación del vector scAAV9.CB.hSMN recibieron la dosis terapéutica de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg.

30

scAAV9.CB.hSMN fue detectable en las muestras después de la infusión. Las concentraciones de scAAV9.CB.hSMN en orina y saliva fueron de 0,1% a 0,01% de la concentración inicial en el cuerpo

al día 1 después de la infusión, después de lo cual las concentraciones cayeron por debajo del límite de cuantificación. En las heces, niveles del 10% al 30% de la concentración inicial en el cuerpo fueron detectables al día 1 después de la infusión. Un paciente mostró un pico de concentración en las heces el día 14 después de la infusión del 280% de la concentración inicial en el cuerpo. Por otro lado, 3
5 pacientes para los que había datos disponibles mostraron una concentración de <1% de la concentración inicial en el cuerpo al día 14 después de la infusión, con concentraciones que disminuyeron aproximadamente 4 logs (10,000 veces) durante 30 días después de la infusión. En general, scAAV9.CB.hSMN fundamentalmente se eliminó del cuerpo en las heces y al día 60 después de la infusión estaba por debajo del límite de cuantificación en las heces.

10

Ejemplo 16 - Pruebas de toxicología no clínica

Farmacología animal: luego de la infusión del vector scAAV9.CB.hSMN en un modelo de enfermedad de ratón AME delta 7 (ratones SMN $\Delta 7$), aumentó el peso corporal, mejoró la capacidad
15 de enderezarse, la supervivencia se prolongó significativamente de una forma dependiente de la dosis y los déficits cardíacos relacionados con la AME volvieron a la normalidad en comparación con los ratones SMN $\Delta 7$ no tratados.

Toxicología animal: luego de la infusión intravenosa en el ratón, el vector y el transgén se
20 distribuyeron ampliamente observándose en general la mayor expresión en el corazón y el hígado, y una expresión sustancial en el cerebro y la médula espinal. En estudios pivotaes de toxicología en ratones de 3 meses que cumplen con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), los principales órganos objetivo de toxicidad fueron el corazón y el hígado. Los hallazgos relacionados con el vector scAAV9.CB.hSMN en los ventrículos del corazón incluyeron inflamación, edema y fibrosis
25 relacionados con la dosis, y en la aurícula, inflamación y trombosis. Los hallazgos hepáticos incluyeron hipertrofia hepatocelular, activación de células de Kupffer y necrosis hepatocelular dispersa. No se identificó un Nivel Sin Efecto Adverso Observable (NoAEL) en los hallazgos del corazón y el hígado relacionados con el vector scAAV9.CB.hSMN en el ratón, y la dosis máxima tolerada se definió como $1,5 \times 10^{14}$ vg/kg, proporcionando un margen de seguridad de
30 aproximadamente 1,4 veces en relación con la dosis terapéutica recomendada de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg. La traducibilidad de los hallazgos observados en ratones a primates no se conoce al día de hoy.

Ejemplo 17 - Atrofia muscular espinal en pacientes pediátricos

Este ensayo fue un estudio de Fase 1 que evaluó la seguridad y la eficacia del vector scAAV9.CB.hSMN en pacientes con AME Tipo 1 testeados genéticamente para confirmar las delecciones bialélicas SMN1, 2 copias de la neurona motora de la supervivencia 2 (SMN2), resultados negativos para la modificación c.859G >C en el exón 7 y la aparición de síntomas clínicos antes de los 6 meses de vida. El vector scAAV9.CB.hSMN se administró por vía intravenosa durante una infusión de dosis única en pacientes de 0,9 a 7,9 meses de vida. Se dosificaron dos cohortes: la cohorte 1 (n = 3) recibió la dosis baja utilizada en este estudio y la cohorte 2 (n = 12) recibió la dosis alta (dosis terapéutica: $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg) utilizada en este estudio. Los resultados del estudio informados reflejan la Cohorte 2 e incluye el seguimiento de todos los pacientes hasta 24 meses después de la infusión del vector scAAV9.CB.hSMN.

Mortalidad y supervivencia libre de eventos

Los análisis de supervivencia y tiempo hasta el evento respaldan la eficacia del vector scAAV9.CB.hSMN. En la Cohorte 2, los 12 pacientes (100%) tenían más de 24 meses de vida y estaban libres de eventos, en comparación con solo el 8% de los pacientes en un estudio de historia natural. Esto indica un aumento significativo y clínicamente significativo en la supervivencia general de los pacientes infundidos con el vector scAAV9.CB.hSMN en comparación con los pacientes no tratados. A los 2 años de la perfusión, no se informaron muertes de pacientes.

Hitos motores de desarrollo

Se examinaron los hitos motores del desarrollo; las evaluaciones de los 15 pacientes se grabaron en video para permitir la confirmación del logro de los hitos motores de desarrollo. Los pacientes de la cohorte 2 lograron y mantuvieron de manera constante hitos clave del desarrollo motor. A los 24 meses de seguimiento posterior a la dosis, 11 pacientes (91,7%) pudieron mantener la cabeza erguida durante ≥ 3 segundos y sentarse sin ayuda durante ≥ 5 segundos, 10 pacientes (83,3%) pudieron sentarse sin ayuda durante ≥ 10 segundos, 9 pacientes (75,0%) pudieron sentarse sin ayuda durante ≥ 30 segundos y 2 pacientes (16,7%) pudieron pararse solos, caminar con ayuda y caminar solo respectivamente. Los pacientes de la cohorte 2 que actualmente están enrolados en un seguimiento a largo plazo observacional en curso de este estudio han mantenido sus hitos motores de desarrollo, y algunos lograron hitos motores adicionales.

Tabla 31: Pacientes que desarrollaron hitos importantes de la función motora en base a una revisión central independiente a los 24 meses de seguimiento posterior a la dosis (conjunto de análisis completo)

	Vector scAAV9.CB.hSMN Cohorte 2 (N = 12) n (%)
Se da vuelta (se pone de costado a ambos lados estando de espalda)	9 (75,0)
Mantiene la cabeza erguida ≥ 3 segundos, sin ayuda	11 (91,7)
Se sienta con ayuda, no se sienta solo	11 (91,7)
Se sienta con ayuda ≥ 5 segundos	11 (91,7)
Se sienta con ayuda ≥ 10 segundos	10 (83,3)
Se sienta con ayuda ≥ 30 segundos	9 (75,0)
Se para con ayuda	2 (16,7)
Se para solo	2 (16,7)
Camina con ayuda	2 (16,7)
Camina solo	2 (16,7)

Pulmonares

De los 10 pacientes de la Cohorte 2 que no usaban ventilación no invasiva (NIV) a la línea de base del estudio, 7 no usaban diariamente NIV a los 24 meses de seguimiento. Casi todos los pacientes experimentaron enfermedades respiratorias infantiles comunes que, en niños con AME Tipo 1, generalmente resultan en traqueotomía o muerte. Todos los pacientes sobrevivieron a hospitalizaciones respiratorias sin traqueotomía o la necesidad de ventilación permanente.

Nutricionales

También se observaron beneficios nutricionales. En la cohorte 2, siete pacientes no recibían alimentación enteral antes de la terapia de reemplazo génico. Uno (1) de estos 7 pacientes tenía

soporte nutricional para ayudar a la cicatrización de la herida después de una difícil recuperación de una cirugía de escoliosis, pero también se alimentaba por vía oral. Cuatro (4) de los 5 pacientes de la Cohorte 2 que recibían alimentación enteral antes de la terapia de reemplazo génico pudieron alimentarse por vía oral al final del estudio; por lo tanto, un total de 11 de los 12 pacientes en la
5 cohorte 2 pudieron alimentarse por vía oral, 6 exclusivamente.

Función motora (CHOP-INTEND)

Los pacientes que recibieron la dosis terapéutica lograron mejoras de la función motora estadísticamente significativas para el mes 1 y el mes 3; los aumentos medios en la Prueba para
10 Bebés de Trastornos Neuromusculares del Hospital de Niños de Filadelfia (CHOP INTEND) respecto de la línea de base fueron de 9,8 puntos ($n = 12$, $P < 0,001$) y 15,4 puntos ($n = 12$, $P < 0,001$), respectivamente.

Las mejoras en la función motora se mantuvieron en el tiempo en los pacientes infundidos con el
15 vector scAAV9.CB.hSMN. Once de doce (91,7%) pacientes de la cohorte 2 alcanzaron una puntuación ≥ 50 CHOP INTEND a los 24 meses. La intervención temprana y la dosis parecen afectar positivamente la respuesta. En la práctica clínica general, los niños con AME Tipo 1 no tratados de 6 meses de vida o mayores no superan una puntuación de 40 puntos en CHOP INTEND. Además, se informó una disminución promedio de 10,7 puntos entre las edades de 6 y 12 meses
20 entre los lactantes no tratados seguidos como parte de una historia natural prospectiva.

Ejemplo 18 – Medición del ADN residual de la célula huésped en el vector viral AAV9s usando qPCR

Método

Este método se usó para la cuantificación del ADNhc residual en la sustancia farmacológica AAV, por ejemplo, AVXS-101, y las muestras en el proceso por qPCR. Se analizaron hasta seis muestras por placa. Se realizó un ensayo de qPCR utilizando una sonda TaqMan. La sonda TaqMan tiene un colorante fluorogénico reportero unido al extremo 5 y un apagador no fluorescente unido al extremo
30 3. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del apagador al colorante reportero reduce en gran medida la fluorescencia emitida por el mismo. La escisión de la sonda separa el colorante indicador y el apagador, aumentando la fluorescencia del reportero.

Cebadores flanqueantes hacia adelante y hacia atrás, diseñados para unirse a una secuencia repetitiva dentro del genoma humano, se agregaron a la mezcla de reacción y se anillaron a la secuencia diana presente en la muestra y los estándares. La sonda fluorogénica TaqMan anilla entre los sitios de cebador. Ciclos sucesivos de desnaturalización de plantilla, anillado de cebadores y extensión de producto amplificaron la secuencia objetivo. Durante la etapa de extensión del ciclo de amplificación, la actividad de exonucleasa de la ADN polimerasa Taq liberó el colorante reportero de la sonda, liberando el colorante del apagador, lo que resultó en una emisión de fluorescencia proporcional a la cantidad de plantilla.

La fluorescencia de cada pocillo de una placa de 96 pocillos se midió con un instrumento qPCR. A través de ciclos de PCR adicionales, se produjeron cantidades crecientes de la secuencia diana, y el resultado es que se liberó más colorante reportero de la sonda y una mayor fluorescencia en cada ciclo de PCR sucesivo. Se mide el número de ciclos de amplificación requeridos para que la señal fluorescente alcance un valor umbral predeterminado. Este ciclo se denomina ciclo umbral o valor CT. Cuanto mayor sea la concentración inicial de ADN en la muestra o en el pocillo estándar, menores serán los ciclos de PCR necesarios para alcanzar el nivel umbral de fluorescencia y menor será el valor de CT. La curva estándar se determina trazando $\log_{10}$ (concentración de ADN) frente al valor de CT medido para cada punto estándar. El valor CT se usa para determinar la cantidad de ADN presente en la muestra utilizando el valor CT individual para la muestra y resolviendo el valor del ADN.

Primero se prepararon las muestras usando un kit Wako DNA Extractor (Wako, 295-50201). Brevemente, las muestras a analizar se mezclaron bien y se diluyeron 1000 veces. Las muestras diluidas se dividieron en cuatro tubos (500 μ L cada uno) y se agregaron 50 μ L de agua a dos de los tubos (réplicas no enriquecidas) mientras que se agregaron 50 μ L de 30,000 pg/mL de estándar de ADN a los otros dos tubos (control enriquecido). La solubilización de la proteína se realizó mediante la adición de 20 μ L de solución de N-Lauroil Sarcosinato de Sodio a cada tubo, agitando en vórtex durante 5 segundos y luego centrifugando brevemente. Se preparó una solución de NaI que contenía glucógeno y Pellet Paint (Novagen, 70748) de modo que estuvieran en una proporción de 2000:5:4 de NaI:glucógeno: Pellet Paint. Se agregaron 500 μ L de la mezcla de NaI a cada tubo y se incubó a $53^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Los tubos se retiraron del calor, se mezclaron con 900 μ L de isopropanol y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los tubos a continuación se centrifugaron a 10,000 g durante 15 minutos a 18°C y se decantó el sobrenadante. El pellet restante se lavó con 800 μ L de solución de lavado A, se centrifugó y se repeletizó dos

veces. Finalmente, el pellet se lavó con 1500 µL de solución de lavado de isopropanol enfriada conteniendo glucógeno, se centrifugó y se repeletizó. El pellet final fue resuspendido en 500 µL de agua libre de nucleasa.

- 5 La qPCR se ejecutó usando un resDNA SEQ Human Quantitative Kit (Applied Biosystems, A26366). Se preparó una mezcla de reacción combinando 2x de mezcla maestra ambiental, 10x de mezcla de ensayo de ADN humano y control negativo según se indica en el kit. Se mezclaron 20 µL de mezcla de reacción con 10 µL de muestra preparada y se agregaron a cada pocillo en la placa de PCR. Cada muestra se plateó por triplicado. La placa se selló con película adhesiva óptica. Durante el termociclado, primero se realizó una fusión a 95 °C durante 10 minutos, y luego las muestras se ciclaron entre 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto durante 40 ciclos.

Se generó una curva estándar trazando el valor de CT frente a la cantidad de ADN en $\log([pg/mL])$. Los datos se ajustaron a una línea recta dada por la siguiente ecuación:

15
$$\text{Valor CT} = m \times \log_{10}(x) + b$$

donde x = concentración del estándar en pg/mL, m es la pendiente y b es la intersección en y . La concentración del ADN de la célula huésped se volvió a calcular a partir del valor de CT del pocillo usando la ecuación anterior, luego se corrigió por el factor de dilución.

20 **Resultados**

El ADN residual de la célula huésped medido por qPCR fue de $3,7 \times 10^5$ pg/mL para el Lote previo de vector, $0,76 \times 10^5$ pg/mL para el Lote de AVXS-101 600156, $0,68 \times 10^5$ pg/mL para el Lote de AVXS1-101 600307 y $1,3 \times 10^5$ pg/mL para la sustancia farmacológica AVXS-201.

25 **Ejemplo 19 - Medición de la proteína residual de la célula huésped (HCP) en el vector viral AAV9s por ELISA**

Método

- La concentración de proteína de la célula huésped (HCP) en las muestras de AVXS-101 se midió usando un kit comercial de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). El kit de ELISA Human Embryonic Kidney 293 HCP de Cygnus Technologies es un inmunoensayo enzimático de dos sitios en fase sólida. Se basa en una técnica directa tipo sándwich en la que dos anticuerpos policlonales se dirigen contra determinantes antigénicos de HCP separados. Durante la incubación,
- 30

la HCP en la muestra se unió con anticuerpos anti-HCP unidos a un pocillo de microplaca y con anticuerpos anti-HCP conjugados con peroxidasa en solución.

Después del período de incubación, los pocillos se lavaron para eliminar cualquier anticuerpo conjugado con enzima sin unir. Luego se agregó a los pocillos una solución de sustrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB). El conjugado de peroxidasa unido catalizó una reacción de cambio de color en el sustrato. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido, que dio un punto final colorimétrico que pudo leerse espectrofotométricamente a 450 nm. La cantidad de sustrato hidrolizado fue directamente proporcional a la concentración de HCP presente.

Las muestras a analizar se diluyeron para cumplir con el rango del método, desde 4 ng/ml hasta 200 ng/ml. Luego, cada muestra se diluyó 2 veces en SDB (110 µL de muestra y 110 µL de SDB) y se mezcló. También se hicieron controles enriquecidos para verificar la consistencia. En los controles enriquecidos, se mezclaron 110 µL de cada muestra con 27,5 µL de 200 ng/mL de estándar HCP y 82,5 µL de SDB. Finalmente, se incorporaron 50 µL de cada muestra de estándar, control o prueba a un pocillo en la placa de 96 pocillos y se mezcló con 100 µL de conjugado anti-HEK 293-HRP. Todas las condiciones se platearon por triplicado. La placa se selló con una cinta de sellado y se agitó a 400-600 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las soluciones en los pocillos se eliminaron poniendo la placa al revés y secando con una toalla absorbente. Los pocillos se lavaron con una botella de lavado, se secaron rápidamente y se sacudieron sin dejar que la solución de lavado se alojara en los mismos. El lavado se repitió 4 veces y se dejó reposar boca abajo durante aproximadamente 20 segundos para drenar después del último lavado. Finalmente, se agregaron 100 µL de sustrato TMB a cada pocillo de la placa y se incubó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. La reacción se detuvo agregando 100 µL de solución de parada a cada pocillo. La placa se cargó en un lector de placas dentro de los 45 minutos posteriores a la adición de la solución de parada y la placa se leyó a 450 nm y 650 nm.

La absorbancia media de los estándares se graficó contra la concentración teórica de HCP de los estándares en un gráfico semilogarítmico para generar una curva de ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL) basada en la siguiente ecuación:

$$Y = [(A - D)/(1+(X/C)^B)] + D$$

donde A es la asíntota inferior, B es la pendiente de Hill, C es la concentración correspondiente a los valores de absorbancia del punto medio entre las dos asíntotas (ng/mL), D es la asíntota superior, X es la concentración de la muestra (ng/mL) e Y es la absorbancia. Luego se usó la curva

estándar para determinar la concentración de HCP en el control de la muestra enriquecida y las muestras de prueba sin enriquecer utilizando el software SoftMax Pro. La prueba solo se aceptaba si el r^2 de la curva estándar era $\geq 0,98$, la absorbancia media corregida del estándar de 200 ng/mL era $\geq 1,0$ OD, la absorbancia media corregida del estándar 0 ng/mL era $\leq 0,2$ OD y el coeficiente de variación de la absorbancia corregida en 3 repeticiones de pocillos era $\leq 15\%$. La concentración final de HCP para cada muestra se calculó utilizando la ecuación:

Concentración de HCP_{muestra} (ng/mL) = Factor de dilución x concentración media de HCP medida (ng/mL).

Resultados

La proteína residual de la célula huésped medida por ELISA estuvo por debajo del límite de cuantificación (8 ng/ml) para el Lote previo de vector, el Lote de AVXS-101 600156, el Lote de AVXS1-101 600307 y la sustancia farmacológica AVXS-201.

Ejemplo 20 - Medición de la Benzonase residual en el vector viral AAV9s por ELISA

Método

La concentración residual de Benzonase en el producto AAV, por ejemplo, AVXS-101, se midió usando un kit comercial de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). El Merck Benzonase Endonuclease ELISA Kit II es un inmunoensayo enzimático de dos sitios en fase sólida. Se basa en una técnica directa tipo sándwich en la que dos anticuerpos policlonales se dirigen contra determinantes antigénicos de la Benzonase separados. Durante la incubación, la Benzonase en la muestra se unió con anticuerpos anti-Benzonase unidos a un pocillo de microplaca y con anticuerpos anti-Benzonase conjugados con peroxidasa en solución.

Después del período de incubación, los pocillos se lavaron para eliminar cualquier anticuerpo conjugado con enzima sin unir. Luego se agregó a los pocillos una solución de sustrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB). El conjugado de peroxidasa unido catalizó una reacción de cambio de color en el sustrato. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido, que dio un punto final colorimétrico que pudo leerse espectrofotométricamente a 450 nm. La cantidad de sustrato hidrolizado fue directamente proporcional a la concentración de Benzonase presente.

Brevemente, las muestras a analizar se diluyeron para 2 veces combinando 175 μ L de muestra con 175 μ L de PBST. En paralelo, también se preparó un control de muestra enriquecido con Benzonase combinando 175 μ L de muestra con 35 μ L de 10 ng/ml de estándar de Benzonase y 140 μ L de PBST. Las tiras de ELISA pre-recubiertas del kit se montaron en un soporte de tiras y se cargaron 100 μ L de cada mezcla de prueba por pocillo. Para los blancos, se cargaron 100 μ L de PBST en lugar de la muestra. Cada condición se cargó por triplicado. La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas $\pm$ 5 minutos con agitación en un agitador de placa (450 rpm). Después de la incubación, los contenidos se descartaron y la placa se lavó agregando $\sim$ 350 μ L de PBST usando un Immunowasher y se incubó durante 1 minuto, luego se invirtió y se sacudió sobre una toalla absorbente. Se realizaron un total de 3 lavados antes de agregar 100 μ L de Anticuerpo Conjugado con HRP diluido a cada pocillo. La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora $\pm$ 5 minutos con agitación en un agitador de placa (450 rpm). Después de la incubación, los contenidos se descartaron y la placa se lavó agregando $\sim$ 350 μ L de PBST usando un inmunowasher y se incubó durante 1 minuto, luego se invirtió y se sacudió sobre una toalla absorbente. Se realizaron un total de 3 lavados antes de agregar 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo. La placa se selló y el contenido se incubó durante 15-40 minutos a temperatura ambiente sin agitación en la oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ L de solución de parada de H_2SO_4 0,2N a cada pocillo. La absorbancia de la placa se midió usando un espectrofotómetro a 450 nm dentro de los 45 minutos posteriores a la adición de la Solución de Parada.

La absorbancia media de los estándares se graficó contra la concentración teórica de Benzonase de los estándares en un gráfico semilogarítmico para generar una curva de ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL) basada en la siguiente ecuación:

$$Y = [(A - D)/(1+(X/C)^B)] + D$$

donde A es la asíntota inferior, B es la pendiente de Hill, C es la concentración correspondiente a los valores de absorbancia medios entre las dos asíntotas (ng/mL), D es la asíntota superior, X es la concentración de la muestra (ng/mL) e Y es la absorbancia. Luego se usó la curva estándar para determinar la concentración de HCP en el control de la muestra enriquecida y las muestras de prueba sin enriquecer utilizando el software SoftMax Pro. La prueba solo se aceptaba si el r^2 de la curva estándar era $\geq 0,98$, la absorbancia media corregida del estándar 2,5 ng/mL era $\geq 1,0$ OD, la absorbancia media corregida del estándar 0,10 ng/mL era mayor que la OD media del blanco PBST, y el coeficiente de variación de la absorbancia corregida en 3 repeticiones de pocillos era $\leq 15\%$. La concentración final de HCP para cada muestra se calculó utilizando la ecuación:

Concentración de Benzonase de la muestra (ng/mL) = Factor de dilución x concentración media de Benzonase medida (ng/mL).

5 **Resultados**

La concentración residual de Benzonase medida por ELISA fue inferior al límite de cuantificación (0,2 ng/mL) para el lote Previo de vector, el Lote de AVXS-101 600156, el Lote de AVXS1-101 600307 y la sustancia farmacológica AVXS-201.

10 **Ejemplo 21 - Medición de la concentración de proteína en el vector viral AAV9s mediante un Ensayo Micro BCA**

Método

La cantidad de proteínas en el proceso, en la sustancia farmacológica y las muestras de producto farmacológico, por ejemplo, de AVXS-101, se midió mediante un ensayo de placa micro BCA, utilizando 2 mg/mL de un estándar de proteína de referencia de Albúmina de Suero Bovino (Thermo Fisher Scientific, 23209) y un Kit de Ensayo de Proteína Micro BCA (Thermo Fisher Scientific, 23235). El ensayo se basa en una formulación de ácido bicinonínico (BCA) compatible con detergentes para la detección colorimétrica y la cuantificación de la proteína total. El BCA detecta Cu^{1+} que se forma cuando el Cu^{2+} es reducido por la proteína en un ambiente alcalino. Se forma un producto de reacción de color púrpura por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{1+}), que exhibe una fuerte absorbanza a 562 nm que es lineal con concentraciones crecientes de proteína.

Brevemente, los estándares se prepararon realizando diluciones en serie de 2 mg/mL BSA en Diluyente (Dilución de 20 veces del tampón de formulación, 200 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM MgCl_2 , 0,001% p/v de Pluronic F-68, pH 8,0). Las muestras de prueba de AVXS-101 también se diluyeron 20 veces en agua y se hicieron diluciones en serie en diluyente. La concentración objetivo es de aproximadamente 7,5 $\mu\text{g/mL}$. El Reactivo de Trabajo (WR) fue preparado mezclando 25 partes de Reactivo A de Micro BCA, 24 partes de Reactivo B y 1 parte de Reactivo C del kit. 150 μL de cada estándar y muestra de prueba se cargó por triplicado en una placa de 96 pocillos y se mezcló con 150 μL de WR. La placa se selló y se agitó a 300 rpm en un agitador de placa durante 30 segundos. La placa se incubó sin agitar a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Después de la incubación, la placa se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos para recoger la condensación, y la placa se enfrió durante

15-60 minutos después de la incubación. La placa se leyó en un lector de placas a 562 nm y los datos se analizaron con SoftMax Pro.

La absorbancia media de los estándares frente a la concentración teórica de proteína de los estándares se trazó en un gráfico semilogarítmico y se generó un ajuste cuadrático. El ajuste cuadrático se basa en la ecuación:

$$Y = A + Bx + Cx^2$$

donde A, B, C son parámetros de ajuste de la curva, x es la concentración de la muestra en µg/mL e Y es la absorbancia en OD. La prueba solo se aceptó si el r² de la curva estándar era ≥0,98, la absorbancia media del blanco era menor que la del estándar más bajo (1 µg/mL) y el coeficiente de variación de la absorbancia en 3 repeticiones de pocillo de cada estándar era ≤10%. La curva estándar se usó luego para determinar la concentración de proteína en las muestras de prueba. La concentración final de proteína se calculó utilizando la ecuación:

Concentración Total de Proteína (µg/mL) = Factor de Dilución x Concentración Medida de Proteína Medida (µg/mL).

Resultados

La concentración de proteína total medida por Micro BCA fue de 167 µg/mL por 1,0x10¹³ vg/mL para el lote previo de vector, 179 µg/mL por 1,0x10¹³ vg/mL para el Lote de AVXS-101 600156, 176 µg/mL por 1,0x10¹³ vg/mL para el Lote de AVXS1-101 600307, 182 µg/mL por 1,0x10¹³ vg/mL para el Producto Farmacológico AVXS-201 y 418 µg/mL por 1,0x10¹³ vg/mL para el Producto Farmacológico AVXS-301.

Ejemplo 22 - Especificaciones de pureza y lanzamiento de AVXS-101, AVXS-201 y AVXS-301

Se testeó la pureza de la Sustancia Farmacológica AVXS-101 y el Producto Farmacológico AVXS-101 de los Ejemplos 1 a 4. La Tabla 32 y 33 ilustra los criterios de especificación y de lanzamiento para estos productos.

Tabla 32: Especificación de lanzamiento para la Sustancia Farmacológica AVXS-101

Impureza Relacionada con el Proceso	Origen	Criterios de Aceptación
Proteína de la Célula Huésped (HCP)	Sustrato Celular	≤ 4 ng por 1,0E13 vg
ADN de la Célula Huésped	Sustrato Celular	≤ 1,15E5 pg por 1,0E13 vg
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Cultivo Celular	≤0,22 ng por 1,0E13 vg

ADN de Plásmido (ADNp)	Cultivo Celular	≤6,8E5 pg por 1,0E13 vg
Polietilenimina (PEI)	Cultivo Celular	No probado en el lanzamiento
Benzonase	Procesamiento Aguas Abajo	≤0,09 ng por 1,0E13 vg
Tween 20	Procesamiento Aguas Abajo	No probado en el Lanzamiento
Poloxámero 188	Procesamiento Aguas Abajo	20-80 ppm
Cesio(Cs)	Procesamiento Aguas Abajo	≤ 30 µg/g (ppm)
Etanol	Procesamiento Aguas Abajo	No probado en el Lanzamiento

Tabla 33: Especificaciones de Lanzamiento para el Producto Farmacológico AVXS-101

Categoría	Atributo	Criterio de aceptación
Generalidades	Aspecto por USP <631> y USP <855>	Solución clara a ligeramente opaca, incolora a blanca pálida, libre de partículas visibles
	pH por USP <791>	7,7-8,3
	Osmolalidad Plasmática por USP <785>	390-430 mOsm/kg
	Partículas subvisibles por USP <787>	≤ 600 partículas ≥ 25 µm por envase ≤ 6000 partículas ≥ 10 µm por envase
Cantidad	Título Genómico por ddPCR	1,7E13 - 2,3E13 vg/mL
	Título infeccioso por TaqMan TCID ₅₀	3,9E8 - 8.4E10 IU por 1,0E13 vg
	Total Proteína por Micro BCA	100-300 µg por 1,0E13 vg
	Contenido de Pluronic F-68 por HPLC-ELSD	20-80 ppm
Potencia	Ensayo de Funcionalidad in vivo por Modelo de Ratón AMEΔ7	La Supervivencia Media que representa la dosis de 7,5E13 vg/kg es ≥ 24 días
	Potencia in vitro Relativa por Ensayo Basado en Células	70-130%
Identidad	Identidad del Genoma del Vector por ddPCR	Confirma
	Identidad (Proteína) por SDS-PAGE	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con el Estándar de Referencia AVXS-101
	Identidad (Proteína) por Transferencia de Western	Positiva para proteína de la cápside de AAV
Pureza	% de Distribución de Cápsides por SV-AUC	% Vacías ≤5%
		% Pico 1 + Pico 2 ≥91,9%
		% Llenas (Pico 1) 37,4 - 70,3%
		% Llenas (Pico 2) 24,9 - 60,1%
		% Total de Otros Picos ≤5%
	% de Pureza Total por SDS-PAGE	% Pureza Total (VP1, VP2, VP3) ≥95,0%
	% de Impurezas Total por SDS-PAGE	% Total Impurezas ≤5%

		Ninguna impureza relacionada no identificada > 2,0%
		Impurezas relacionadas identificadas: Valor reportado (%) a 0,1% (hasta el Límite de Cuantificación) - Imp 1A (~71-73 kDa) - Imp 1 (~61-67 kDa) - Imp 2 (~56-64 kDa) - Imp 3 (~48-58 kDa) - Imp 4 (~33-38 kDa) - Imp 5 (~30-34 kDa)
Seguridad	Endotoxina por USP <85>	≤0,75 EU/mL
	Esterilidad por USP <71>	Sin crecimiento
	Integridad del Cierre del Envase por USP <1207> Caída de vacío	Aprueba

AVXS-201 y AVXS-301 pueden fabricarse y purificarse utilizando el mismo proceso que se describe para AVXS-101, por ejemplo, según lo expuesto en los Ejemplos 1-4. Los criterios de especificación y lanzamiento para los lotes de cada producto producidos en los biorreactores se indican en la Tabla 34 - 36.

Tabla 34: Sustancia Farmacológica AVXS-201 Lote 283-0218-005

Descripción del Ensayo	Resultado
Carga Biológica	< 1 CFU/mL
pH	7,8
Aspecto por Inspección Visual	Solución transparente, incolora.
Osmolalidad por Depresión del punto de congelación	411 mOsm/kg
Título Genómico por ddPCR	4,0x10 ¹³ vg/mL
Identidad del Genoma del Vector por ddPCR	Confirma
Identidad del Vector por SDS-PAGE	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con el control de AVXS-201
Pureza por SDS-PAGE	98%
% de Cápsides Vacías por AUC	TBD

Descripción del Ensayo	Resultado
Total Impurezas por SDS-PAGE	Total % Impurezas: 2% % de Impurezas con PM: 53,2 kDa, <1,0% 36,9 kDa, <1,0% 29,9 kDa, <1,0%
BSA Residual por ELISA	< LOQ (<0,50 ng/mL)
ADN de Plásmido Residual por qPCR	1,2 x 10 ⁶ pg/mL por 1,0 x 10 ¹³ vg/mL
ADN Residual de la Célula Huésped por qPCR	1,3 x 10 ⁵ pg/mL por 1,0 x 10 ¹³ vg/mL
Benzonase Residual por ELISA	< LOQ (< 0,20 ng/mL)
Proteína de la Célula Huésped por ELISA	< LOQ (< 8 ng/mL)

Tabla 35: Producto Farmacológico AVXS-201 Lote 283-0218-006

Descripción del Ensayo	Resultado
Esterilidad	Sin Crecimiento
Endotoxina	0,02 EU/mL por 1,0x10 ¹³ vg/mL
AAV Competente de Replicación	TBD
pH	7,8
Aspecto por Inspección Visual	Solución transparente, incolora, sin partículas visibles
Osmolalidad por Depresión del punto de congelación	409 mOsm/kg
Partículas subvisibles por oscurecimiento de luz	0 partículas mayores o iguales a 25 µm por envase 0 partículas mayores o iguales a 10 µm por envase
Título Genómico por ddPCR	3,6x10 ¹³ vg/mL
Título infeccioso por TCID ₅₀	8,26 x 10 ¹⁰ TCID ₅₀ /mL
Total Proteína por Micro BCA	182 µg/mL por 1,0x10 ¹³ vg/mL
Pluronic por HPLC-ELSD	46 ppm
Identidad del Genoma del Vector por ddPCR	Confirma

Descripción del Ensayo	Resultado
Identidad por Transferencia de Western	Positiva para Proteína de la Cápside de AAV PM de la Banda Principal VP1: 79,0 kDa VP2: 65,0 kDa VP3: 57,7 kDa
Identidad por SDS-PAGE	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con el control de AVXS-201
% de Cápsides Vacías por AUC	2%
% de Pureza Total por SDS-PAGE	98%
% de Impurezas Total por SDS-PAGE	% Total de Impurezas: 2% % de Impurezas con PM: 52,5 kDa, <1,0% 36,4 kDa, <1,0% 29,1 kDa, <1,0%
Cesio por ICP-MS	28 µg/g (ppm)

Tabla 36: Pureza de un lote de prueba del Producto Farmacológico AVXS-301

Descripción del Ensayo	Resultado
Esterilidad	Sin Crecimiento
Endotoxina	0,09 EU/mL
AAV Competente de Replicación	Negativo
pH	8,0
Aspecto por Inspección Visual	Solución clara e incolora.
Osmolalidad por Depresión del punto de congelación	408 mOsm/kg
Partículas subvisibles por oscurecimiento de luz	0 partículas mayores o iguales a 25 µm por envase 0 partículas mayores o iguales a 10 µm por envase
Título Genómico por ddPCR	$2,5 \times 10^{13}$ vg/mL
Título infeccioso por TCID ₅₀	$5,62 \times 10^{10}$ TCID ₅₀ /mL
Total Proteína por Micro BCA	418 µg/mL

Descripción del Ensayo	Resultado
Pluronic por HPLC-ELSD	53,2 ppm
Identidad del Genoma del Vector por ddPCR	Confirma
Identidad (Proteína) por Transferencia de Western	Positiva para Proteína de la Cápside de AAV
Identidad (Proteína) por SDS-PAGE	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con el control de AVXS-301
% de Cápsides Vacías por AUC	3%
% de Pureza Total por SDS-PAGE	98%
% de Impurezas Total por SDS-PAGE	Total Impurezas: 2% Impurezas con PM: - Imp 1 (~61-67 kDa): 2%
Cesio por ICP-MS	Inferior al límite de cuantificación (< 20µg/g (ppm))

La alta pureza lograda para AVXS-201 y AVXS-301 indica que los métodos de producción y purificación de vectores virales de AAV descritos en esta solicitud demuestran una amplia aplicabilidad para vectores virales de AAV con diferentes cargas útiles.

5

Habiendo descrito las formas de realización con referencia a los dibujos que se acompañan, debe entenderse que la invención no se limita a las mismas, y que varios cambios y modificaciones pueden ser introducidos por los expertos en la técnica sin apartarse del alcance o espíritu del invento y las formas de realización que se definen en las reivindicaciones adjuntas.

10

Lista de Ejemplos de Formas de Realización

1. Una composición farmacéutica que comprende:

15

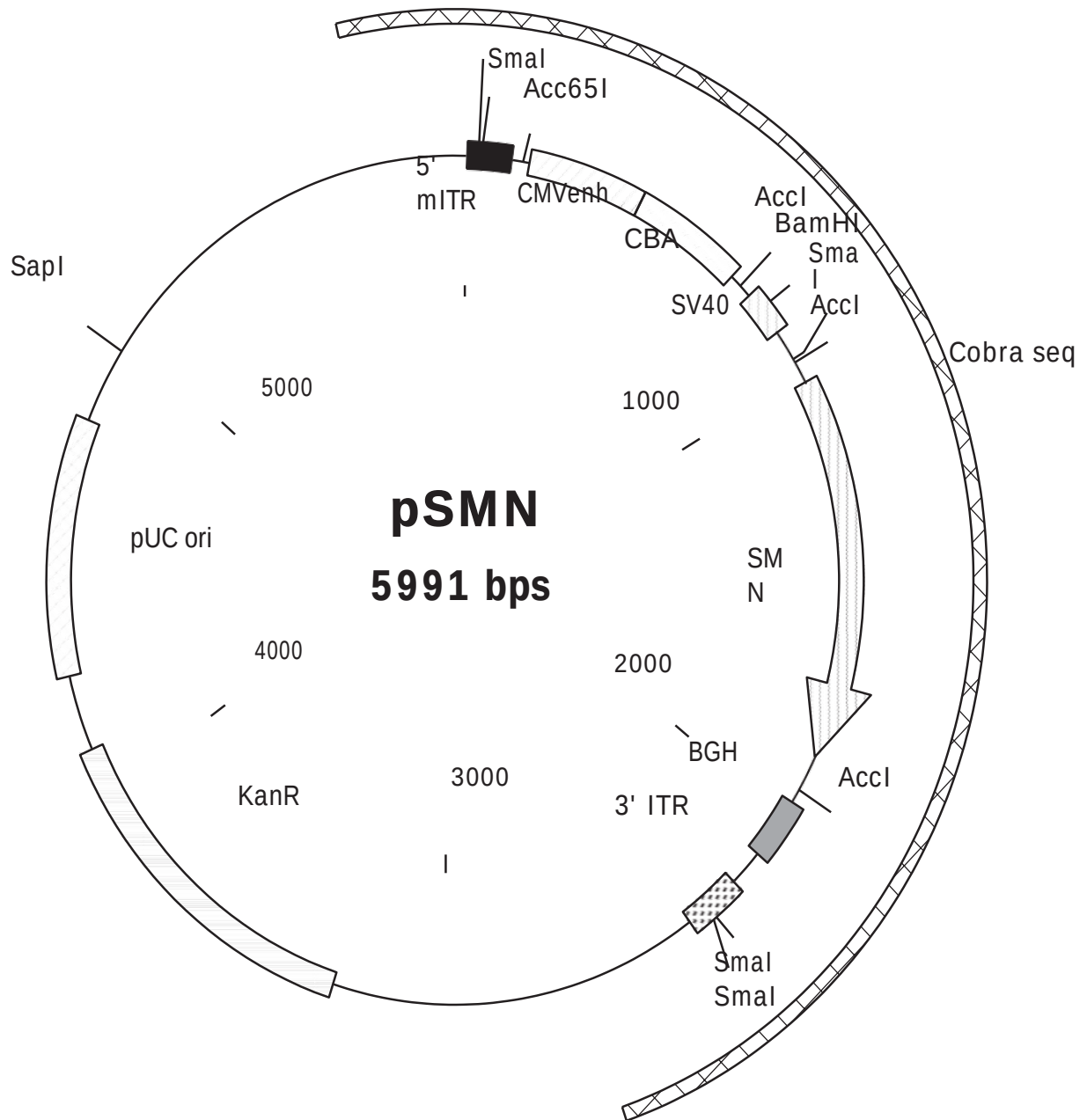
- (a) entre $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas de vector/ml de parvovirus diseñado con un transgén;
- (b) menos de 5,0 % de cápsides vacías;
- (c) menos de 40ng/ml de proteína de célula huésped residual por 1×10^{13} vg/ml;
- (d) menos de $1,2 \times 10^6$ pg/ml de ADN residual de la célula huésped por 1×10^{13} vg/ml; y,
- (e) por lo menos 80% de los $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas de vector/ml son funcionales.

20

2. La composición de la forma de realización 1, en donde la cantidad de ADN plasmídico residual comprende menos de $1,7 \times 10^6$ pg por 1×10^{13} vg.
3. La composición de la forma de realización 1, en donde la cantidad de genomas de vector/ml de parvovirus comprende $1,8 - 2,2 \times 10^{13}$ genomas de vector/ml.
4. Un método de purificación de partículas de AAV de un cultivo de células huésped de mamífero para formar una sustancia farmacológica intermedia congelada que comprende los pasos de:
- (a) cultivar células que han sido transfectadas con un virión de AAV recombinante;
 - (b) cosechar las partículas virales expandidas de las células después de un período de cultivo;
 - (c) purificar las partículas virales mediante filtración para eliminar las células intactas o los restos celulares;
 - (d) someter el eluyente del paso (c) a filtración de flujo tangencial; y,
 - (e) congelar la preparación intermedia resultante de partículas virales purificadas.
5. El método de la forma de realización 4, en donde se usa una endonucleasa durante el paso de cosecha.
6. El método de la forma de realización 5, en donde la endonucleasa es Benzonase.
7. El método de la forma de realización 4, en donde el paso de purificación utiliza filtración profunda seguida de filtración a través de un filtro que elimina contaminantes de moléculas grandes y restos celulares.
8. El método de la forma de realización 4, en donde el paso de filtración de flujo tangencial utiliza membranas de celulosa.
9. Un método de purificación de una muestra de partículas de AAV de un cultivo de células huésped de mamífero para formar un producto farmacológico que comprende los pasos de:
- (a) un paso de acidificación y clarificación;
 - (b) un paso de cromatografía de intercambio catiónico;
 - (c) un paso de filtración de flujo tangencial;
 - (d) un paso de ultracentrifugación en CsCl para eliminar cápsides vacías; y,
 - (e) un paso de filtración de flujo tangencial.

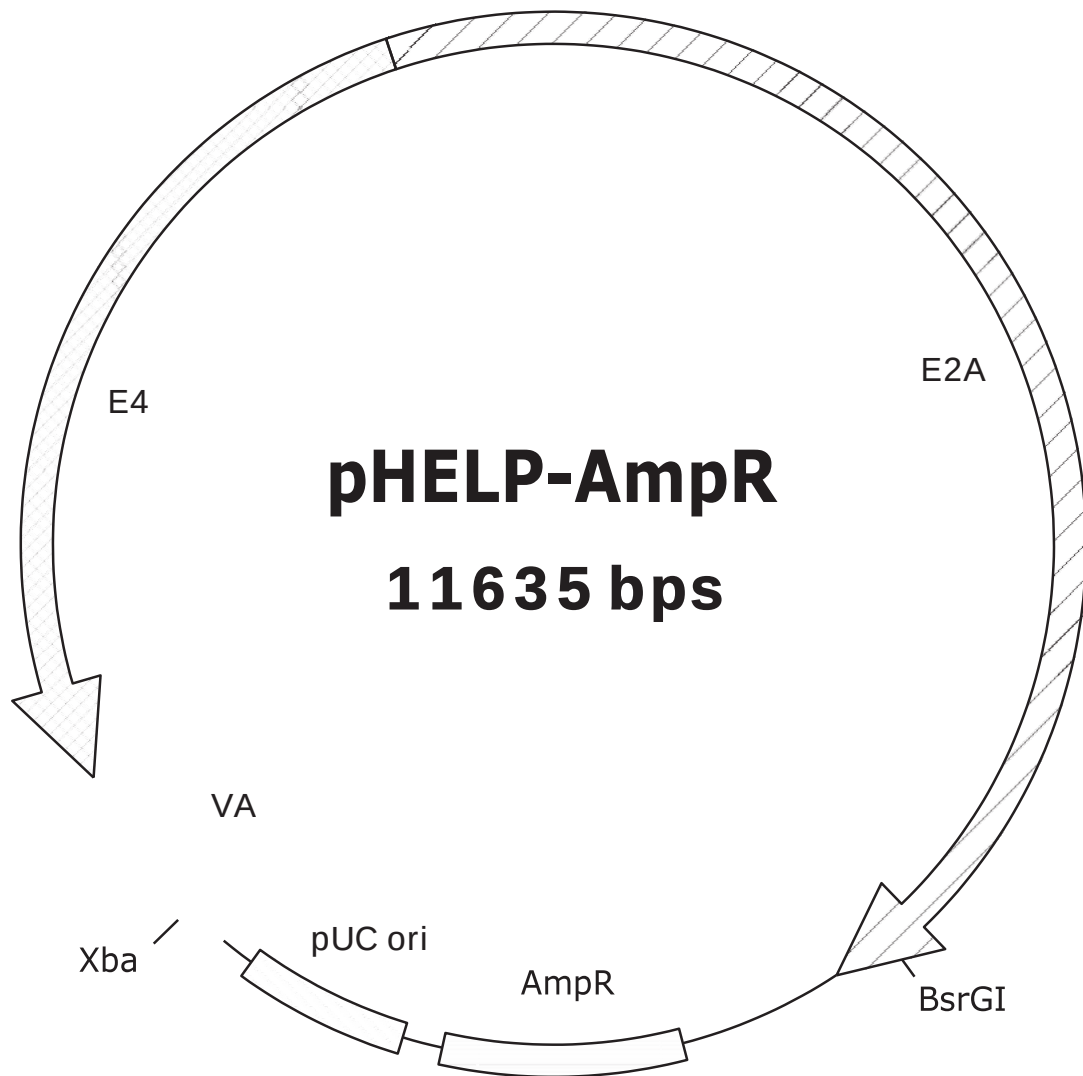
10. El método de la forma de realización 9, en donde el paso de acidificación y clarificación comprende ajustar la muestra a pH 3,5 en tanto las proteínas de la célula huésped y el ADN se eliminan mediante floculación con un detergente.
- 5
11. El método de la forma de realización 9, en donde la columna de intercambio catiónico comprende una resina de sulfonilo.
12. El método de la forma de realización 9, en donde el paso de filtración de flujo tangencial (c) utiliza membranas de celulosa con un límite de peso molecular de 300 kDa de PM y reduce el volumen de eluato del paso de intercambio catiónico por lo menos seis veces.
- 10
13. El método de la forma de realización 9, en donde el paso de ultracentrifugación en CsCl que elimina por lo menos 80% de las cápsides vacías en la muestra utiliza filtración profunda seguida de filtración a través de un filtro de 0,45 micrones.
- 15
14. El método de la forma de realización 9, en donde el paso de filtración de flujo tangencial (e) utiliza membranas de celulosa con un límite de peso molecular de 300 kDa de PM.
15. Un método para tratar una enfermedad neurológica en un paciente que lo necesita que comprende la administración intravenosa o intratecal de la composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 1-3, en donde el parvovirus comprende un genoma de AAV9 auto complementario, y en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN y en donde la enfermedad es AME.
- 20
16. Un método para tratar una enfermedad neurológica en un paciente que lo necesita que comprende la administración intratecal de la composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 1-3 con un agente de contraste, en donde el parvovirus comprende un genoma de AAV9 auto complementario, y en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN, en donde la enfermedad es AME, y en donde el agente de contraste es Omnipaque 180.
- 25
17. El método de cualquiera de las formas de realización 15-16, en donde la AME es AME tipo II, tipo III o tipo IV.
- 30

18. Un método de tratamiento de una AME tipo II, III, o IV en un paciente que lo necesita que comprende la administración intratecal de la composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 1-3 con un agente de contraste, en donde el parvovirus comprende un genoma de AAV9 auto complementario, en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN, y en donde el agente de contraste es Omnipaque 180.
19. Un método de tratamiento de AME tipo I en un paciente que lo necesita que comprende la administración intravenosa de la composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 1-3 en donde el parvovirus comprende un genoma de AAV9 auto complementario, y en donde el transgén diseñado comprende un polinucleótido de SMN.
20. El método de la forma de realización 19, en donde el paciente tiene 0-9 meses de vida.
21. El método de la forma de realización 20, en donde el paciente tiene 0-6 meses de vida.
22. El método de la forma de realización 19, en donde el paciente pediátrico pesa hasta aproximadamente 8 kg.



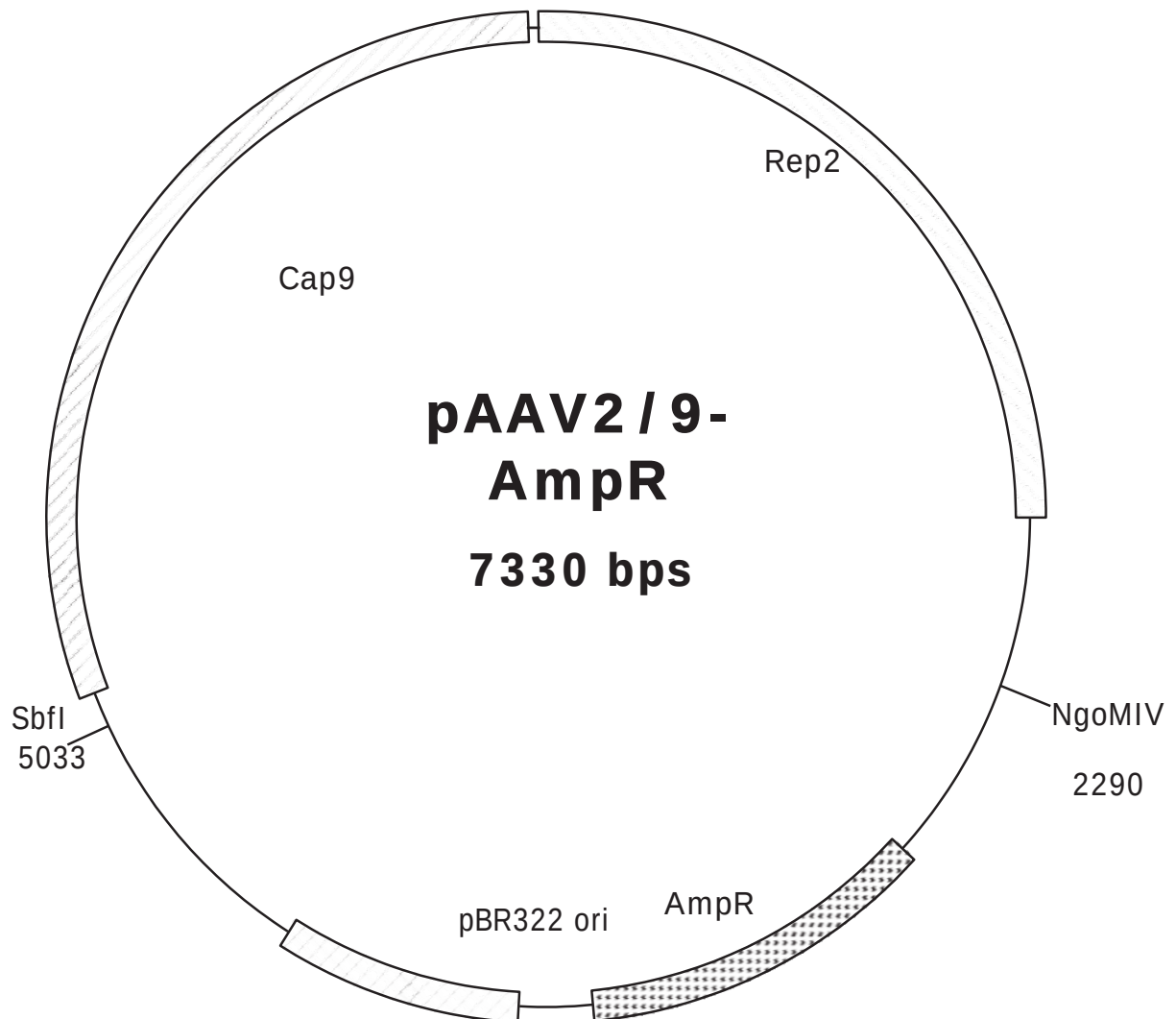
Mapa de pSMN

Figura 1A



Mapa de pHELP

Figura 1B



Mapa de pAAV2 / 9

Figura 1C

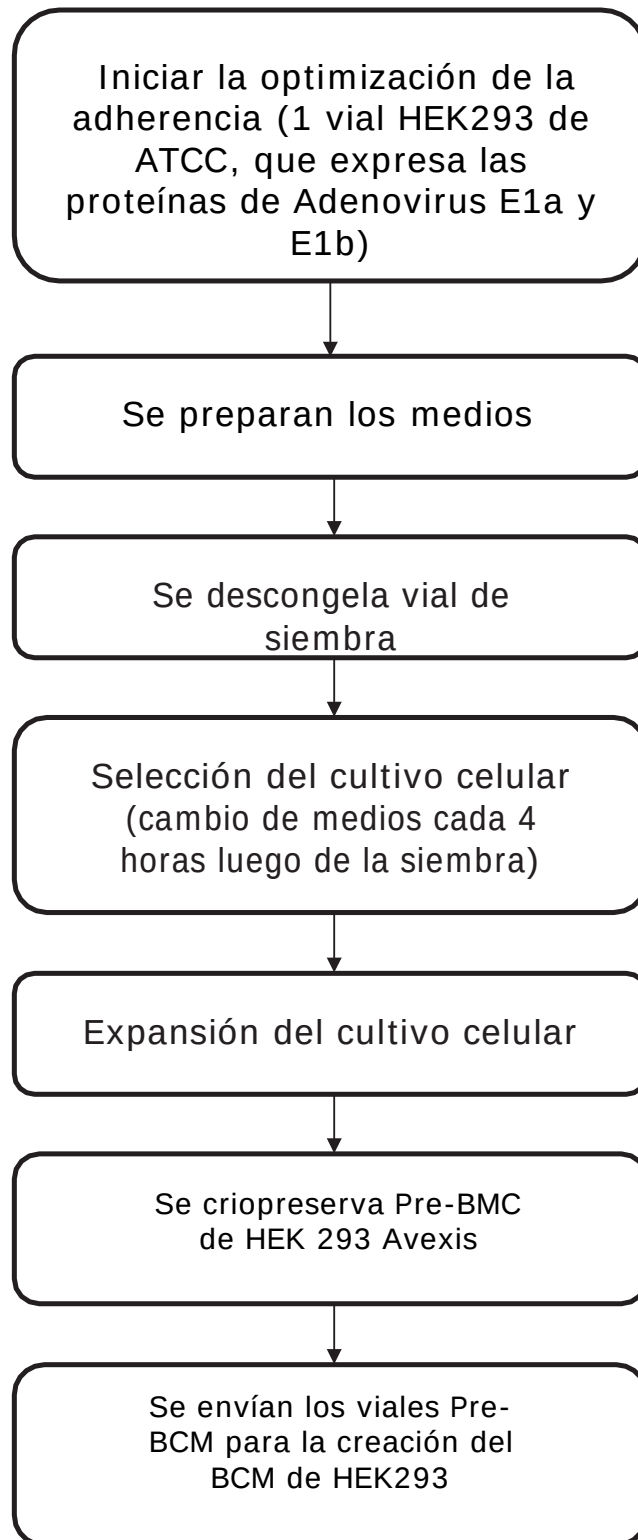


Figura 2

Paso / Página del cuaderno	Fecha	Detalles				Notas
Descongelación Página 3	7/22/2015	Matraces sembrados	25	Pase Anterior	0	Las células no se contaron, pero el vial completo de ATCC (1×10^6 células) se sembró en placas. Cuatro cambios de medios entre este paso y el siguiente.
		Densidad de Siembra	1×10^6 células	Pase Nuevo	1*	
Paso Página 5	7/27/2015	Matraces sembrados	75	Pase Anterior	1	Las células antes de la división eran 95% confluentes. El paso de selección de adherencia después de la siembra conduce a una porción significativa de células no adherentes perdidas: ~ 35% de pérdida celular por inspección visual.
		Densidad de Siembra	1:1	Pase Nuevo	2	
Paso Página 7	7/29/2015	Matraces sembrados	75	Pase Anterior	2	Paso de selección de adherencia incluido después de la siembra.
		Densidad de Siembra	1:1	Pase Nuevo	3	
Paso Página 8	7/31/2015	Matraces sembrados	2 x 175	Pase Anterior	3	Paso de selección de adherencia incluido después de la siembra, con pérdida de células mucho menos pronunciada mediante inspección visual.
		Densidad de Siembra	1:4.7	Pase Nuevo	4	
Paso Página 9	8/3/2015	Matraces sembrados	8 x 175	Pase Anterior	4	Un cambio de medios entre este paso y el siguiente.
		Densidad de Siembra	1:4	Pase Nuevo	5	
Paso Página 10	8/6/2015	Matraces sembrados	20 x 175	Pase Anterior	5	Un cambio de medios entre este paso y el siguiente.
		Densidad de Siembra	1:3 o 1:2	Pase Nuevo	6	
Cosecha / Crioconservación Páginas 11-15	8/9/2015	Concentración celular	1×10^7 células/mL	Viales llenos	22	Se agruparon 2 suspensiones celulares para producir 1×10^8 células y 1.2×10^8 células.

Nota: Todos los totales de células reportadas anteriormente tienen la unidad de "células" e indican el total de células recuperadas.

Todas las densidades de siembra reportadas anteriormente tienen la unidad de "células/cm²". Todos los tamaños de matraces reportados anteriormente tienen la unidad de "cm²".

Todas las concentraciones celulares reportadas anteriormente tienen la unidad de "células/mL".

* La descongelación se consideró un pase, por lo que las células descongeladas se etiquetaron como "pase 1".

Figura 3

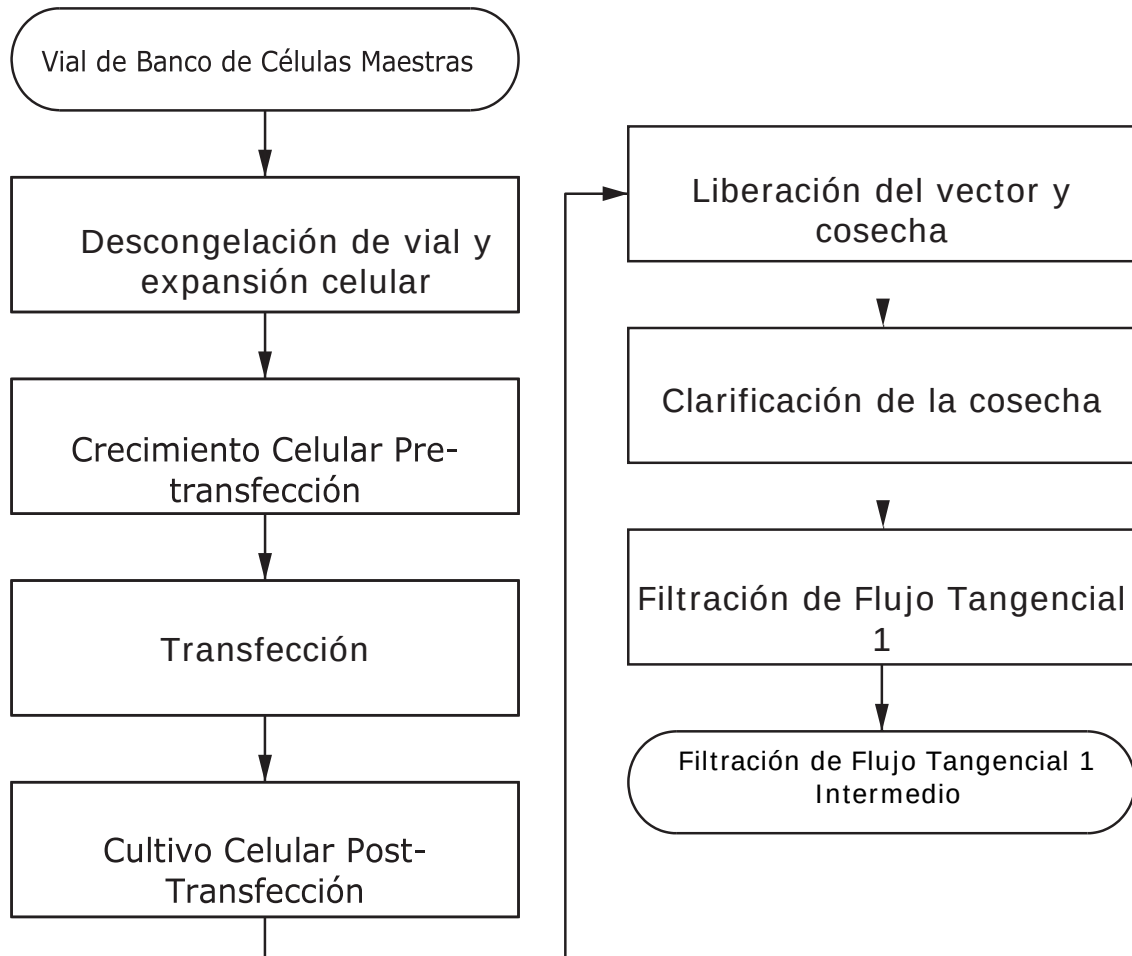


Figura 4

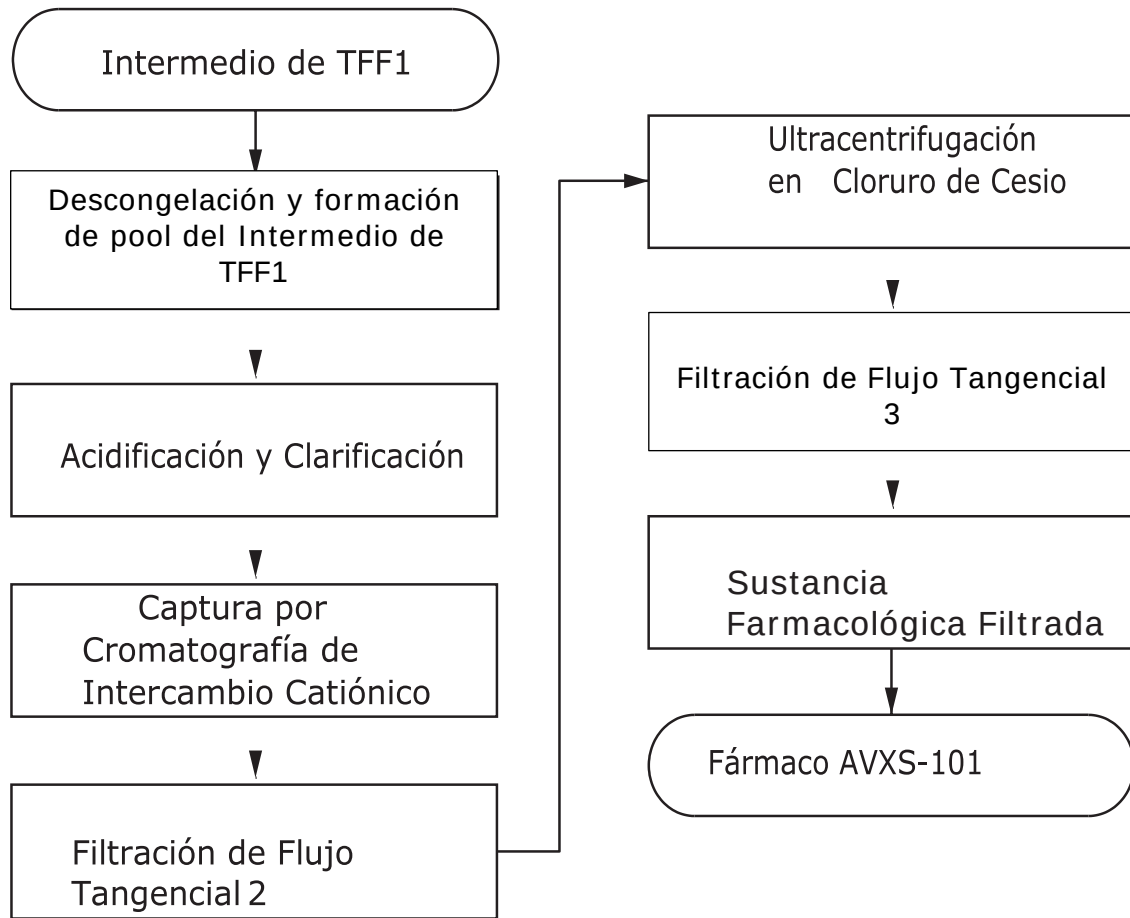


Figura 5

Cinética de Inactivación

Inactivación de XMuLV por Tween-20

Estudio TXNA Nro. 17-159-10F4-1

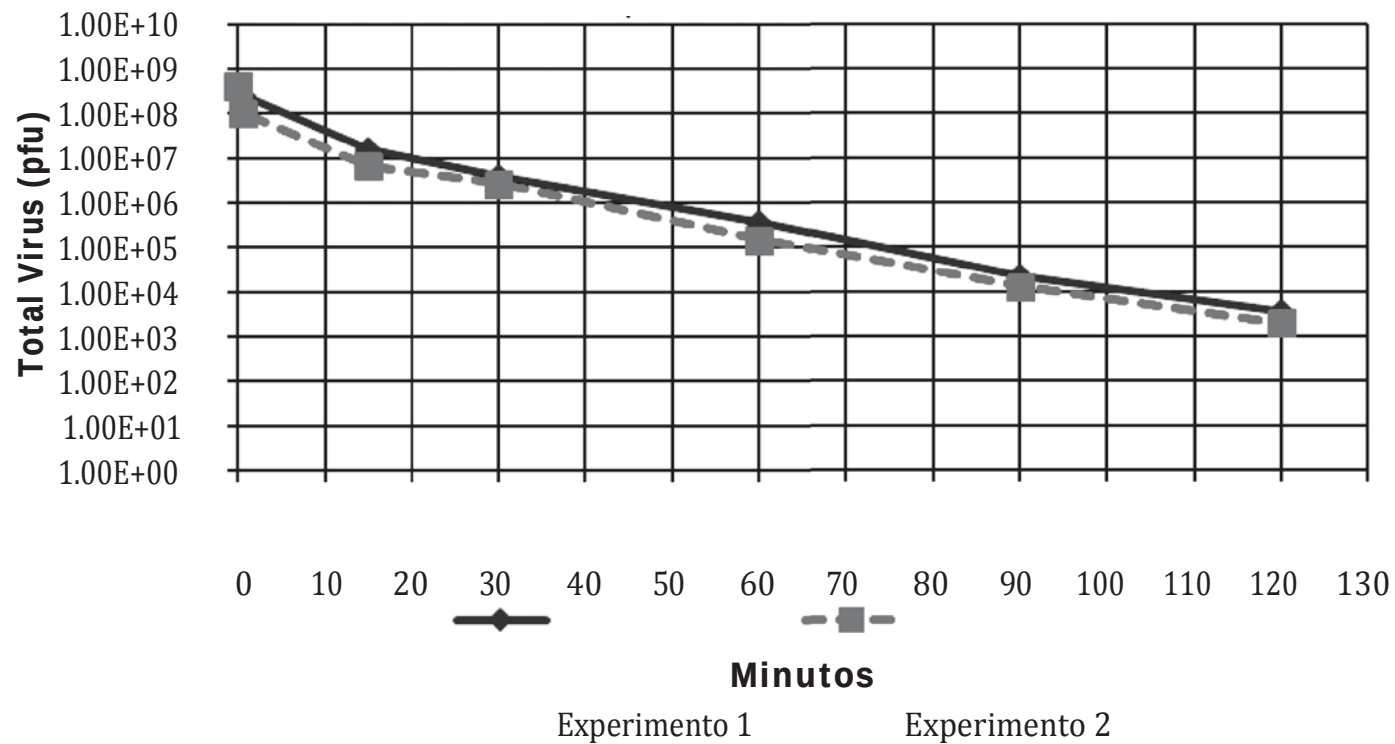


Figura 6

Cinética de Inactivación

Inactivación de PRV por Tween-20
Estudio TXNA Nro.17-160-40F4-1

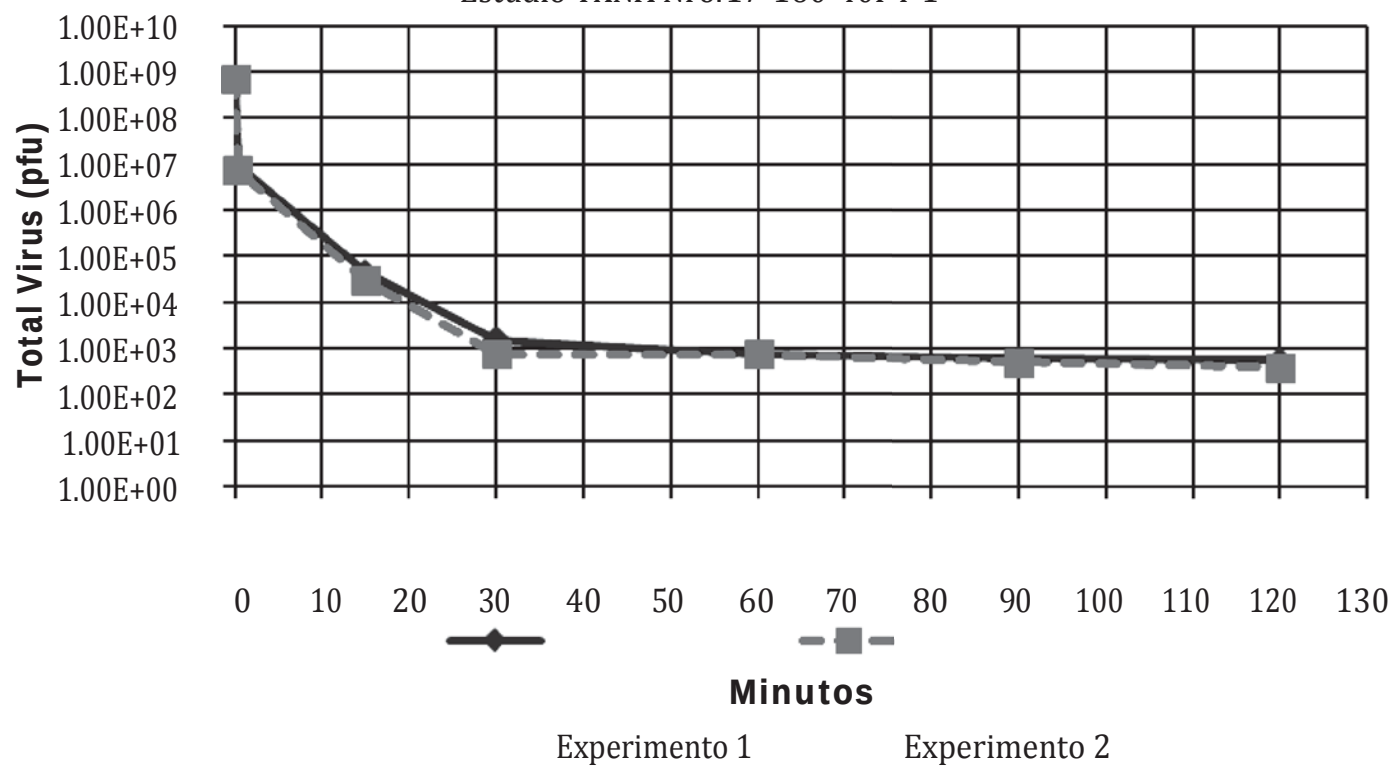
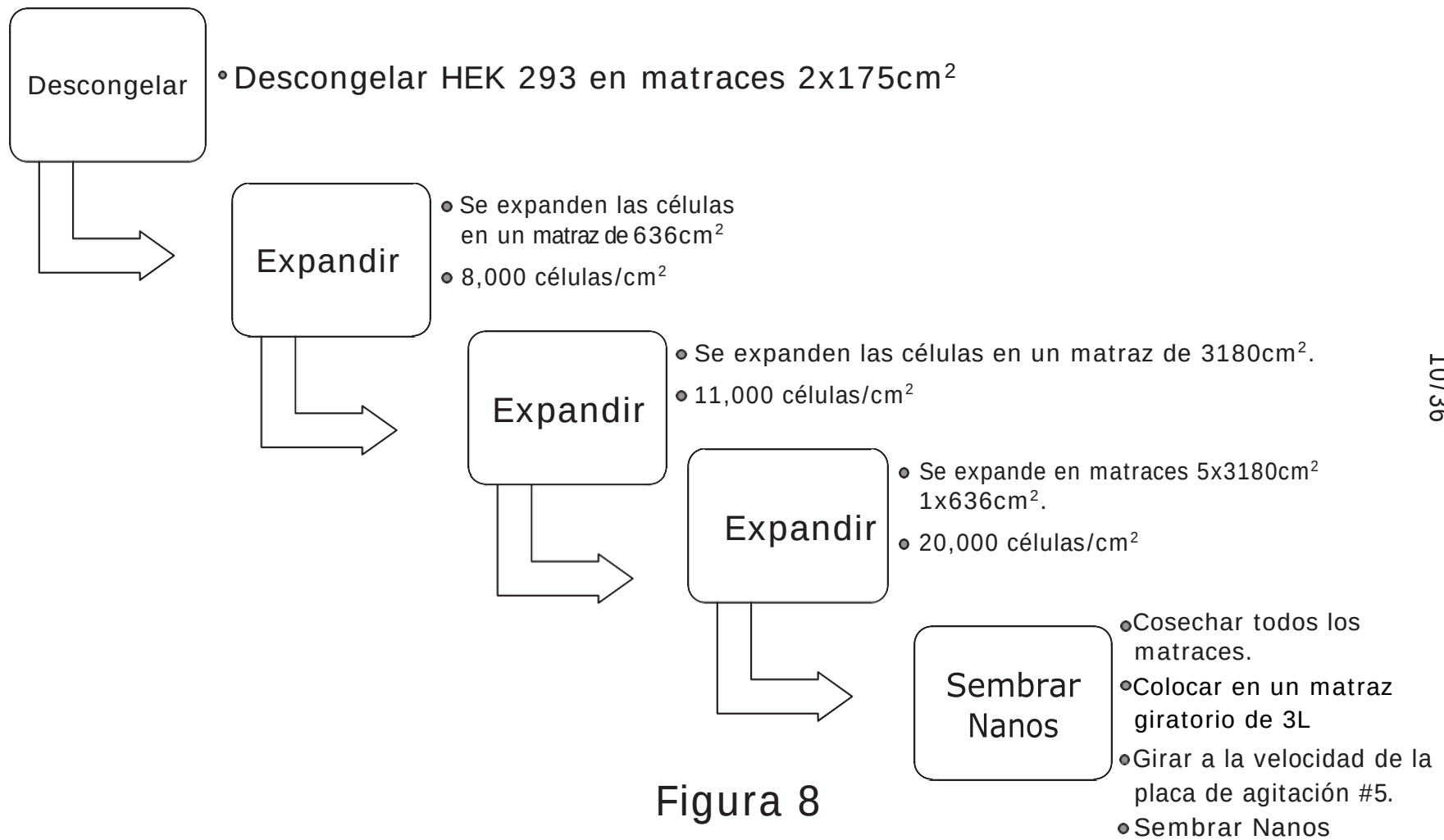
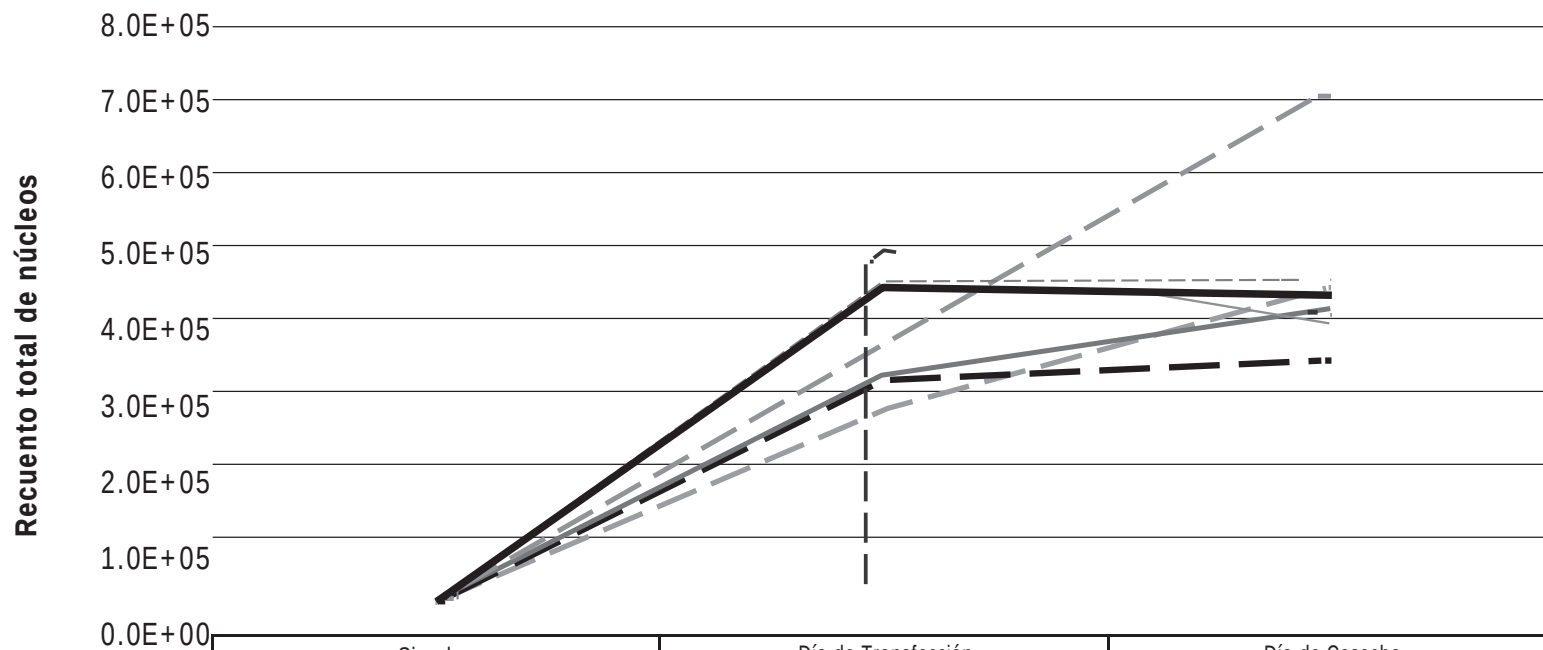


Figura 7





	Siembra	Día de Transfección	Día de Cosecha
221-12,000 (30 min)	8.0E+03	3.6E+05	7.10E+05
222-12,000 (30 min)	8.0E+03	3.2E+05	4.10E+05
223-8,000 (30 min)	8.0E+03	4.9E+05	3.90E+05
224-8,000 (30 min)*	8.0E+03	2.7E+05	4.40E+05
225-8,000 (1h)	8.0E+03	4.9E+05	4.00E+05
226-8,000 (1h)	8.0E+03	4.5E+05	4.5E+05
227-8,000 (2h)	8.0E+03	3.1E+05	3.40E+05
228-8,000 (2h)	8.0E+03	4.4E+05	4.30E+05

Día post siembra

Figura 9A

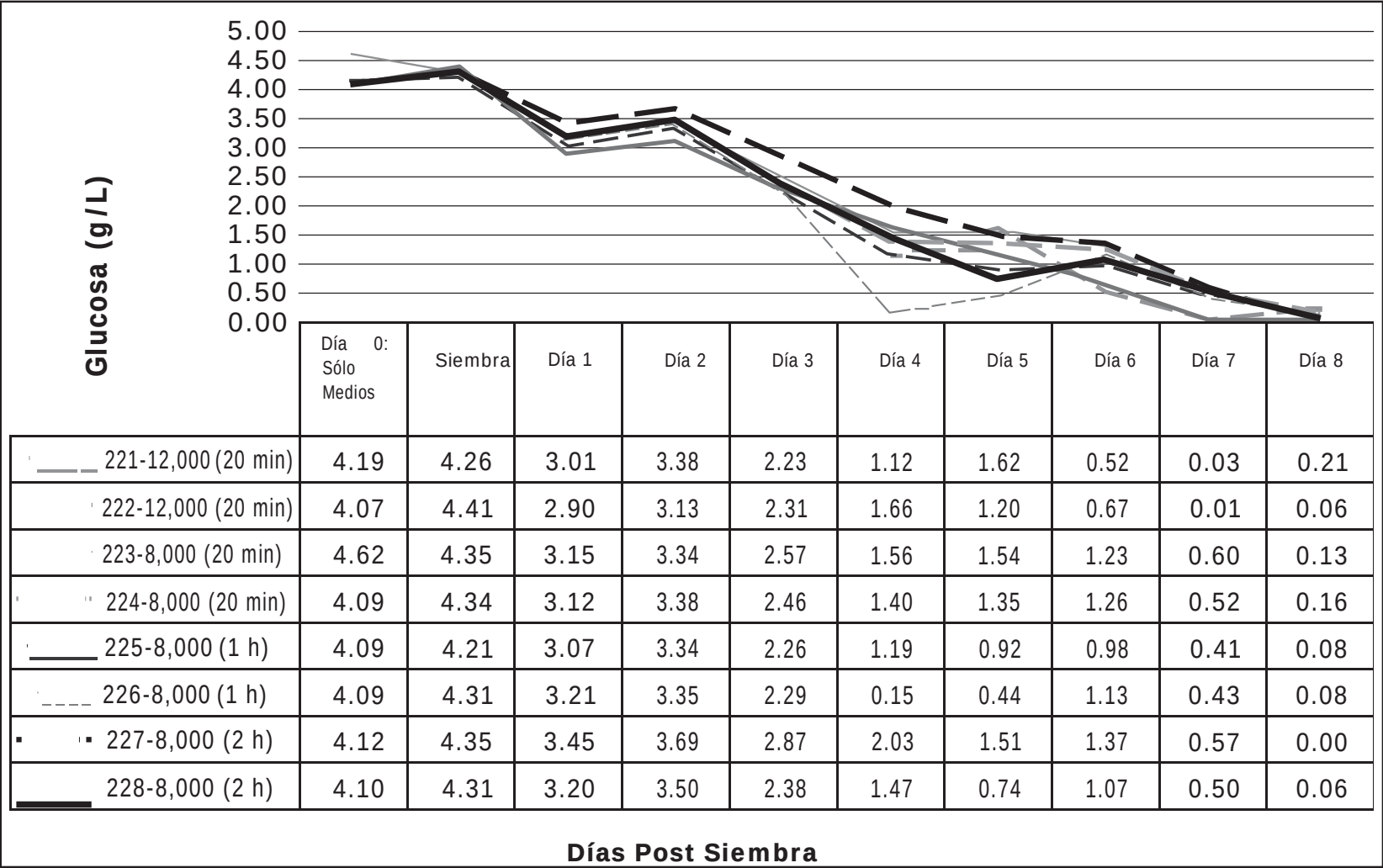


Figura 9B

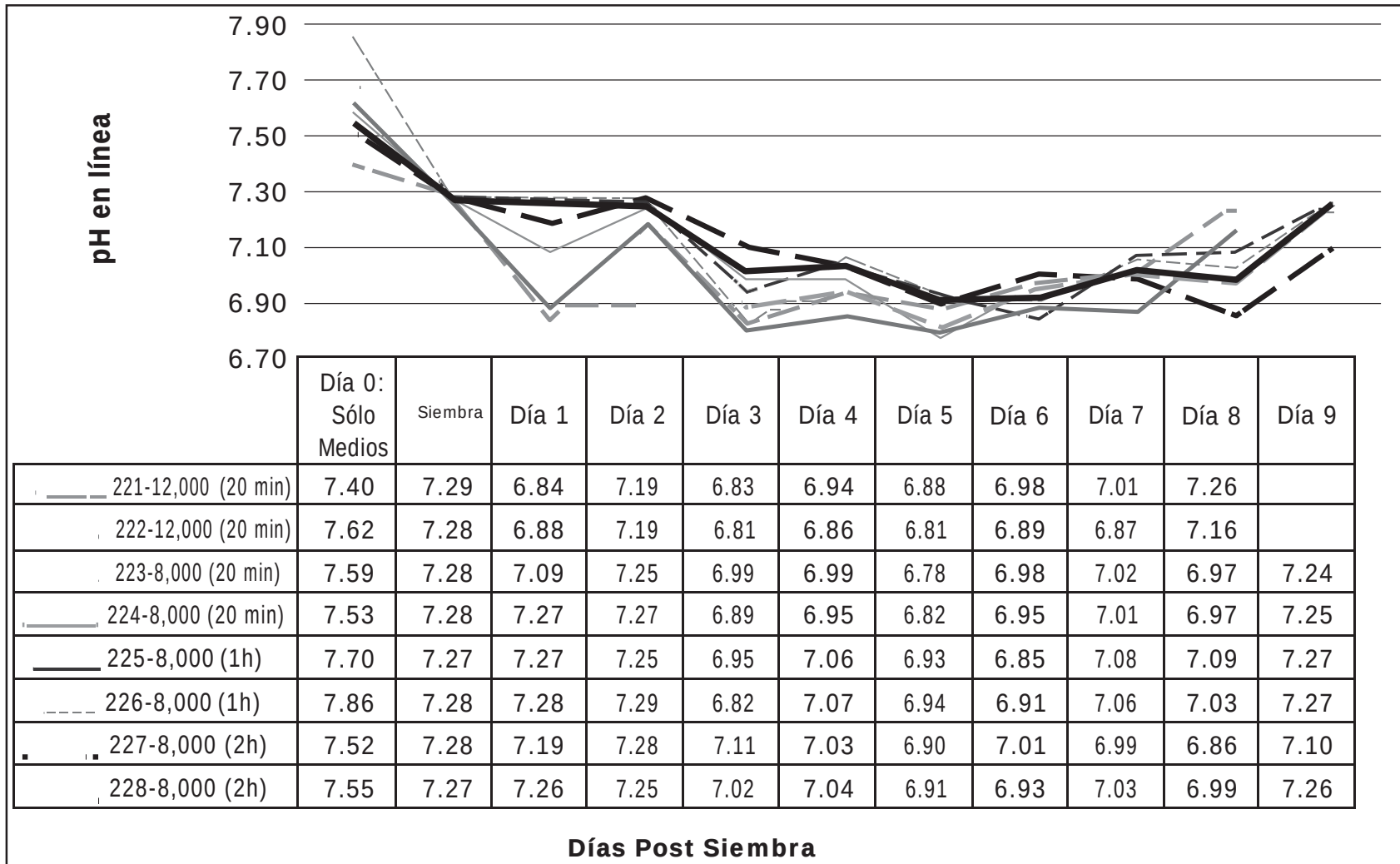


Figura 9C

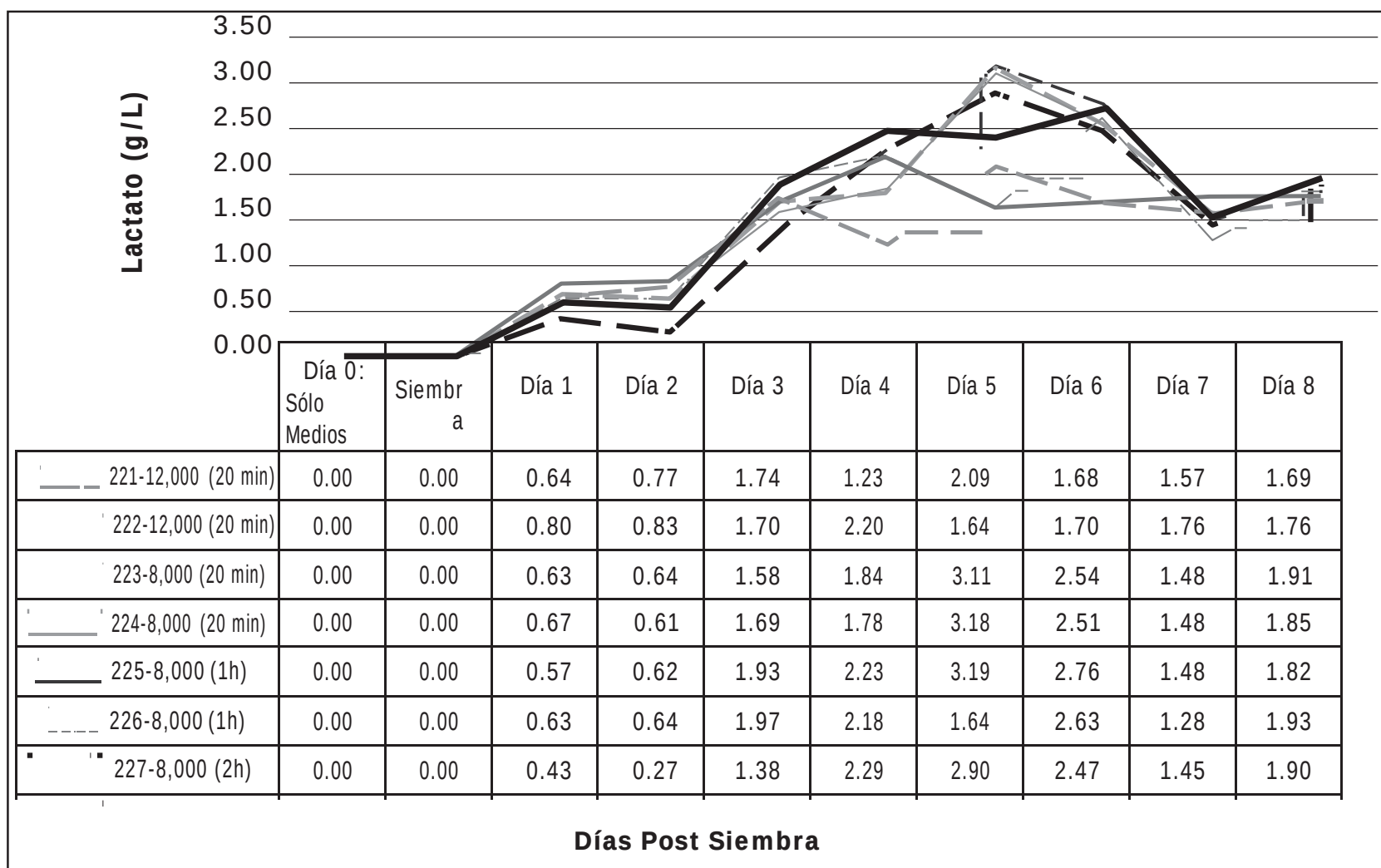


Figura 9D

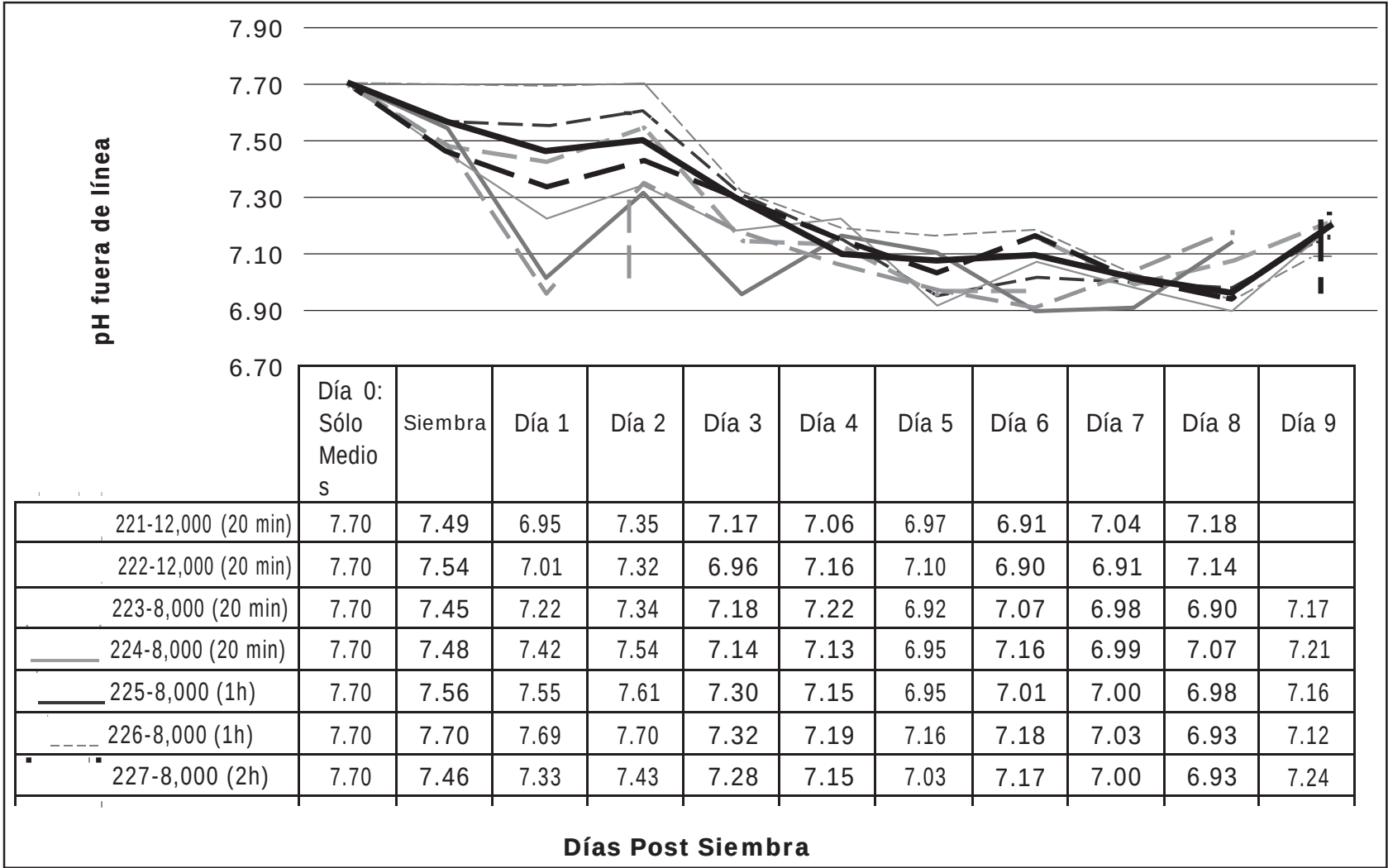


Figura 9E

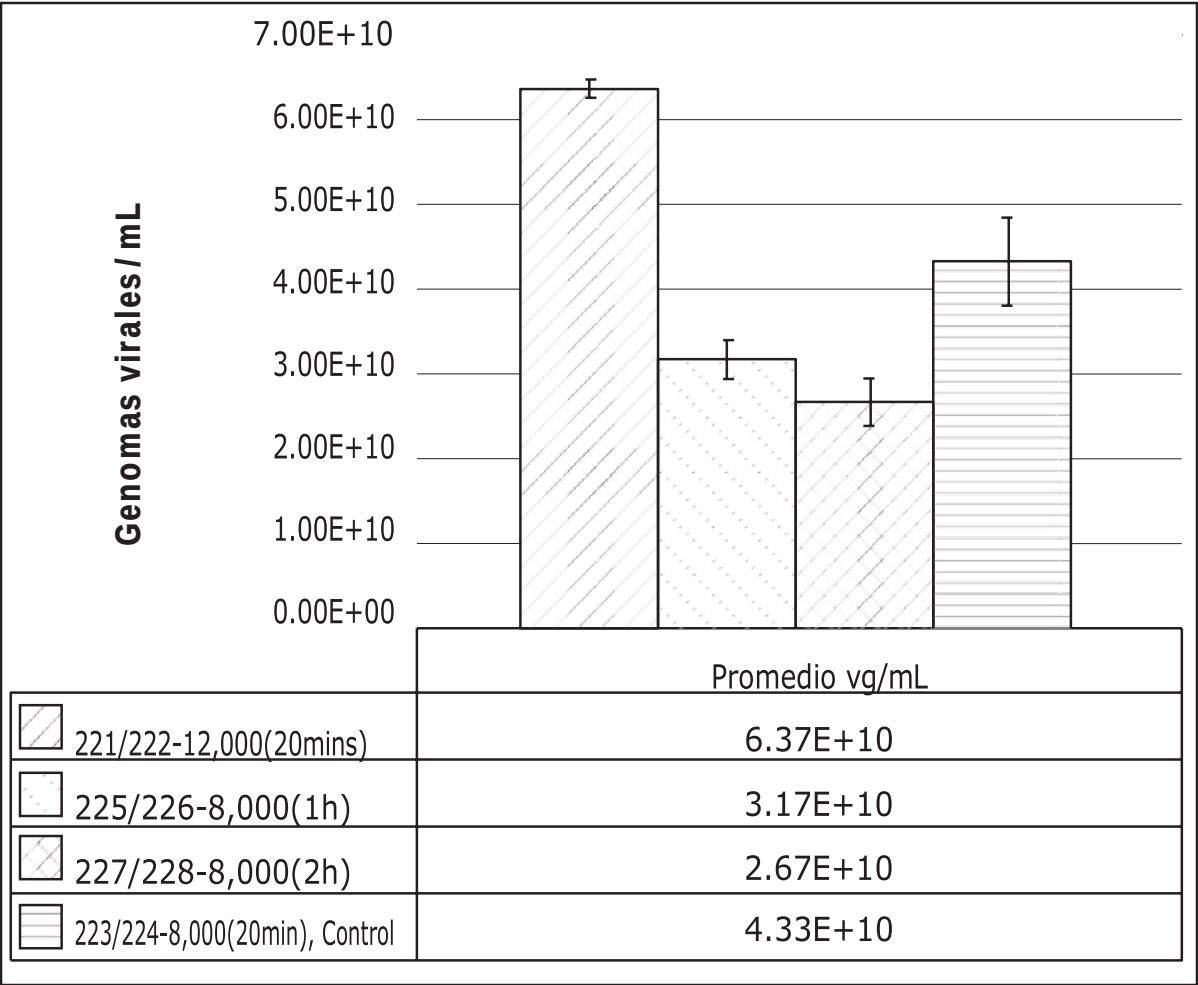


Figura 10

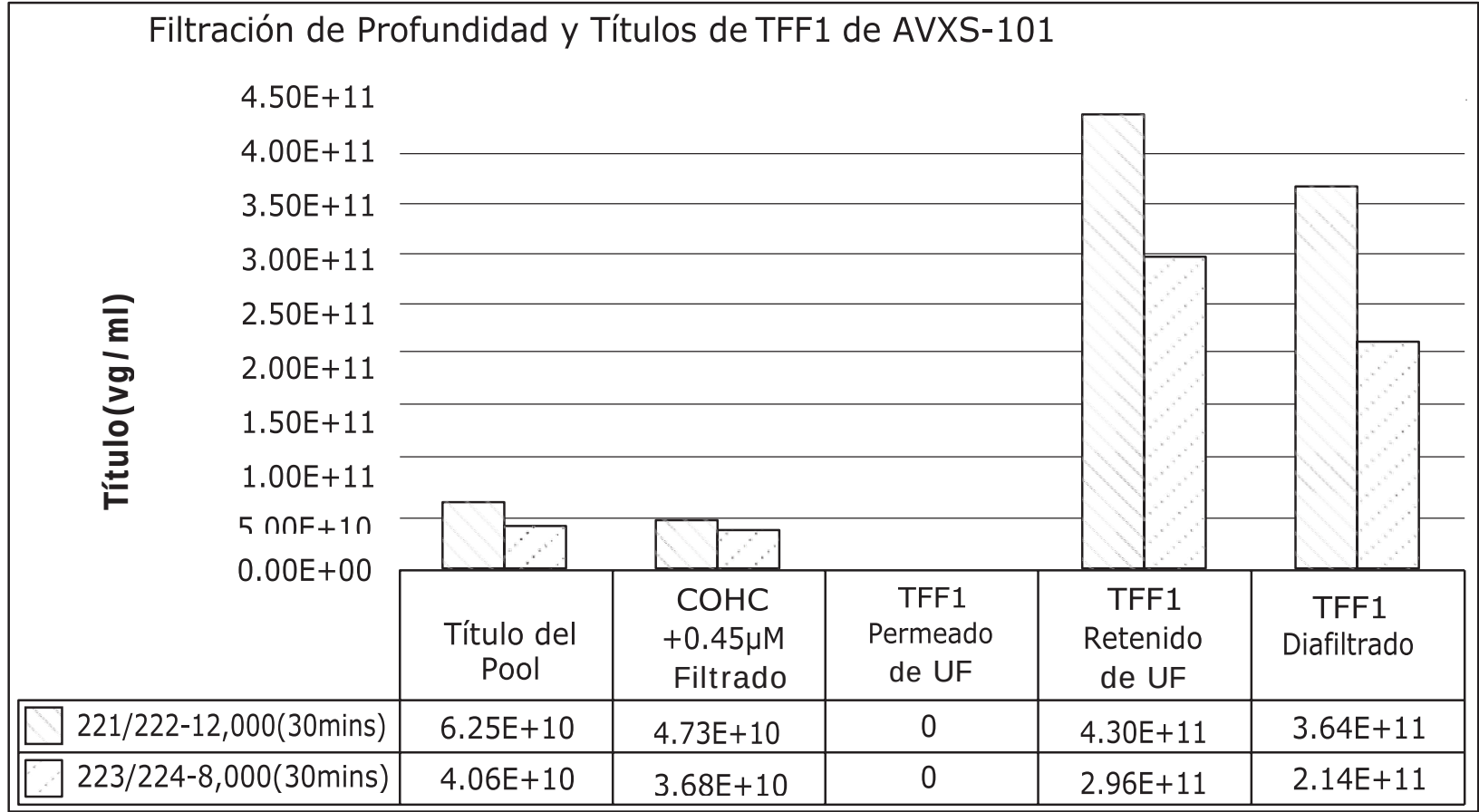


Figura 11

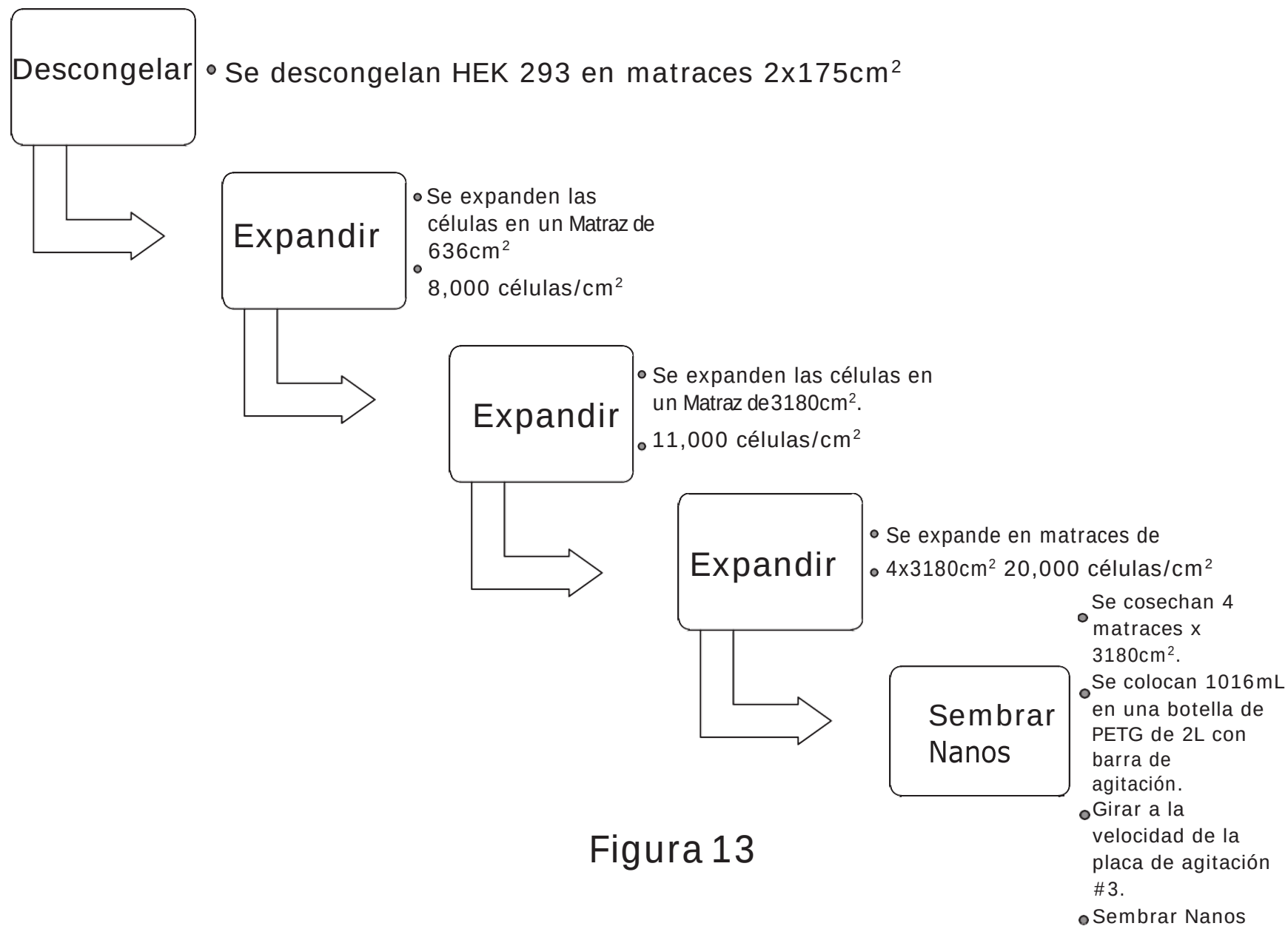
8,000 células/ cm2, Cosecha D5 Trans, D9						12,000 células/ cm2, Cosecha D4 Trans, D8					
	Volumen	Título	Total vg	Recuperación del paso	Recuperación total	Volumen	Título	Total vg	Recuperación del paso	Recuperación total	
Pool de Lisado	3200	4.06E+10	1.30E+14			3200	6.25E+10	2.00E+14			
post C0HC + 0.45	4000	3.68E+10	1.47E+14	113%	113%	4000	4.73E+10	1.89E+14	95%	95%	
TFF1 UF Retenido	400	2.96E+11	1.18E+14	80%	91%	400	4.30E+11	1.72E+14	91%	86%	
TFF1 DF Retenido	580	2.14E+11	1.24E+14	105%	96%	502	3.64E+11	1.83E+14	106%	91%	
TFF1 UF Permeado	3600	<4E8	1.44E+12	1%		3600	<4.0E8	1.44E+12	1%		

Figura 12A

18/36

8,000 células / cm², D5, Transfección, Cosecha D9						12,000 célula / cm², Transfección D4, Cosecha D8				
	Volumen	ug / m	Total HCP ug	Paso HCP Aclaramiento	Total HCP Aclaramiento	Volumen	ug / m	Total HCP ug	HCP Paso Aclaramiento	Total HCP Aclaramiento
Pool de Lisado	3200	L	216065			3200	L	186813		
		67.52					58.38			
post C0HC + 0.45	4000	49.47	197862	8.4%	8.42%	4000	35.25	140988	24.5%	24.53%
TFF1 UF Retenido	400	170.90	68358	65.5%	68.36%	400	120.09	48036	65.9%	74.29%
TFF1 DF Retenido	580	52.17	30261	55.7%	86%	502	17.48	8775	81.7%	95%
TFF1 UF Permeado	3600	29.50	106186	54%		3600	26.69	96080.4	68%	

Figura 12B



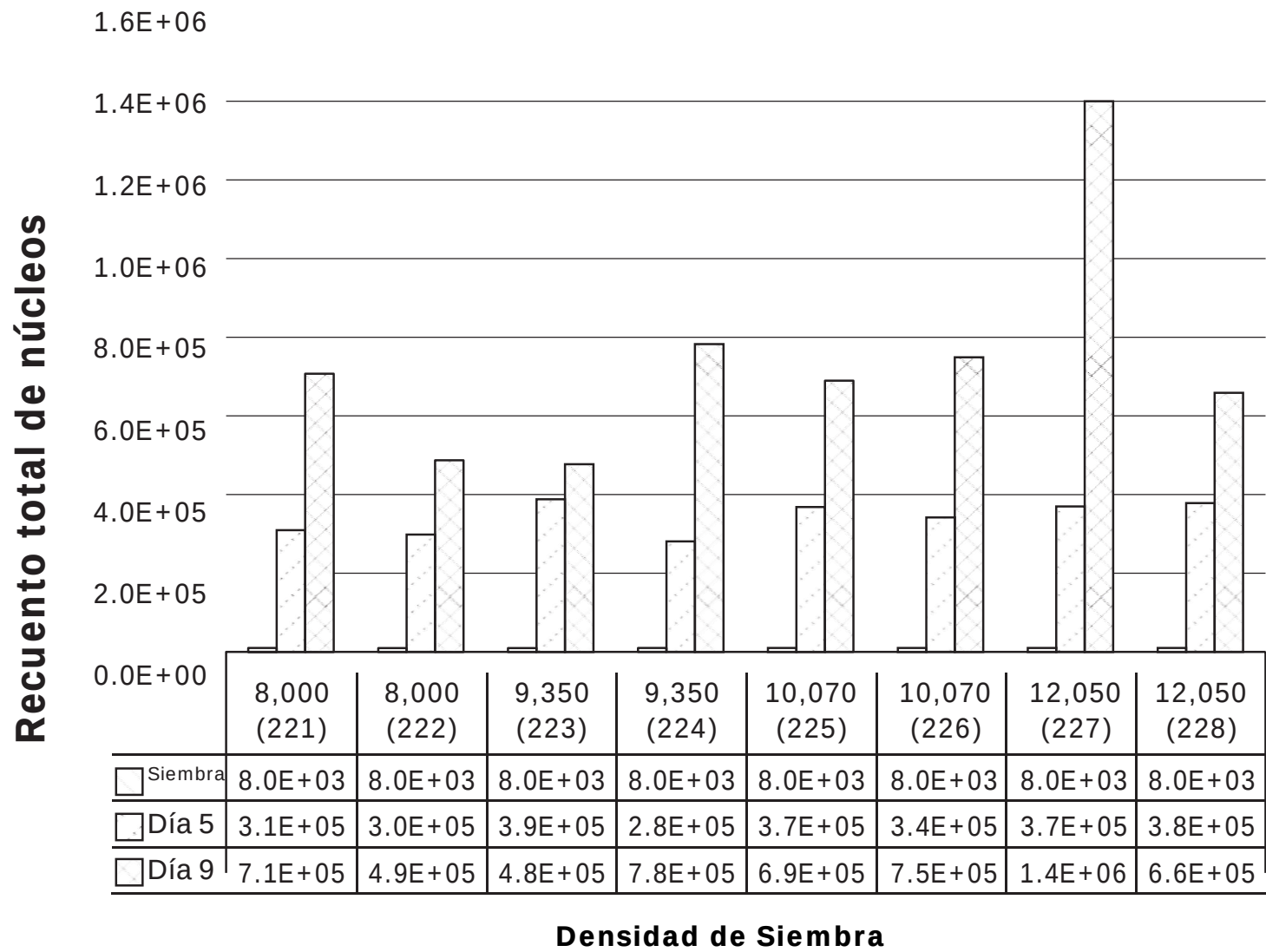
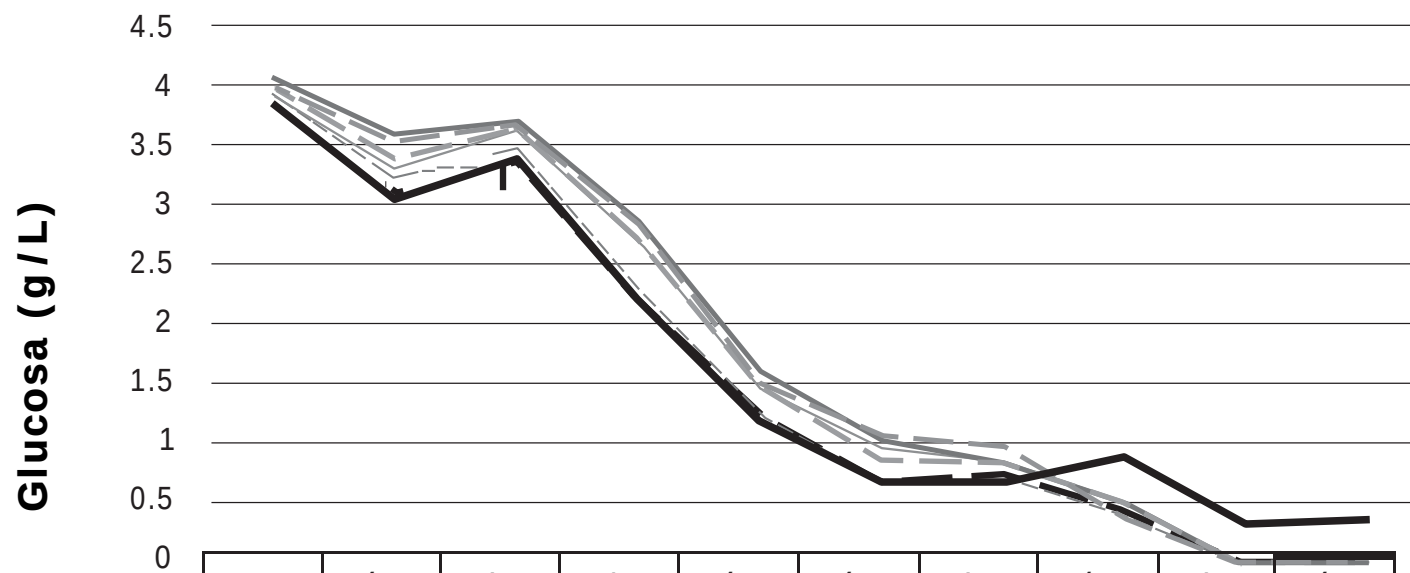


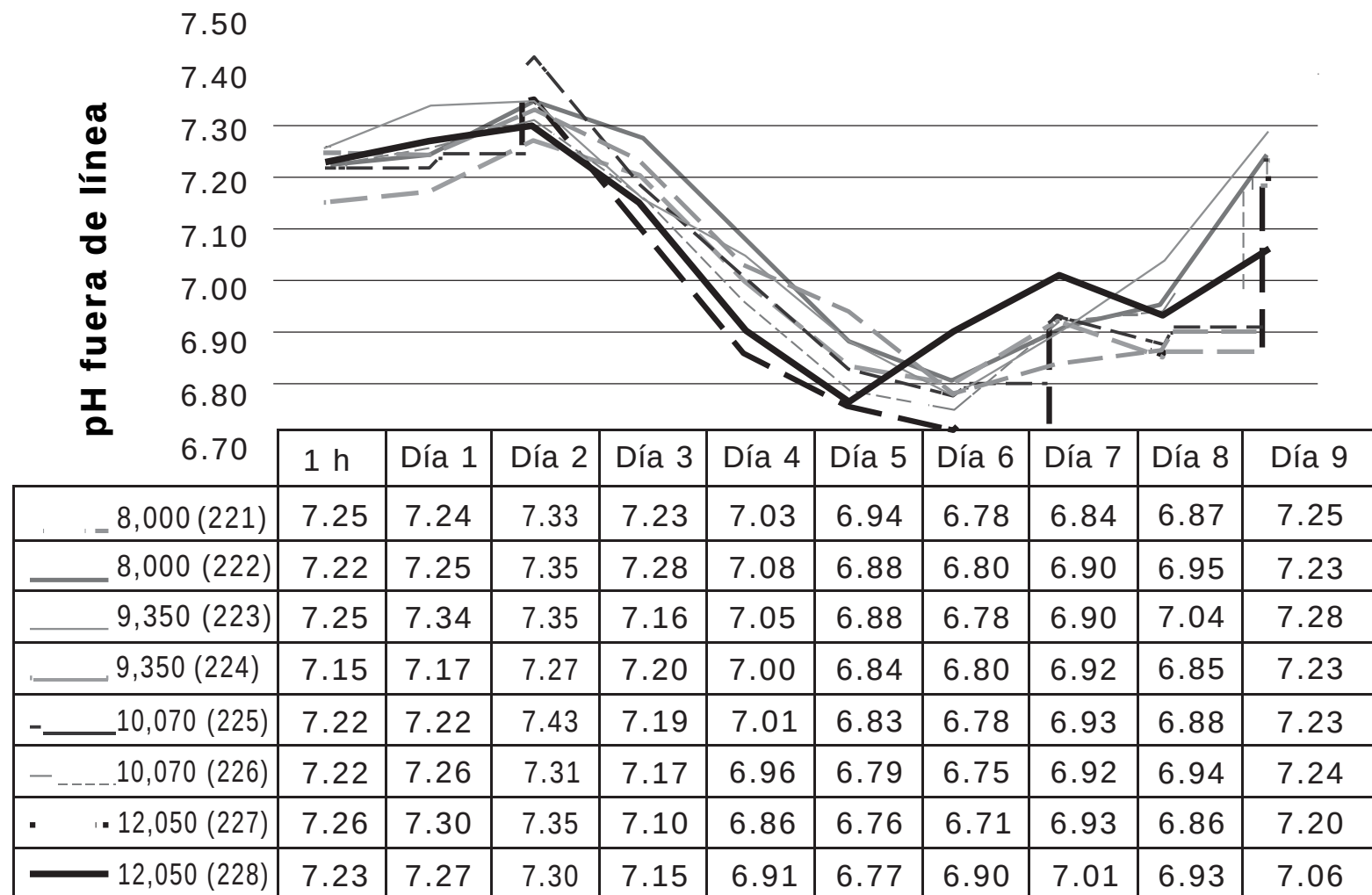
Figura 14A



	1 h	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
8,000 (221)	3.98	3.53	3.68	2.82	1.54	1.08	0.98	0.37	0	0
8,000 (222)	4.06	3.59	3.7	2.88	1.62	1.04	0.86	0.47	0	0
9,350 (223)	3.92	3.3	3.61	2.67	1.45	0.97	0.84	0.54	0	0
9,350 (224)	3.98	3.37	3.64	2.72	1.49	0.87	0.85	0.51	0	0
10,070 (225)	3.84	3.11	3.39	2.27	1.26	0.7	0.71	0.43	0	0
10,070 (226)	3.94	3.22	3.47	2.32	1.24	0.7	0.73	0.39	0	0
12,050 (227)	3.85	3.09	3.34	2.16	1.2	0.66	0.74	0.47	0	0
12,050 (228)	3.84	3.04	3.38	2.21	1.19	0.68	0.68	0.9	0.33	0.37

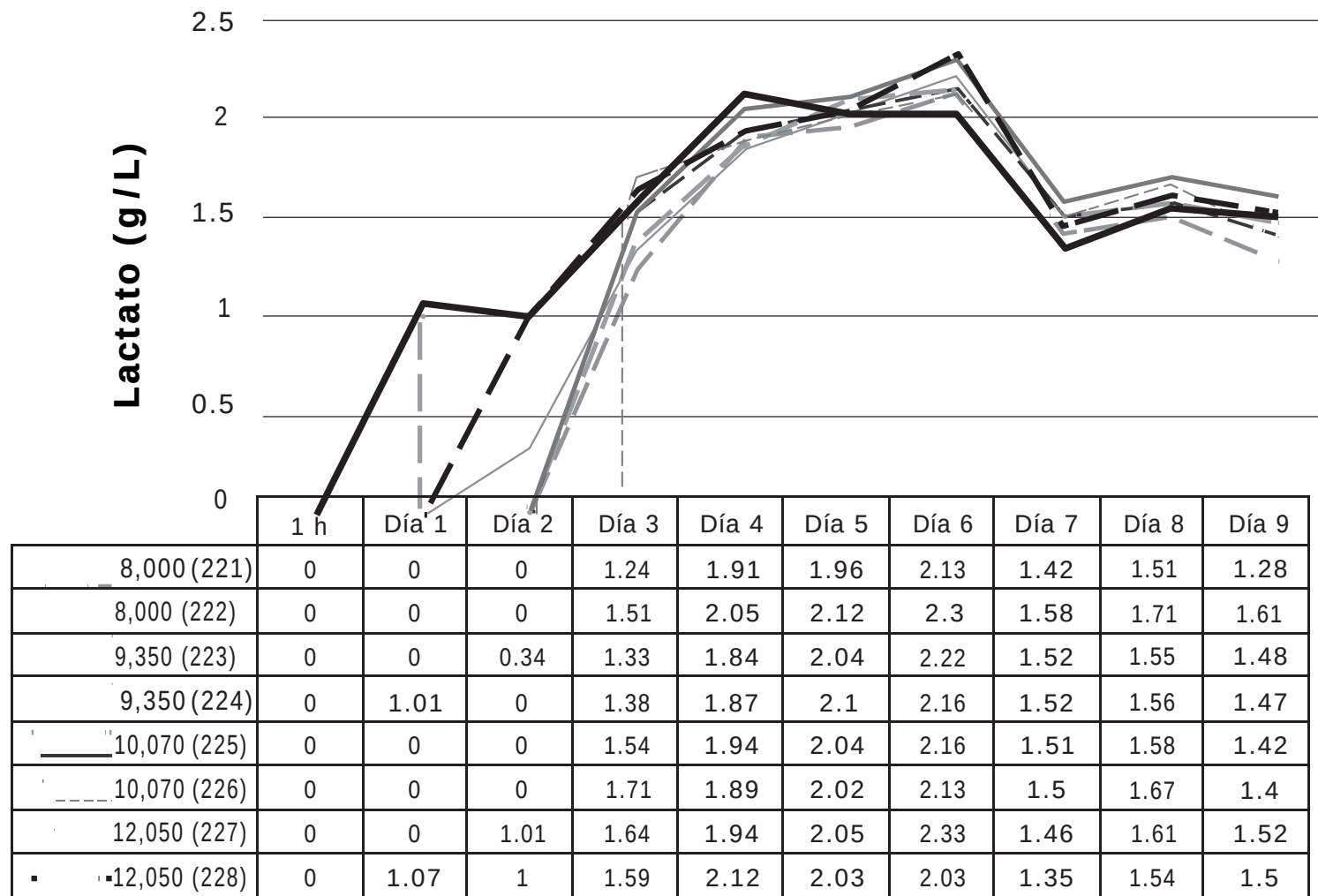
Días Post Siembra

Figura 14B



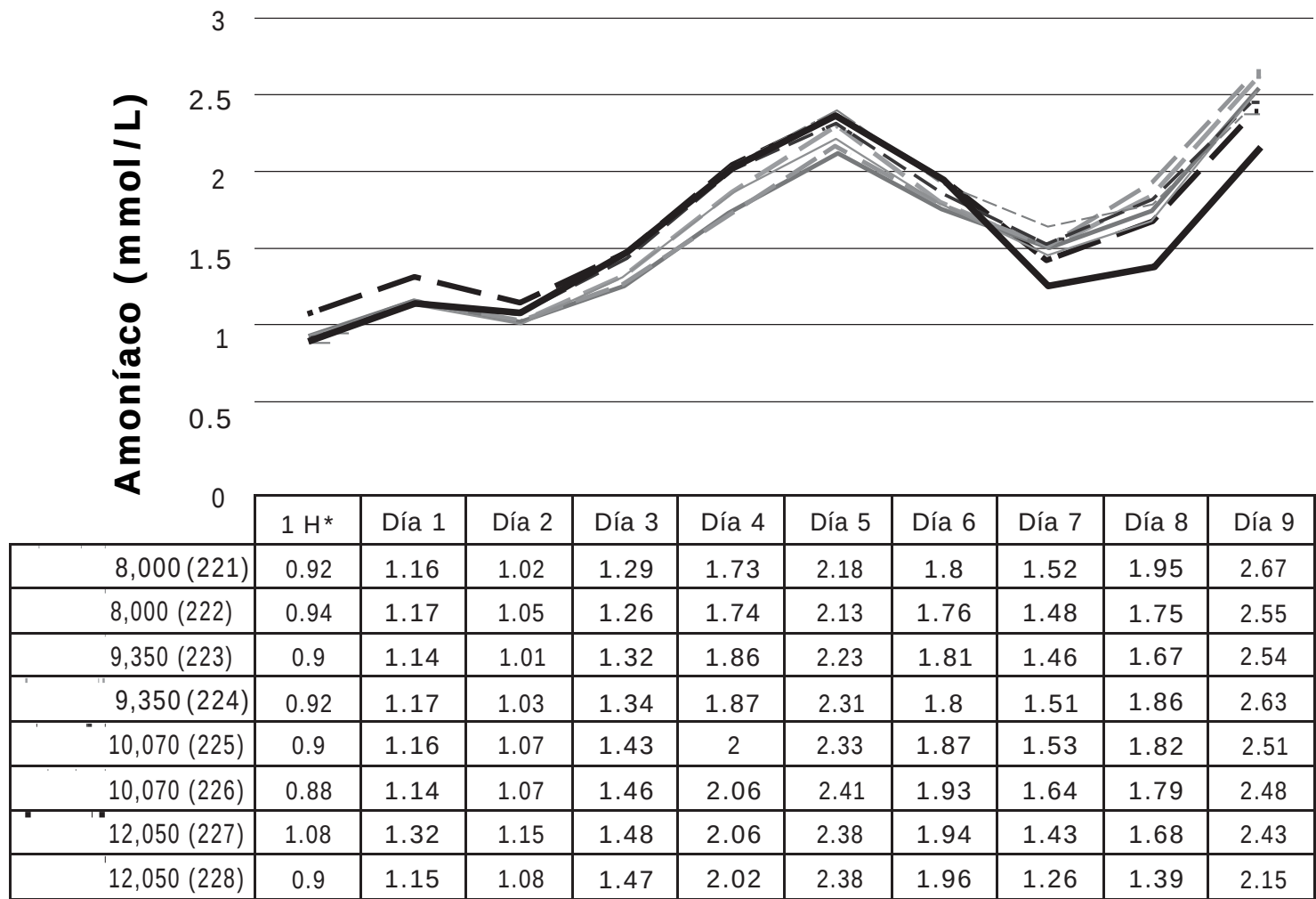
Días Post Siembra

Figura 14C



Días Post Siembra

Figura 14D



Días Post Siembra

Figura 14E

Genomas Virales / mL

5.00E+10

4.00E+10

3.00E+10

2.00E+10

1.00E+10

0.00E+00

	8,000	Células/cm ² (221)
	8,000	Células/cm ² (222)
	9,350	Células/cm ² (223)
	9,350	Células/cm ² (224)
	10,070	Células/cm ² (225)
	10,070	Células/cm ² (226)
	12,050	Células/cm ² (227)
	12,050	Células/cm ² (228)

vg/mL

3.88E+10

4.18E+10

3.35E+08

6.69E+08

4.22E+10

3.17E+10

3.18E+10

1.47E+10

25/36

Figura 15A

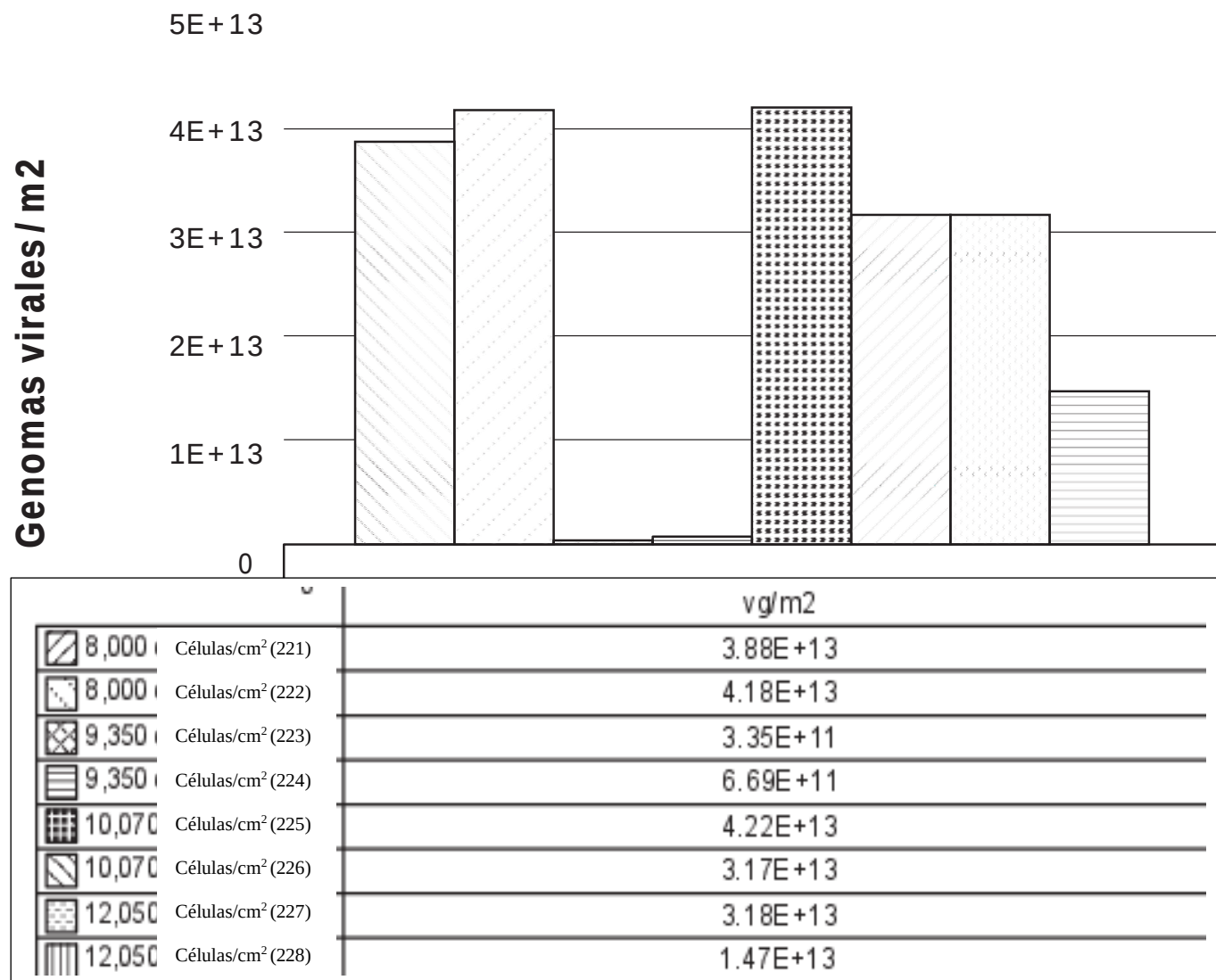


Figura 15B

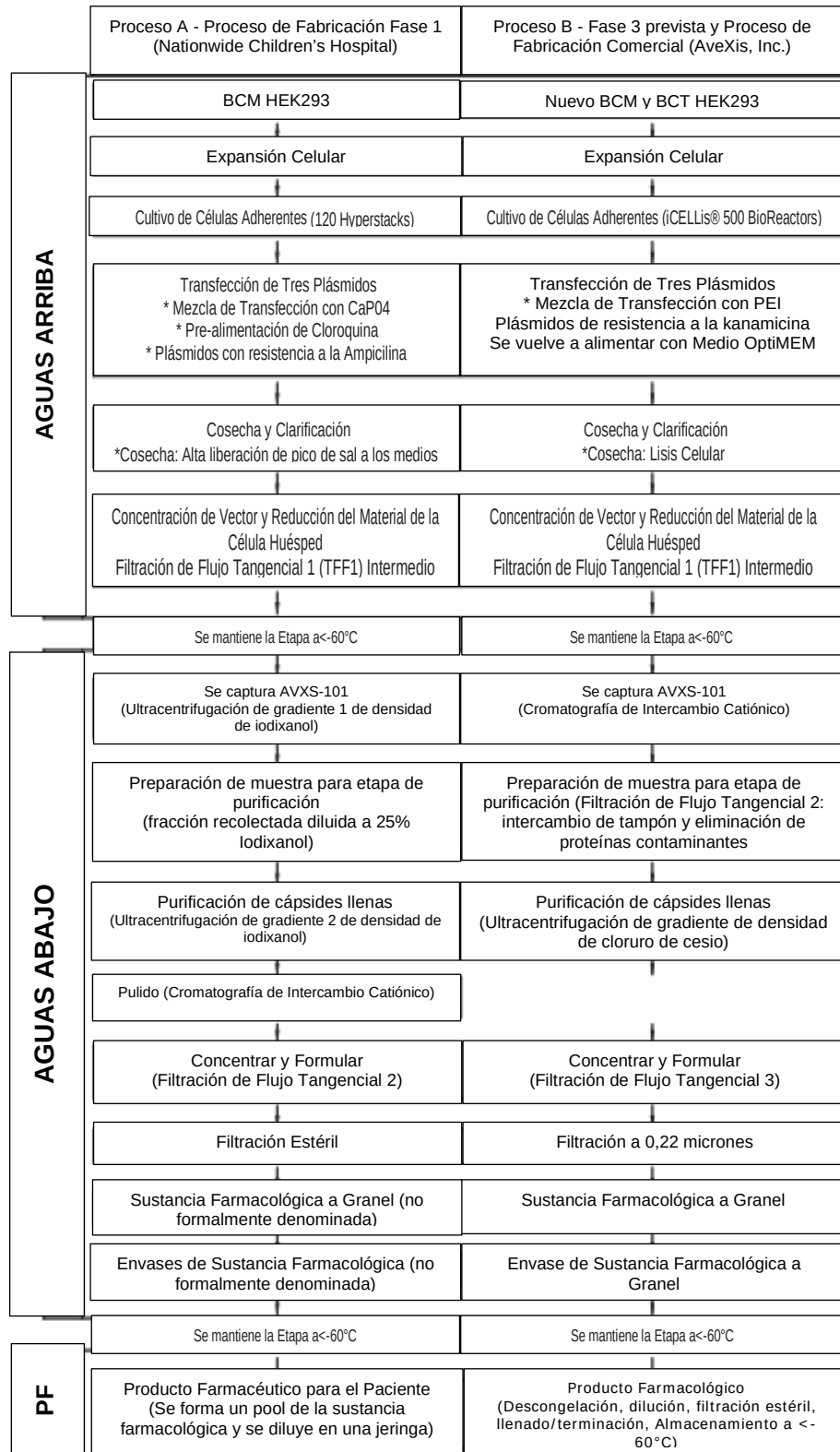


Figura 16

Descripción de la Prueba	Método de Prueba	Límite de Prueba Propuesto	NCH Fase 1 Lot NCHAAV9SMN0613	AVXS-101 Lot 600156	AVXS-101 Lot 600307
			Fecha de Fabricación: 18-Dec-2013 Fecha de Prueba 13-Feb-2017 al 08-Aug-2017 ⁽¹⁾	Fecha de Fabricación: 07-Nov-2017 Fecha de Prueba 08-Nov-2017 al 26-Dec-2017	Fecha de Fabricación: 04-Dec-2017 Fecha de Prueba 05-Dec-2017 al 30-Jan-2017
Título Genómico por ddPCR	SOP-137	2.0x10 ¹³ – 6.0x10 ¹³ vg/mL	1.1x10 ¹³ vg/mL (n=9) ⁽¹⁾	3.7x10 ¹³ vg/mL (n=9) ⁽²⁾	4.0x10 ¹³ vg/mL (n=14) ⁽²⁾
Título Infeccioso	SOP-192	Resultados del Informe	5.9x10 ⁹ IU/mL ⁽³⁾	1.3x10 ¹⁰ IU/mL ⁽³⁾	6.7x10 ⁹ IU/mL ⁽³⁾
Partículas Subvisibles	SOP-262	≤6000 partículas/env ≥10 μm ≤600 partículas/env ≥25 μm	≤22 partículas/env ≥10 μm ≤4 partículas/env ≥25 μm	≤119 partículas/env ≥10 μm ≤4 partículas/env ≥25 μm	≤9 partículas/env ≥10 μm ≤2 partículas/env ≥25 μm
pH	SOP-057	7.5 – 8.5	7.9	7.9	8.0
Osmolalidad	SOP-128	384 448 mOsm/kg	410 mOsm/kg	415 mOsm/kg	410 mOsm/kg
Aspecto por Inspección Visual	SOP-164	Solución clara a ligeramente opaca, incolora a blanca pálida, libre de partículas visibles	Solución transparente e incolora, libre de partículas visibles	Blanca pálida, ligeramente opaca, libre de partículas visibles ⁽⁴⁾	Incolora, ligeramente opaca, libre de partículas visibles.
Total de Proteína por BCA	SOP-184	128 – 320 μg/mL por 10k10 ¹³ vg/mL	167 μg/mL ⁽³⁾ (177 μg/mL) ⁽⁵⁾	179 μg/mL ⁽³⁾ (661 g/mL) ⁽⁵⁾	176 μg/mL ⁽³⁾ (702 μg/mL) ⁽⁵⁾
ADNhc residual por qPCR	SOP-190	1.2x10 ⁶ pg/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	3.7 x10 ⁵ pg/mL ⁽³⁾ (3.9 x 10 ⁵ pg/mL) ⁽⁵⁾	0.76 x10 ⁵ pg/mL ⁽³⁾ (2.8 x 10 ⁵ pg/mL) ⁽⁵⁾	0.68 x10 ⁵ pg/mL ⁽³⁾ (2.72 x 10 ⁵ pg/mL) ⁽⁵⁾
% de Cápsides Vacías por AUC	SOP-263	≤ 7%	7%	2%	4%
ID de vector por SDSPAGE	SOP-180	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con control de AVXS-101	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con control de AVXS-101 <u>PM de las bandas:</u> VP1: 84.9-89.5 kDa VP2: 65.9-69.1 kDa VP3: 57.1-59.0 kDa	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con control de AVXS-101 <u>PM de las bandas:</u> VP1: 83.6-84.4 VP2: 64.6-65.5 VP3: 56.2-57.2	Las Bandas Principales de VP1, VP2, VP3 co-migran con control de AVXS-101 <u>PM de las bandas:</u> VP1: 82.9-84.9 VP2: 64.3-65.2 VP3: 56.0-56.7
Pureza por SDS-PAGE	SOP-180	% de Pureza Total (VP1, VP2, VP3): 95% ⁽¹⁾	% de Pureza Total: 99% (Promedio n=4 gels)	% de Pureza Total: 99% (Promedio, n=4 gels)	% de Pureza Total: 99% (Promedio, n=4 gels)

Figura 17A

Descripción de la Prueba	Método de Prueba	Límite de Prueba Propuesto	NCH Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613 Fecha de Fabricación: 18-Dic-2013 Fecha de Prueba 13-Feb-2017 al 08-Ago-2017 (1)	AVXS-101 Lote 600156 Fecha de Fabricación: 07-Nov-2017 Fecha de Prueba 08-Nov-2017 al 26-Dic-2017	AVXS-101 Lote 600307 Fecha de Fabricación: 04-Dic-2017 Fecha de Prueba 05-Dic-2017 al 30-Ene-2017
Impurezas totales por SDS-PAGE	SOP-180	% Total de Impurezas 5% Ninguna impureza sin identificar >2% <u>Impurezas Identificadas</u> <u>Valor reportado</u> - Imp 1A (~71-73kDa) - Imp 1 (~61-67 kDa) - Imp 2 (~56-64 kDa) - Imp 3 (~48-58 kDa) - Imp 4 (~33-38 kDa) - Imp 5 (~30-34 kDa)	% Total de Impurezas: 2% (Promedio n=4gels) <u>Impurezas Individuales</u> <u>(Promedio n=4 gels)</u> - Imp 1: 1.5% - Imp 3: <LOQ (1.0%)	% Total de Impurezas: 1% (Promedio n=4gels) <u>Impurezas Individuales</u> <u>(Promedio n=4 gels)</u> - Imp 1: <LOQ (1.0%) - Imp 3: <LOQ (1.0%) - Imp 4: <LOQ (1.0%)	% Total de Impurezas: 1% (Promedio n=4gels) <u>Impurezas Individuales</u> <u>(Promedio n=4 gels)</u> - Imp 1: 1.0% - Imp 4: <LOQ (1.0%)
Identidad del Vector por Western	SOP-179	Positivo para Proteína de Cápside de AAV	Positivo para Proteína de Cápside de AAV PM Banda Principal VP1: 79.7 kDa VP2: 64.1 kDa VP3: 55.7 kDa	Positivo para Proteína de Cápside de AAV PM Banda Principal VP1: 80.2 kDa VP2: 66.2 kDa VP3: 58.2 kDa	Positivo para Proteína de Cápside de AAV PM Banda Principal VP1: 79.1 kDa VP2: 64.8 kDa VP3: 57.5 kDa
PCH Residual por ELISA	SOP-183	≤40 ng/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	< LOQ (8 ng/mL) (5)	< LOQ (8 ng/mL) (5)	< LOQ (8 ng/mL) (5)
Identidad de Genoma de Vector por ddPCR	SOP-137	Confirma	Confirma	Confirma	Confirma
BSA Residual por ELISA	SOP-181	≤3.0 ng/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	< LOQ (0.50 ng/mL) (5)	< LOQ (0.50 ng/mL) (5)	< LOQ (0.50 ng/mL) (5)
Benzonase Residual por ELISA	SOP-182	≤1.0 ng/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	< LOQ (0.20 ng/mL) (5)	< LOQ (0.20 ng/mL) (5)	< LOQ (0.20 ng/mL) (5)
Potencia Relativa In-vivo	SOP-285	80 – 120%	100% (6)	97%	96%

Figura 17B

1. NCH Fase 1 Lote AAV9SMN0613 fue fabricado antes del “Límite de Prueba Propuesto” actual para título genómico por ddPCR. El valor del título genómico para este lote se restableció en agosto de 2017 utilizando SOP-137 (v3) mejorado.
2. Las diferencias en los resultados del título genómico entre los lotes de Proceso A y Proceso B se deben a diferentes concentraciones objetivo de fabricación. El lote NCH AAV9SMN0613 se formuló originalmente con una concentración de título objetivo más baja que ahora se determinó en $1,1 \times 10^{13}$ vg/ml mediante el ensayo de ddPCR utilizado actualmente (SOP-137), mientras que los lotes AVXS-101 600156 y 600307 se formularon con una concentración de título objetivo de $4,0 \times 10^{13}$ vg/ml medida por el mismo método (SOP-137).
3. Resultado ajustado por 1.0×10^{13} vg/mL para permitir especificaciones apropiadas en el rango de concentraciones aceptables de 2.0×10^{13} vg/mL a 6.0×10^{13} vg/mL. Los valores reales se han multiplicado por los siguientes factores para proporcionar valores por 1.0×10^{13} vg/mL: 1/1.06 (Lote NCH AAV9SMN0613), 1/3.7 (Lote 600156) y 1/4.0 (Lote 600307).
4. Las diferencias en los resultados de aspecto entre el Proceso A y el Proceso B se deben a diferentes concentraciones de vectores (título genómico). El lote NCH AAV9SMN0613 tiene una concentración de vector significativamente menor que los lotes del Proceso B. Como resultado, el lote NCH AAV9SMN0613 es más diluido, lo que lleva a una solución más clara e incolora, mientras que las observaciones de incolora a blanca y ligeramente opaca para los lotes del Proceso B son el resultado de una concentración de partículas virales en solución casi 4 veces mayor por ml.
5. El resultado real no se ajustó a 1.0×10^{13} vg/mL dado que los resultados están por debajo de límite de cuantificación de los métodos respectivos.
6. El lote NCHAAV9SMN0613 está designado como el Estándar de referencia de potencia inicial para SOP-285 con un valor de potencia asignado del 100%. Todos los resultados se generaron usando SOP-285 v5.

Figura 17B (cont.)

Descripción de la Prueba	Límite de Prueba Propuestos	Comparación Por Pares		
		Proceso A (Fase 1)	Proceso B (Fase 3)	Diferencia Relativa %
Título Genómico por ddPCR	2.0x10 ¹³ - 6.0x10 ¹³ vg/mL	1.1x10 ¹³ vg/mL	3.7x10 ¹³ vg/mL	NA ⁽¹⁾
Título Infeccioso	Resultados del Informe	0.59x10 ¹⁰ IU/mL	1.3x10 ¹⁰ IU/mL	120% ⁽²⁾
Partículas Subvisibles ≥ 10 μm	≤ 6000 partículas /envase ≥ 10 μm	22	119	441% ⁽³⁾
Partículas Subvisibles ≥ 25 μm	≤ 6000 partículas /envase ≥ 25 μm	4	4	0%
pH	7.5 - 8.5	7.9	7.9	0%
Osmolalidad	384 - 448 mOsm/kg	410 mOsm/kg	415 mOsm/kg	1%
Aspecto	Solución clara a ligeramente opaca, incolora a blanca pálida, libre de partículas visibles	Solución transparente e incolora, libre de partículas visibles	Blanca pálida, ligeramente opaca, libre de partículas visibles	NA
Total de Proteína por BCA	128 - 320 μg/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	167 μg/mL	179 μg/mL	7%
ADNhc residual por qPCR	≤ 1.2x10 ⁶ pg/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	3.7x10 ⁵ pg/mL	0.76x10 ⁵ pg/mL	80%
% de Cápsides Vacías por AUC	≤ 7%	7%	2%	71% ⁽⁴⁾
Pureza por SDS-PAGE	≥ 95%	98%	99%	1%
Impurezas totales por SDS-PAGE	≤ 5%	2%	1%	50%
PCH Residual por ELISA	≤ 40 ng/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	< LOQ (8 ng/mL)	< LOQ (8 ng/mL)	0%
BSA Residual por ELISA	≤ 3.0 ng/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	< LOQ (0.50 ng/mL)	< LOQ (0.50 ng/mL)	0%
Benzonase Residual por ELISA	≤ 1.0 ng/mL por 1.0x10 ¹³ vg/mL	< LOQ (0.20 ng/mL)	< LOQ (0.20 ng/mL)	0%
Potencia Relativa In-vivo	80 - 120%	100%	97%	3%

1. El % de diferencia relativa no es aplicable ya que el objetivo de fabricación para el título genómico se modificó entre el Proceso A y el Proceso B.

2. Este valor debe verse en el contexto de la variabilidad esperada para un ensayo biológico que a menudo puede variar entre 50% y 200% del valor verdadero. Dicho esto, AveXis reconoció la necesidad de mejorar y recientemente ejecutó un trabajo adicional de desarrollo y calificación para mejorar este ensayo (SOP-328 y RPT-471). También debe tenerse en cuenta que la eficiencia de infectividad de la línea celular HeLa RC32 por vectores virales a base de AAV9 sigue siendo un desafío.

3. Se observa una considerable diferencia relativa en % para las partículas subvisibles entre el Proceso A y el Proceso B; sin embargo, el valor absoluto para el Proceso B está muy por debajo de los límites de prueba propuestos.

4. El Proceso B que usa el gradiente de CsCl es más efectivo para eliminar las cápsides vacías en comparación con el Proceso A que usó iodixanol.

Figura 18

Descripción de la Prueba	Límite de Prueba Propuestos	Comparación Por Pares		
		Proceso B (600156)	Proceso B (600307)	Diferencia Relativa %
Título Genómico por ddPCR	$2.0 \times 10^{13} - 6.0 \times 10^{13}$ vg/mL	3.7×10^{13} vg/mL	4.0×10^{13} vg/mL	8%
Título Infeccioso	Resultados del Informe	1.3×10^{10} IU/mL	0.67×10^{10} IU/mL	48%
Partículas Subvisibles $\geq 10 \mu\text{m}$	≤ 6000 partículas/envase $\geq 10 \mu\text{m}$	119	9	92% ⁽¹⁾
Partículas Subvisibles $\geq 25 \mu\text{m}$	≤ 600 partículas/envase $\geq 25 \mu\text{m}$	4	2	50%
pH	7.5 – 8.5	7.9	8.0	1%
Osmolalidad	384 448 mOsm/kg	415 mOsm/kg	410 mOsm/kg	1%
Aspecto	Solución clara a ligeramente opaca, incolora a blanca pálida, libre de partículas visibles	Blanca pálida, ligeramente opaca, libre de partículas visibles	Incolora, ligeramente opaca, libre de partículas visibles	ND
Total de Proteína por BCA	$128 - 320 \mu\text{g/mL}$ por 1.0×10^{13} vg/mL	$179 \mu\text{g/mL}$	$176 \mu\text{g/mL}$	2%
ADNhc residual por qPCR	$\leq 1.2 \times 10^6$ pg/mL por 1.0×10^{13} vg/mL	0.76×10^5 pg/mL	0.68×10^5 pg/mL	11%
% de Cápsides Vacías por AUC	$\leq 7\%$	2%	4%	100% ⁽¹⁾
Pureza por SDS-PAGE	$\geq 95\%$	99%	99%	0%
Impurezas totales por SDS-PAGE	$\leq 5\%$	1%	1%	0%
PCH Residual por ELISA	$\leq 40 \text{ ng/mL}$ por 1.0×10^{13} vg/mL	<LOQ(8ng/mL)	<LOQ(8ng/mL)	0%
BSA Residual por ELISA	$\leq 3.0 \text{ ng/mL}$ por 1.0×10^{13} vg/mL	< LOQ (0.50 ng/mL)	< LOQ (0.50 ng/mL)	0%
Benzonase Residual por ELISA	$\leq 1.0 \text{ ng/mL}$ por 1.0×10^{13} vg/mL	< LOQ (0.20 ng/mL)	< LOQ (0.20 ng/mL)	0%
Potencia Relativa In-vivo	80 – 120%	97%	96%	1%

¹ El % de diferencia relativa para las partículas subvisibles y el% de cápsides vacías es ~ 100% entre los dos lotes del Proceso B; sin embargo, todos los valores están muy por debajo de los límites de prueba propuestos y los lotes del Proceso B se consideran consistentes con respecto a estos resultados de prueba.

Figura 19

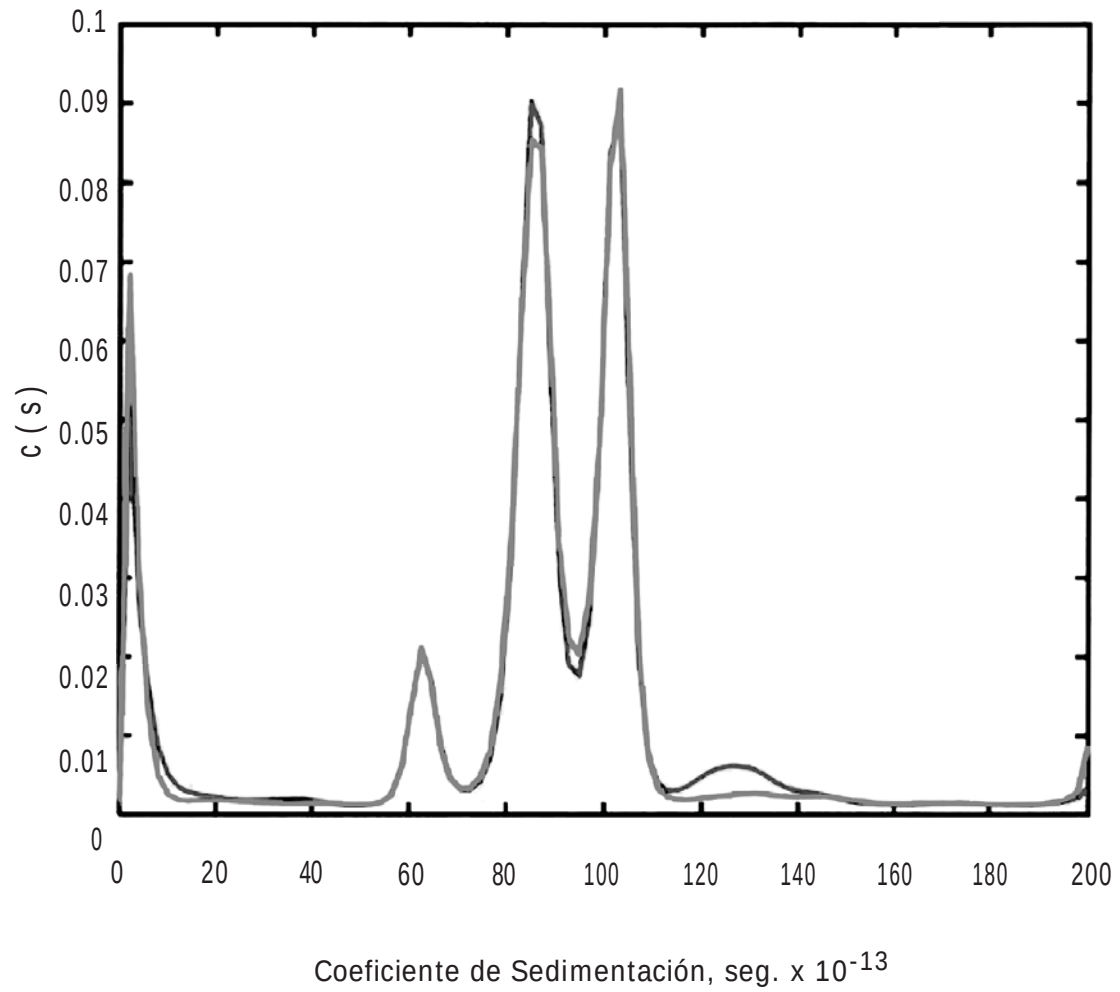
Atributo	Método	Punto de Tiempo de Estabilidad (meses)				
		0	3	6	9	12
		Febrero 2017	Mayo 2017	Agosto 2017	Noviembre 2017	Febrero 2018
Título Genómico por ddPCR	SOP-137 v1.0	6.6x10 ¹² vg/mL	6.1x10 ¹² vg/mL	6.5x10 ¹² vg/mL	ND	ND
	SOP-137 v3.0	N/D	N/D	1.1x10 ¹³ vg/mL ⁽¹⁾	8.7x10 ¹² vg/mL	Objetivo 26Feb18
Potencia relativa in vivo ⁽²⁾	SOP-285	100%	92%	95%	101%	Pendiente
Título Infeccioso	SOP-192	6.3x10 ⁹ IU/mL	8.4x10 ⁹ IU/mL ⁽³⁾	1.1x10 ¹⁰ IU/mL	6.3x10 ⁹ IU/mL	Pendiente
Pureza por SDS-PAGE	SOP-180	% de Pureza Total: 98% (n=4 gels) % Total de Impurezas: 2% (n=4 gels) <u>Impurezas Individuales:</u> Imp 1: 1.7% Imp 3: <LOQ (1.0%)	% de Pureza Total: 98% (n=4 gels) % Total de Impurezas: 2% (n=4 gels) <u>Impurezas Individuales:</u> Imp 1: 1.7%	% de Pureza Total: 99% (n=4 gels) % Total de Impurezas: 1% (n=4 gels) <u>Impurezas Individuales:</u> Imp 1: 1.2%	% de Pureza Total: 99% (Promedio n=4 gels) % Total de Impurezas: 1% (Promedio n=4 gels) <u>Impurezas Individuales:</u> Imp 1: 1.3%	Pendiente

1. El lote se volvió a probar utilizando un método mejorado, SOP-137 v3.0, por CAPA-19 alrededor del punto de tiempo 6 meses. Como resultado, se reasignó un nuevo valor de título de 1.1x10¹³ vg/mL para NCH Lote NCHAAV9SMN0613. Todos los puntos de tiempo de estabilidad posteriores se analizaron usando SOP-137 v3.0.

2. El lote NCHAAV9SMN0613 se fabricó en diciembre de 2013 y se probó en febrero de 2017 como T0. Se asignó una potencia del 100% en T0 y las potencias para todos los puntos de tiempo posteriores se calcularon en relación con el valor de T0.

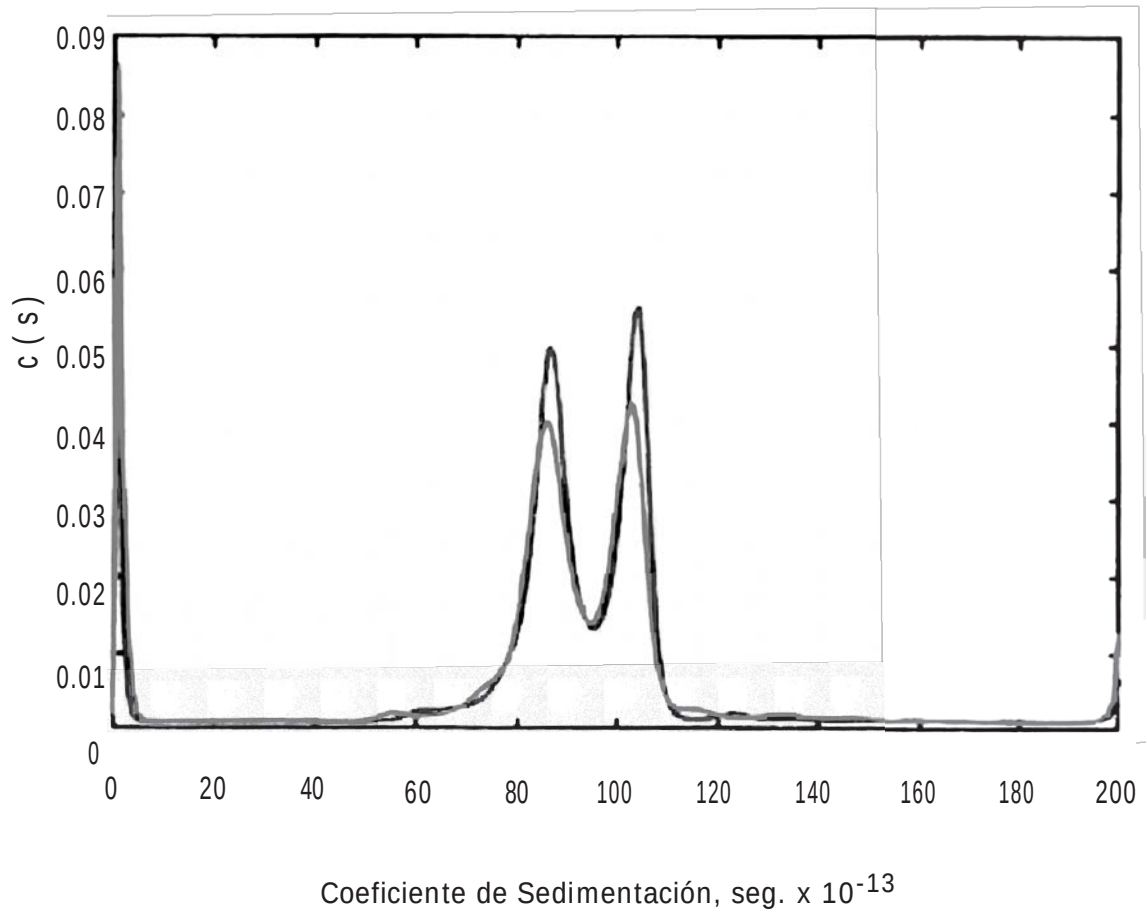
3. La prueba de Título Infeccioso se ejecutó aproximadamente 4 meses después de T0, ya que se incorporó al respectivo protocolo de estabilidad en junio de 2017.

Figura 20



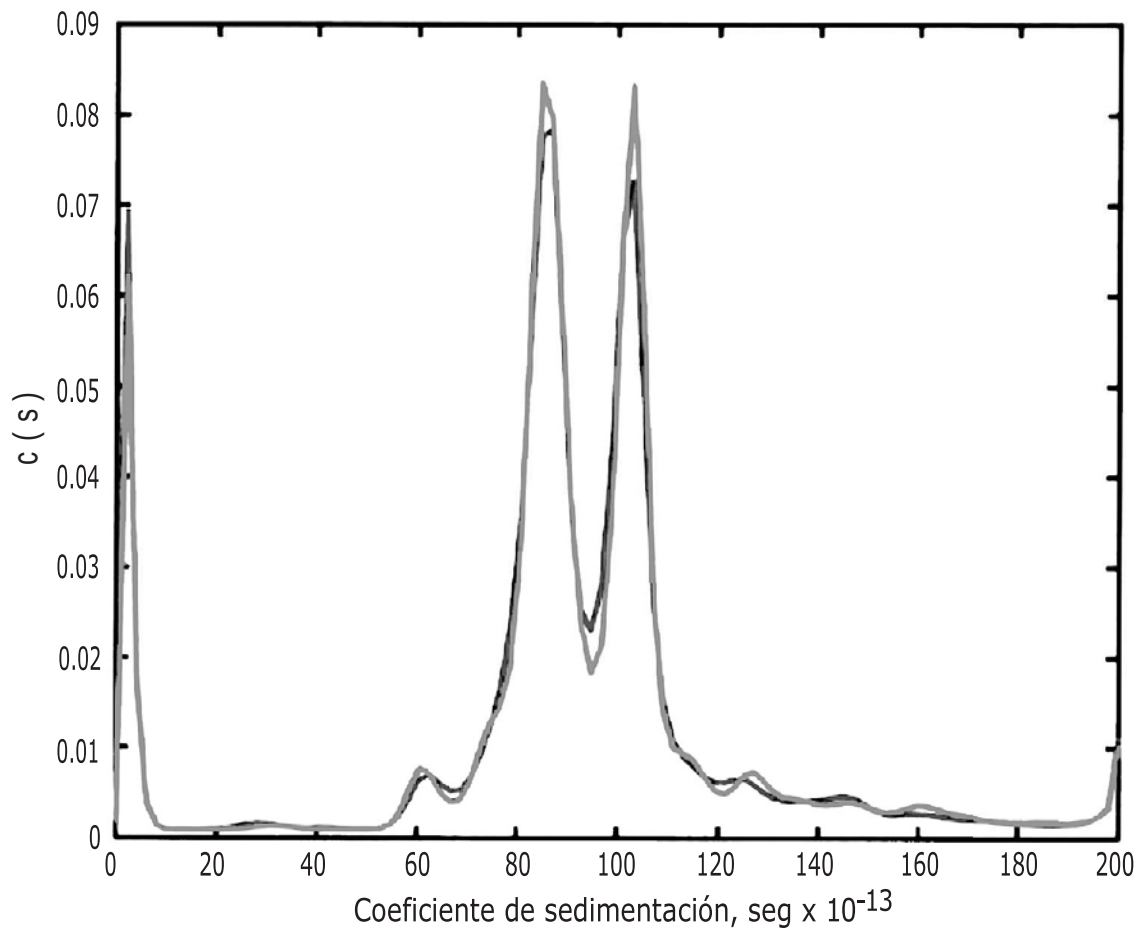
NCHAAV SMN0613	Pico Vacío			Pico Lleno 1			Pico Lleno 2		
	valor s	% área	PM (MDa)	valor s	% área	PM (MDa)	valor s	% área	PM (MDa)
Rep 1 (rojo)	62.58	8.53	1.97	85.23	47.76	3.11	101.76	37.20	4.01
Rep 2 (azul)	62.50	8.39	2.36	85.33	49.14	3.77	101.94	39.36	4.85
Promedio	62.54	8.46	2.17	85.28	48.45	3.44	101.85	38.28	4.43

Figura 21



600156	Pico Vacío			Pico Lleno 1			Pico Lleno 2		
	valor s	% área	PM (MDa)	valor s	% área	PM (MDa)	valor s	% área	PM (MDa)
Rep 1 (rojo)	61.80	1.29	2.77	86.74	54.23	4.62	104.12	43.72	6.06
Rep 2 (azul)	55.52	1.83	2.97	85.89	54.95	5.55	102.86	41.80	7.31
Promedio	58.66	1.56	2.87	86.32	54.59	5.09	103.49	42.76	6.69

Figura 22



600307	Pico Vacío			Pico Lleno 1			Pico Lleno 2		
	valor s	% área	PM (MDa)	valor s	% área	PM (MDa)	valor s	% área	PM (MDa)
Rep 1 (rojo)	62.12	3.68	3.32	85.51	52.18	5.30	101.91	38.46	7.11
Rep 2 (azul)	60.83	3.78	2.86	85.14	53.43	4.63	102.33	36.62	6.24
Promedio	61.48	3.73	3.09	85.33	52.81	4.97	102.12	37.54	6.68

Figura 23