

FORMULACIONES DE VIRUS ADENOASOCIADOS

CAMPO DE LA INVENCION

[001] La solicitud se refiere a composiciones y procedimientos para la formulación y uso de productos farmacéuticos de genoterapia. En determinados modos de realización, la solicitud divulga formulaciones de virus adenoasociados recombinantes (rAAV o AAV) que proporcionan uno o más de los siguientes: mantener un rendimiento estable de congelación-descongelación y liofilización (secado por congelación), y permitir un almacenamiento en estantería a largo plazo a temperaturas por encima de -80 °C mientras se mantienen atributos de calidad críticos tales como recuperación de genomas, retención de la potencia, agregación y degradación mínimas, calidad mejorada del vector, retención de proporciones de proteína vírica (VP), máxima estabilidad química (desamidación y oxidación mínimas) y/o estabilidad termodinámica mejorada.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 63/477,017, presentada el 23 de diciembre de 2022, y la solicitud provisional estadounidense n.º 63/612,443, presentada el 20 de diciembre de 2023.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[002] El contenido del listado de secuencias electrónico (065830_18WO.xml; tamaño: 5457 bytes; y fecha de creación: 20 de diciembre de 2023) se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

[003] Los desafíos para la estabilidad de la formulación de rAAV incluyen la degradación de proteínas, la agregación y la pérdida de eficacia. Las vías de degradación de formulaciones más importantes incluyen: (1) desplegamiento y pérdida de actividad inducidos por congelación/descongelación; y (2) agregación a fuerza iónica baja. Los mecanismos de degradación potenciales incluyen inestabilidad física, agregación, adsorción superficial, inestabilidad química, formación/intercambio de disulfuro, desamidación, oxidación e isomerización (Srivastav et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, volumen 110, número 7, 2021, páginas 2609-2624).

[004] Los tratamientos actuales basados en rAAV en general se formulan para almacenamiento en congelación, por ejemplo, almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, y dichas formulaciones incluyen ingredientes, por ejemplo, determinadas sales, especies tampón de fosfato y tensioactivos, en concentraciones para proporcionar una osmolaridad compatible con las vías de administración previstas, para evitar la agregación, potenciar la estabilidad y minimizar la pérdida en las superficies del producto. Sin embargo, estas formulaciones pueden presentar un rendimiento impredecible en condiciones de congelación-descongelación, por ejemplo, debido a la inclusión de matrices basadas en tampón de fosfato, lo que también puede dar lugar a cambios de pH. Además, la falta de un componente de azúcar en las formulaciones convencionales dificulta su aptitud para la liofilización, lo que es importante para alcanzar mayores temperaturas de almacenamiento en estantería, por ejemplo, $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[005] Un desafío particular en la formulación de tratamientos con rAAV son las formulaciones de fuerza iónica alta comunes en la técnica de los rAAV (a menudo con una concentración de NaCl de 150 mM o mayor), que crean una osmolalidad basal alta, una temperatura de transición vítrea (T_g') baja y limitan la inclusión de excipientes adicionales tales como azúcares.

[006] Las publicaciones de patente internacionales n.º WO2020214929 y WO2018128689 incluyen ejemplos de formulaciones de rAAV.

[007] En vista de lo anterior, existe una necesidad en la técnica de nuevas formulaciones de rAAV estables, que tengan una o más de las siguientes propiedades: susceptibles a la liofilización, capaces de mantener un rendimiento de congelación-descongelación predecible, presentar una estabilidad de almacenamiento potenciada a largo plazo a temperaturas mayores en diversas formas, por ejemplo, congelada, líquida o liofilizada, y sean compatibles con diversas vías de administración, que incluyen la sistémica, ocular y del SNC.

SUMARIO DE LA INVENCION

[008] En determinados modos de realización, la solicitud está dirigida a composiciones y procedimientos para la formulación y uso de productos de genoterapia. En particular, la solicitud se refiere a formulaciones de rAAV que son susceptibles al menos a una de, o la totalidad de, liofilización, mantienen un rendimiento de congelación-descongelación predecible y presentan una estabilidad a largo plazo potenciada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[009] En un aspecto general, la solicitud se refiere a una formulación estable que

comprende un producto farmacéutico terapéutico y:

- (a) 1-100 mM de una o más sales;
- (b) un agente tampón;
- (c) 0,001-0,05 % en peso de uno o más tensioactivos no iónicos;
- (d) 3-10 % en peso de uno o más azúcares; y
- (e) agua,
- (f) opcionalmente, uno o más aminoácidos, y

en la que la composición tiene un pH de 4,5-7,5, y se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico después de congelar y descongelar la formulación.

[0010] En otro aspecto general, la solicitud se refiere a una formulación estable que comprende un producto farmacéutico terapéutico y:

- (a) 1-100 mM de una o más sales;
- (b) un agente tampón;
- (c) 0,001-0,05 % en peso de uno o más tensioactivos no iónicos;
- (d) 3-10 % en peso de uno o más azúcares;
- (e) agua; y
- (f) opcionalmente, uno o más aminoácidos, y

en el que la composición tiene un pH de 4,5-7,5 y se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico después de liofilizar la formulación.

[0011] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a una formulación estable que comprende:

- (a) un virus adenoasociado (AAV) recombinante;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua; y
- (h) a un pH de 5 a 5,5.

[0012] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a una formulación estable que comprende:

- (a) un virus adenoasociado (AAV) recombinante;
- (b) 10 mM de Tris (Tris(hidroximetil)aminometano);
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (e) 0,005 % en peso de poloxámero 188;

- (d) 5 % en peso de sacarosa;
- (e) agua; y
- (f) a un pH de 7,3.

[0013] En otro aspecto general, la solicitud se refiere a una formulación estable que comprende:

- (a) un virus adenoasociado recombinante (rAAV);
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 6,0.

[0014] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto farmacéutico terapéutico;
- (b) 1-100 mM de una o más sales;
- (c) un agente tampón;
- (d) 0,001-0,05 % en peso de uno o más tensioactivos no iónicos;
- (e) 3-10 % en peso de uno o más azúcares; y
- (f) agua,
- (g) a un pH de 4,5 a 7,5; y
- (h) opcionalmente, uno o más aminoácidos, y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de la descongelación en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[0015] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;

- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de la descongelación en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[0016] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para conservar al menos el 50 % de la potencia relativa de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -60 °C y hasta -10 °C, tal como, por ejemplo -60 °C a -10 °C, -50 °C a -20 °C, -45 °C a -25 °C, o -30 °C a -40 °C, en la que después de la descongelación, dicho producto farmacéutico presenta al menos un 50 % de la potencia relativa en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[0017] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la desaminación de aminoácidos en la cápside de un rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;

- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua; y
- (h) a un pH de 5 a 5,5.

[0018] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico después de liofilizar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;
- (f) agua;
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de reconstituir el producto liofilizado en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[0019] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para conservar al menos el 50 % de la potencia relativa de un producto farmacéutico terapéutico después de liofilizar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en el que dicho producto farmacéutico presenta al menos un 50 % de la potencia relativa después de reconstituir el producto liofilizado en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[0020] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la desaminación de aminoácidos en la cápside de un rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3.

[0021] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico después de liofilizar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de reconstituir el producto liofilizado en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[0022] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para conservar al menos el 50 % de la potencia relativa de un producto farmacéutico terapéutico después de liofilizar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;

- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en el que dicho producto farmacéutico presenta al menos un 50 % de la potencia relativa después de reconstituir el producto liofilizado en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[0023] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la desaminación de aminoácidos en la cápside de un rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 6,0.

[0024] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir las especies de peso molecular bajo (LMW) después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el producto liofilizado se reconstituye y las especies de LMW son menos del 5 % en peso en comparación con el mismo producto sin liofilización, según se mide mediante ultracentrifugación analítica.

[0025] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir las especies de peso molecular bajo (LMW) después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el producto liofilizado se reconstituye y las especies de LMW son menos del 5 % en peso en comparación con el mismo producto sin liofilización, según se mide por ultracentrifugación analítica.

[0026] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de proteínas víricas después de congelar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua; y
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

almacenar dicha composición congelada durante una duración a una temperatura entre -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que el cambio en la proporción VP1:VP3 es menor del 20 % después de descongelar el producto congelado.

[0027] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de proteínas víricas después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;

(f) agua; y

(g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el cambio en la proporción VP1:VP3 es menor del 20 % en el producto liofilizado reconstituido en comparación con la muestra antes de la liofilización.

[0028] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de proteínas víricas después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

(a) el producto terapéutico;

(b) 10 mM de citrato de sodio;

(c) 75 mM de cloruro de sodio;

(d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;

(e) 7 % en peso de sacarosa;

(f) agua;

(g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el cambio en la proporción VP1:VP3 es menor del 20 % en el producto liofilizado reconstituido en comparación con la muestra antes de la liofilización.

[0029] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar y descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

(a) el producto terapéutico;

(b) 25 mM de cloruro de sodio;

(c) 5 mM de cloruro de magnesio;

(d) 25 mM de acetato de sodio;

(e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;

(f) 5,4 % en peso de sacarosa; y

(g) agua;

(h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante al menos un año a -20 °C, en el que después de la descongelación, la concentración de SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas

de 25 mm o más grandes.

[0030] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto farmacéutico terapéutico después de 5 ciclos de congelación-descongelación, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que dicha composición se descongela y se vuelve a congelar cinco veces, y en la quinta descongelación, la concentración de SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[0031] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto farmacéutico terapéutico, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que la formulación se somete a un ciclo de liofilización y la SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[0032] Otro aspecto general de la solicitud se refiere a un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto farmacéutico terapéutico, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que la formulación se somete a un ciclo de liofilización y la SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[0033] De acuerdo con modos de realización de la solicitud, el producto farmacéutico terapéutico es un rAAV. El rAAV puede comprender una cápside derivada de uno o más AAV seleccionados del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, Rh8, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8, RHM4-1, DJ, DJ8, NP59, Anc-80 y variantes de los mismos. El rAAV puede comprender un transgén que codifica un polipéptido o un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARNip, una molécula antisentido, un miARN, una ribozima y un ARNhc.

[0034] De acuerdo con modos de realización de la solicitud, el rAAV usado en un modo de realización de la solicitud comprende el transgén que codifica GAA (alfa-glucosidasa ácida), ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre), alfa galactosidasa A (GLA), ASS1 (arginosuccinato sintasa), beta-glucocerebrosidasa, beta-hexosaminidasa A, SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1), glucosa-6-fosfatasa, CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C), una ganancia de función del factor de coagulación sanguínea, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad), lipasa de lipoproteína (LPL), ornitina transcarbamilasa (OTC), β -globina, α -globina, espectrina,

α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metales (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en enfermedad de almacenamiento lisosómico (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento derivado de línea celular de la glía (GDNF), factor de crecimiento transformante α y β , una citocina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), linfoxina (LT), un producto génico suicida, timidina cinasa del virus del herpes simple, citosina desaminasa (CD), toxina diftérica (DT), citocromo P450 (CYP), desoxicitidina cinasa (DCK), factor de necrosis tumoral (TNF), una proteína de resistencia a fármacos, una proteína supresora de tumor (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel–Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido o proteína tolerogénico o inmunogénico Tregitope o hCDR1 (Edratide), insulina, glucocinasa (GCK), guanilato ciclasa 2D (GUCY2D) (o amaurosis congénita de Leber (LCA) asociada con variantes de GUCY2D (GUCY2D-LCA)), proteína acompañante Rab 1 (REP1) (coroideremia (CHM) codifica REP1), LCA 5 (amaurosis congénita de Leber 5) (LCA-Lebercilina), ornitina cetoácido aminotransferasa (atrofia girada), retinosquisina 1 (retinosquiasis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (sordera por conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (acromatopsia), PKD-1+ o PKD-2 (enfermedad poliquística del riñón), TPP1 (tripeptidil peptidasa 1), CLN2 (lipofuscinosis neuronal ceroid 2), una sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP (activador del gangliósido GM2), NPC1 (NPC transportador de colesterol intracelular 1), VPC2, una proteína activadora de esfingolípidos, una o más nucleasas con dedos de zinc para la edición del genoma, una o más secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma o variantes de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0035] Los anteriores y otros objetivos, aspectos, características y ventajas de los

modos de realización ejemplares quedarán más evidentes y podrán entenderse mejor en referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos.

[0036] La Figura 1 representa las recuperaciones del vector para cada una de las formulaciones a todas las temperaturas (5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C) y puntos de tiempo sometidos a prueba (2 semanas – 6 meses) calculadas como un porcentaje de los títulos T0. F1 (Formulación 1) = 25 mM de acetato de Na, 25 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, pH 5,2, 5,4 % de sacarosa, 0,01 % de Pluronic™ F-68 (Poloxámero 188); F2 (Formulación 2) = 10 mM de fosfato de Na, 180 mM de NaCl, pH 7,3, 0,001 % de poloxámero 188; y F3 (Formulación 3) = 10 mM de fosfato de Na, 60 mM de NaCl, 3 % de sacarosa, pH 7,3, 0,001 % de poloxámero 188.

[0037] La Figura 2 representa los tiempos de retención del pico de IEX para cada una de las formulaciones a todas las temperaturas (5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C) y puntos de tiempo sometidos a prueba (2 semanas – 6 meses).

[0038] La Figura 3 representa el total de especies de peso molecular alto (HMW) para todas las muestras informadas mediante análisis SEC-MALS (cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz multiángulo) para cada una de las formulaciones a todas las temperaturas (5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C) y puntos de tiempo sometidos a prueba (2 semanas – 6 meses).

[0039] La Figura 4 representa las proporciones de proteína de la cápside VP para todas las muestras informadas por CE-SDS (electroforesis capilar con dodecil sulfato de sodio) para cada una de las formulaciones a todas las temperaturas (5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C) y puntos de tiempo sometidos a prueba (2 semanas – 6 meses).

[0040] La Figura 5 representa los datos de intensidad de fluorescencia y T_m (punto de fusión) de todas las muestras T0 de fluorimetría diferencial de barrido (DSF) intrínseca. 1 y 2 indican mediciones replicadas dentro de cada muestra de formulación. La flecha punteada muestra el desplazamiento del pico observado para F1.

[0041] La Figura 6 representa las intensidades de fluorescencia de DSF extrínseca normalizadas para diferentes formulaciones T0.

[0042] La Figura 7 representa las mediciones de oscurecimiento de la luz de alta exactitud (HIAC) de muestras que muestran cantidades de partículas subvisibles para cada una de las formulaciones a todas las temperaturas (5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C) y puntos de tiempo sometidos a prueba (2 semanas – 6 meses).

[0043] La Figura 8 representa datos de mapeo de péptidos que muestran los niveles de desamidación y oxidación en los residuos de punto caliente para cada una de las formulaciones a las temperaturas y puntos de tiempo especificados sometidos a prueba.

[0044] La Figura 9 representa los valores de potencia relativa de todas las muestras en relación con las muestras T0 para cada una de las formulaciones a todas las temperaturas (5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C) y puntos de tiempo sometidos a prueba (2 meses y 6 meses).

[0045] La Figura 10 representa el análisis de condiciones de la matriz que afectan el título de rAAV durante el estrés del líquido a 30 °C. Las condiciones preferentes tienen un % de incremento restante después del estrés y son la combinación de pH < 7,3, NaCl < 100 mM, MgCl₂ < 10 mM.

[0046] Las Figuras 11A-11D representan el efecto de determinados tampones y excipientes en la formación de partículas subvisibles (SVP) durante la congelación-descongelación de rAAV. Las Figuras 11A-11B ilustran la dependencia significativa que tienen el número y el tamaño de SVP de las especies tampones, la tasa de congelación-descongelación y la fracción de partículas de rAAV sin genoma terapéutico (es decir, la fracción de rAAV “vacía”). Las Figuras 11C-11D ilustran condiciones de almacenamiento optimizadas (es decir, presencia de azúcar y tensioactivo como crioprotectores) con una reducción significativa en la formación de SVP y una formación de SVP reducida en especies tampones, la tasa de congelación-descongelación y la fracción de rAAV vacía.

[0047] La Figura 12 representa el pH de rAAV en la formulación F1, medido en la solución descongelada después de un almacenamiento a largo plazo.

[0048] Las Figuras 13A y B representan el título de rAAV en la formulación F1 durante el almacenamiento a largo plazo. Título de genomas víricos intactos medidos mediante PCR digital de gotas después de cada combinación de tiempo y temperatura. La Figura 13A representa el total de genomas de vector recuperado. La Figura 13B representa el título normalizado por el título medido inicial (T0).

[0049] La Figura 14 representa la potencia basada en células de rAAV en la formulación F1 durante el almacenamiento a largo plazo. Potencia in vitro medida mediante ensayo funcional basado en células. Todas las mediciones son relativas a la potencia medida antes de la estabilidad a largo plazo (condición T0).

[0050] Las Figuras 15A y B representan la infectividad basada en células de rAAV en la formulación F1 durante el almacenamiento a largo plazo. La infectividad se mide mediante un ensayo basado en células para cada combinación de tiempo y temperatura. La Figura 15A representa la proporción entre la concentración de partículas de vector y el título del vector infeccioso, o proporción PI. La Figura 15B representa los títulos infecciosos.

[0051] Las Figuras 16A y B representan las cápsides totales y la proporción vacías : llenas de rAAV en la formulación F1 medida por absorbancia a 280 nm y 260 nm, durante el almacenamiento a largo plazo. La Figura 16A representa la concentración total de cápsides. La Figura 16B representa la proporción de cápsides víricas vacías : llenas.

[0052]

[0053] Las Figuras 17A, B y C representan la proporción de proteínas víricas de la cápside de rAAV en la formulación F1 durante el almacenamiento a largo plazo. La Figura 17A representa la proporción de proteínas víricas normalizadas con respecto a la proteína vírica 1 (VP1), que incluye la proteína vírica 2 (VP2), la proteína vírica 3 (VP3) y una variante de VP 3 denominada Pre VP3. La Figura 17B representa la fracción de masa atribuida a la combinación de VP1, VP2 y VP3. La Figura 17C representa la fracción de proteína atribuida a especies degradantes que no son VP1, VP2 o VP3.

[0054] La Figura 18 representa impurezas de rAAV oligoméricas de peso molecular alto en la formulación F1 durante el almacenamiento a largo plazo. Las impurezas se miden mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica y se informan como porcentaje de área por absorbancia a 280 nm.

[0055] La Figura 19 representa la desamidación de la cápside de rAAV en la formulación F1 durante el almacenamiento a largo plazo, informada para los aminoácidos clave N57, N254, N255, N263 y N514. La desamidación se midió con espectrometría de masas de mapeo de péptidos.

[0056] La Figura 20 representa el porcentaje de recuperación de rAAV reconstituido después de un ciclo de liofilización. La recuperación de genomas víricos se realiza mediante qPCR, normalizada por el título antes de la liofilización. Los rAAV se liofilizan en dos formulaciones, F4 y F5, definidas a continuación, con secado secundario (SD) a 25 °C o 30 °C. F4 (Formulación 4) = 10 mM de Tris, 75 mM de NaCl, 5 % de sacarosa, 0,005 % de poloxámero 188, pH 7,3; F5 (Formulación 5) = 10 mM de citrato de sodio, 75 mM de NaCl, 7 % de sacarosa, 0,001 % de poloxámero, pH 6,0.

[0057] La Figura 21 representa la potencia basada en células del rAAV reconstituido después de un ciclo de liofilización. La potencia se normaliza con respecto a la muestra antes de la liofilización. El rAAV se liofiliza en la formulación F4, con secado secundario a 25 °C o 30 °C.

[0058] La Figura 22 representa especies oligoméricas de peso molecular alto en soluciones de rAAV reconstituidas después de la liofilización, medidas por SEC-MALS. Los rAAV se liofilizan en las formulaciones F4 y F5, con secado secundario (SD) a 25

°C o 30 °C. T0 filtrado indica las muestras filtradas a 0,2 µm antes de la liofilización.

[0059] La Figura 23 representa la proporción de proteínas de la cápside (VP1, VP2, VP3 y variante pre-VP3) en la solución de rAAV reconstituida después de la liofilización. La abundancia de proteínas víricas se mide mediante CE-SDS y se normaliza respecto a la cantidad de VP1 en cada muestra. T0 indica el valor antes de la liofilización.

[0060] La Figura 24 muestra la recuperación del título de rAAV reconstituido durante el almacenamiento a largo plazo y la humedad relativa (HR). El rAAV se liofiliza en F4 y se almacena entre -20 °C y 35 °C durante hasta 6 meses. El título se mide mediante qPCR y la recuperación se calcula mediante el título antes de la liofilización (líquido T0).

[0061] La Figura 25 representa la potencia basada en células de rAAV reconstituido. El rAAV se liofiliza en F4 y se almacena entre -20 °C y 35 °C durante hasta 6 meses. La potencia se normaliza respecto a la potencia antes de la liofilización (líquido T0).

[0062] Las Figuras 26A y B representan la fracción de oligómeros de peso molecular alto (HMW) en rAAV reconstituido, evaluado por SEC-MALS. El rAAV se liofiliza en F4 y se almacena entre -20 °C y 35 °C durante hasta 6 meses. La Figura 26A ilustra el porcentaje de monómero. La Figura 26B ilustra el porcentaje de HMW.

[0063] La Figura 27 representa la fracción de peso molecular alto (HMW) en rAAV reconstituido, evaluada mediante ultracentrifugación analítica e informada para los cambios en especies de HMW, cápsides parciales (parciales) y especies de peso molecular bajo (LMH). El rAAV se liofiliza en F4 y se almacena entre -20 °C y 35 °C durante hasta 6 meses.

[0064] La Figura 28 muestra la concentración de partículas subvisibles en rAAV reconstituido, evaluada mediante oscurecimiento de la luz (HIAC). El rAAV se liofiliza en F4 y se almacena entre -20 °C y 35 °C durante hasta 6 meses. La concentración de partículas se expresa en intervalos de tamaño ≥ 5 µm, ≥ 10 µm y ≥ 25 µm. El líquido T0 indica una muestra antes de la liofilización y el Día 0 después de Lio indica una muestra después del ciclo de liofilización.

[0065] La Figura 29 representa la proporción de proteínas de la cápside de rAAV (VP1, VP2, VP3 y variante pre-VP) en solución reconstituida. El rAAV se liofiliza en F4 y se almacena entre -20 °C y 35 °C durante hasta 6 meses. La abundancia de proteínas víricas se mide mediante CE-SDS y se normaliza respecto a la cantidad de VP1 en cada muestra. El líquido T0 indica la muestra antes de la liofilización.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0066] Se citan o describen diversas publicaciones, artículos y patentes en los antecedentes y a lo largo de la memoria descriptiva; cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El análisis de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva tiene como propósito proporcionar contexto a la invención. Dicho análisis no constituye una admisión de que alguno o todos estos asuntos formen parte de la técnica anterior con respecto a cualquier invención divulgada o reivindicada.

[0067] En determinados modos de realización, la presente divulgación está dirigida a composiciones y procedimientos para la formulación y uso de productos de genoterapia. En particular, la solicitud divulga formulaciones de rAAV estables que tienen preferentemente una o más de las siguientes propiedades: mantener un rendimiento predecible (estable) de congelación-descongelación y liofilización (secado por congelación), y permitir un almacenamiento en estantería a más largo plazo a temperaturas por encima de -60 °C mientras se mantienen atributos de calidad críticos tales como recuperación de genomas, retención de la potencia, agregación y degradación mínimas, calidad mejorada del vector, estabilidad química máxima (por ejemplo, desamidación y oxidación mínimas) y/o estabilidad termodinámica máxima.

[0068] En determinados modos de realización, un periodo de tiempo de estabilidad previsto es de al menos 6 meses, preferentemente 1 año y, lo más preferentemente, 2 años. Si una condición acelerada (normalmente una temperatura significativamente mayor o menor que las condiciones de almacenamiento normales) muestra cambios aceptables dentro del periodo de tiempo de observación, es razonable extrapolar los resultados de estabilidad al siguiente periodo de tiempo de observación (típicamente intervalos de 6 a 12, de 18 a 24, de 36 a 48, etc.). Para las condiciones de almacenamiento en congelación sin condiciones de estabilidad acelerada, si no hay cambios dentro del periodo de tiempo actual, entonces se espera que el próximo periodo de tiempo también sea aceptable. (Guía de la farmacopea; Agencia Europea de Medicamentos, Nota orientativa sobre la evaluación de datos de estabilidad, CPMP/ICH/420/02, agosto de 2003; y USP <787>).

[0069] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento en general tienen sus significados habituales en la técnica a la que pertenece la presente invención, dentro del contexto de esta divulgación y en el contexto específico donde se usa cada término. Determinados términos se analizan a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar

orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y los procedimientos de la presente divulgación y cómo hacerlos y usarlos.

[0070] Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, el uso de la palabra "un" o "una", cuando en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar "uno", pero también es consecuente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

[0071] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto indique lo contrario, el término "comprender" y sus variaciones, tales como "comprende" y "que comprende", implicarán la inclusión de un entero o etapa o grupo de enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas. Cuando se usa en la presente, la expresión "que comprende" se puede sustituir con la expresión "que contiene" o "que incluye" o, en algunos casos, cuando se usa en la presente con la expresión "que tiene".

[0072] Cuando se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación, cuando dicho elemento, etapa o ingrediente esté relacionado con la invención reivindicada. Cuando se usa en la presente, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten de manera material las características básicas y novedosas de la reivindicación. Cualquiera de los términos antes mencionados de "que comprende", "que contiene", "que incluye" y "que tiene", siempre que se usen en el presente documento en el contexto de un aspecto o modo de realización de la invención, puede reemplazarse por el término "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" para variar los alcances de la divulgación.

[0073] Como se usa en el presente documento, se entiende que el término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos mencionados engloba tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos se unen mediante "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y segundo elemento juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones está comprendida dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento. También se entiende que la aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones está comprendida en el significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o".

[0074] Todos los rasgos característicos divulgadas en el presente documento se pueden combinar en cualquier combinación. Cada rasgo característico divulgado en la memoria descriptiva se puede reemplazar por un rasgo característico alternativo que sirva para el mismo propósito, uno equivalente o similar.

[0075] El término “aproximadamente” o “de manera aproximada” significa un intervalo de error aceptable para el valor en particular, según lo determina una persona del oficio de nivel medio, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 3 o más de 3 desviaciones estándar, según la práctica en el estado de la técnica. De forma alternativa, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta 20 %, preferentemente hasta 10 %, con mayor preferencia hasta 5 %, y con mayor preferencia aun hasta 1 % de un valor determinado. De forma alternativa, en particular con respecto a sistemas o procesos biológicos, la expresión puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces, y con mayor preferencia dentro de 2 veces, de un valor. Con respecto a los componentes y el pH de la formulación, “aproximadamente” indica más o menos el 10 % del valor indicado.

[0076] El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico portadora que se puede manipular mediante la inserción o incorporación de un ácido nucleico. Los ejemplos de “vector” incluyen, pero no se limitan a, un plásmido, un virus, que incluye un vector rAAV, u otro vehículo capaz de suministrar una molécula de ácido nucleico. Los vectores se pueden usar para la manipulación genética para introducir/transferir polinucleótidos en las células y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en las células. Un “vector de expresión” es un vector especializado que contiene un gen o secuencia de ácido nucleico con las regiones reguladoras necesarias para la expresión en una célula hospedera.

[0077] Un vector vírico se deriva de o se basa en uno o más elementos de ácido nucleico que comprenden un genoma vírico y también puede comprender una cápside vírica que encapsida el ácido nucleico. Un vector vírico particular es un vector de virus adenoasociado (AAV), denominado en el presente documento “rAAV”.

[0078] El término “recombinante”, como modificador de una composición, significa que la composición se ha manipulado o genomaniplado de una manera que en general no se produce en la naturaleza. Una composición recombinante incluye un vector recombinante, tal como un vector AAV recombinante, un polinucleótido o polipéptido recombinante, o una célula o animal recombinante. El término “recombinante”, como modificador de ácido nucleico o un vector, indica una combinación de elementos que no

se produce en la naturaleza. Los ejemplos de ácido nucleico recombinante incluyen un ácido nucleico de vector vírico recombinante que proporciona elementos víricos 5' y/o 3' junto con un casete de expresión que contiene uno o más elementos no asociados naturalmente con los elementos 5' y/o 3'; y casetes de expresión que pueden contener diferentes componentes recombinados tales como un protómero heterólogo, poliA, intrones y espaciadores. De forma similar, un vector vírico, tal como un vector rAAV, puede contener una cápside natural o modificada que encapside el ácido nucleico de vector vírico recombinante. Un ejemplo particular de un vector AAV recombinante puede ser un vector rAAV donde se inserta una secuencia de ácido nucleico que normalmente no está presente en el genoma de AAV natural (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico heteróloga) dentro del genoma de AAV. Aunque el término "recombinante" no siempre se usa en el presente documento en referencia a vectores rAAV, así como secuencias tales como polinucleótidos, las formas recombinantes del vector rAAV y los polinucleótidos se incluyen expresamente a pesar de cualquier omisión de este tipo.

[0079] El ácido nucleico de vector vírico contiene elementos víricos 5' y/o 3' que proporcionan el empaquetamiento vírico y pueden proporcionar actividades adicionales tales como autocebado, replicación de ADN, actividad promotora, integración del genoma o concatemerización episomal. Los elementos 5' y 3' en general se localizan en o cerca del extremo terminal 5' y 3' del ácido nucleico de vector vírico recombinante y pueden ser versiones naturales o modificadas de secuencias naturales. (Naso et al., (2017) *BioDrugs*, 31(4), 317–334; y Bulcha et al., (2021) *Sig. Transduct. Target Ther.* 6:53 (2021).

[0080] Los elementos adicionales para vectores rAAV incluyen, sin limitación, una señal de terminación de la transcripción o codón de parada, regiones no traducidas 5' o 3' (por ejemplo, secuencias de poliadenilación (poliA)) que flanquean una secuencia, tal como una o más copias de una secuencia de ITR de AAV, o un intrón. Los elementos de ácido nucleico incluyen componentes de vectores de expresión que comprenden un transgén junto con elementos reguladores que proporcionan y/o facilitan la traducción, la exportación nuclear de ácido nucleico y las traducciones. Los elementos adicionales incluyen, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos de relleno o completamiento, por ejemplo, para mejorar el empaquetamiento y reducir la presencia de ácido nucleico contaminante. Para secuencias más cortas, se puede usar la inclusión de una secuencia de relleno o completamiento para ajustar la longitud de la secuencia de ácido nucleico total al tamaño de la secuencia genómica del virus aceptable para el empaquetamiento del vector AAV en la partícula del virus. En diversos modos de realización, una

secuencia de ácido nucleico de relleno o completamiento es un segmento de ácido nucleico no traducido (no codificante de proteínas).

[0081] Cuando un ácido nucleico o transgén heterólogo natural es demasiado grande para empaquetarse dentro de una partícula de vector AAV, y se desea el suministro por AAV, el ácido nucleico heterólogo se puede proporcionar en forma modificada, fragmentada o troncada para el empaquetamiento en y el suministro por un vector AAV, de modo que una proteína o producto de ácido nucleico funcional, tal como una proteína o producto de ácido nucleico terapéutico, se proporciona en última instancia.

[0082] El ácido nucleico de vector AAV recombinante se puede derivar de un genoma natural (wt o natural) de AAV usando procedimientos moleculares para modificar el genoma natural. Por ejemplo, un rAAV se puede obtener eliminando una porción de la secuencia de ácido nucleico natural del genoma del AAV y reemplazándola con una secuencia de ácido nucleico no natural, denominada ácido nucleico heterólogo. De forma alternativa, la ITR natural o variantes de la misma, se pueden adjuntar 3' y/o 5' a una secuencia heteróloga. Típicamente, una o ambas secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) del genoma de AAV se retienen en el vector AAV. El rAAV se distingue de un genoma de AAV, ya que, en el rAAV, todo o una parte del genoma de AAV se ha reemplazado o modificado de otro modo con una secuencia no natural con respecto al ácido nucleico genómico de AAV. Por lo tanto, la incorporación de una secuencia no natural define el vector AAV como un vector "recombinante", que se puede referir como un "vector rAAV".

[0083] La referencia a un vector vírico proporciona el ácido nucleico vírico y también puede proporcionar una cápside (también denominada partícula). El término "rAAV" se puede usar para referirse al ácido nucleico de vector vírico recombinante y/o al ácido nucleico de vector vírico recombinante encapsidado en una cápside. Los vectores víricos se pueden usar, por ejemplo, para la infección (transducción) de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*.

[0084] Un "genoma" de vector se refiere a la porción de la secuencia plasmídica recombinante que en última instancia se empaqueta o encapsida para formar una partícula vírica (por ejemplo, AAV). En casos en donde los plásmidos recombinantes se usan para construir o elaborar vectores recombinantes, el genoma de vector no incluye la porción del "plásmido" que no corresponde con la secuencia de genoma de vector del plásmido recombinante. Esta porción de genoma no vector del plásmido recombinante se denomina "estructura principal del plásmido", que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, pero que en sí misma no se empaqueta ni encapsida en

partículas de virus (por ejemplo, rAAV). Por tanto, un "genoma" de vector se refiere al ácido nucleico que se empaqueta o encapsida en un virus (por ejemplo, el ácido nucleico empaquetado en un rAAV).

[0085] Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en la presente para referirse a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos incluyen ADN genómico, ADNc y ADN antisentido, y ARNm, ARNr, ARNt y ADN o ARN inhibidor empalmados o no empalmados. El ARN inhibidor incluye, pero no se limita a, ARN de horquilla pequeña o corta (hc), microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño o corto (ip), ARN de transempalme o ARN antisentido. Los ácidos nucleicos incluyen polinucleótidos naturales, sintéticos y modificados o alterados intencionalmente (por ejemplo, ácido nucleico variante). Los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, ADNc, ADN genómico, ARN y fragmentos de los mismos que pueden ser mono- o bicatenarios.

[0086] Los polinucleótidos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares, y pueden ser de cualquier longitud. Al analizar los polinucleótidos, una secuencia o estructura de un polinucleótido particular se puede describir en el presente documento de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección de 5' a 3'.

[0087] Una proteína vírica (VP), como se usa en el presente documento, es al menos una de las tres proteínas de subunidad (cualquier variante de las mismas) que comprenden la cápside del AAV, denominadas proteína vírica 1, proteína vírica 2 y proteína vírica 3 (VP1, VP2, VP3) y pre-VP3. La reducción de la degradación de las proteínas peptídicas víricas se observa típicamente mediante una disminución de la abundancia relativa de VP1 y/o VP2 en comparación con VP3. La degradación de las proteínas víricas se puede presentar como un aumento en la cantidad relativa de VP3 (y especies similares que incluyen pre-VP3) en comparación con VP1 o VP2. Un ejemplo no limitante es determinar, antes y después de una condición de almacenamiento, la proporción de VP1:VP3, donde VP3 incluye pre-VP3 (por ejemplo, VP3+preVP3), y a continuación comparar. Hay presencia de degradación si la proporción VP1:VP3 es mayor después del almacenamiento. Para evitar confusiones, en la presente solicitud, cuando se calcula VP3 para determinar la degradación, el valor es VP3 + preVP3.

[0088] Un "transgén" se usa en la presente para hacer referencia, convenientemente, a un ácido nucleico previsto para ser introducido, o que se introdujo, en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido o proteína o codifica un ARN inhibidor, que está incluido en un vector,

particularmente un rAAV. Los transgenes pueden incrementar directamente los niveles de una proteína objetivo al codificar el ARN que la maquinaria de la célula huésped procesa y traduce a la proteína objetivo. Los transgenes pueden incrementar indirectamente los niveles de una proteína objetivo ya sea codificando proteínas reguladoras que promueven la expresión de la proteína objetivo o codificando ARN que inhibe proteínas y/o ácidos nucleicos que sirven para reprimir la proteína objetivo. Un transgén puede ser un gen de interés (GOI) como se describe a continuación.

[0089] Un ácido nucleico heterólogo se puede introducir o transferir por medio de un vector, tal como rAAV, "transducción" o "transfección" en una célula. El término "transducir" y variaciones gramaticales del mismo se refieren a la introducción del vehículo portador del ácido nucleico en una célula u organismo huésped. El ácido nucleico heterólogo introducido puede existir en la célula receptora u organismo hospedera de manera extracromosómica, o solo de manera transitoria.

[0090] Una "célula transducida" es una célula en la que se ha introducido el transgén o ácido nucleico heterólogo. En consecuencia, una célula "transducida" significa un cambio genético en una célula después de la incorporación de una molécula exógena, por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, un transgén) en la célula. Por lo tanto, una célula "transducida" es una célula en la que, o una progenie de la misma en la que, se ha introducido un ácido nucleico exógeno. La(s) célula(s) se puede(n) propagar y el ácido nucleico introducido transcribirse y, si el ácido nucleico codifica una proteína, se puede traducir posteriormente el transcrito del ácido nucleico. Para los usos y procedimientos de genoterapia, una célula transducida puede estar en un sujeto.

[0091] Un "elemento de control de la expresión" es un tipo de elemento regulador y se refiere a secuencia(s) de ácido nucleico que influye(n) en la expresión de un ácido nucleico enlazado de forma funcional. Típicamente, dichos elementos se incluyen para facilitar la transcripción de polinucleótidos heterólogos apropiados y, si corresponde, la traducción (por ejemplo, un promotor, potenciador, señal de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción dentro del marco de ARNm y, codones de parada, etc.). Dichos elementos típicamente actúan en cis, denominados un elemento de "acción en cis", pero también pueden actuar en trans.

[0092] El término "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias reguladoras que modulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico se colocan en las posiciones apropiadas en relación con la secuencia para efectuar la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Esta misma definición se aplica a veces a la disposición

de secuencias de ácido nucleico y elementos de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores y elementos de terminación) en un vector de expresión, por ejemplo, vector rAAV.

[0093] Como se usa en el presente documento, una “proporción E:F” o “fracción de AAV vacía” se refiere a la proporción de las partículas de rAAV vacías no empaquetadas con un genoma de rAAV respecto a las partículas de rAAV llenas empaquetadas con un genoma de rAAV.

[0094] “Degradación” se refiere al conjunto general de cambios químicos y físicos que se acumulan con el tiempo, que degradan la seguridad y/o eficacia del vector. Estos pueden incluir, pero no se limitan a, expulsión del genoma, agregación del vector, fragmentación de proteínas de la cápside y desamidación de proteínas de la cápside. Además, en algunos modos de realización de la invención, los productos de degradación se denominan especies de peso molecular alto (HMW) o especies de peso molecular bajo (LMW).

[0095] En algunos modos de realización, el ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína (por ejemplo, proteína terapéutica) se proporciona en formas modificadas o truncadas o el ácido nucleico heterólogo se proporciona en múltiples construcciones, suministradas por vectores AAV separados y múltiples.

[0096] En determinados aspectos, el ácido nucleico heterólogo se proporciona como una variante truncada que mantiene la funcionalidad de la proteína codificada (por ejemplo, proteína terapéutica), que incluye la eliminación de porciones innecesarias para la función, de modo que el polinucleótido heterólogo codificante se reduce en tamaño para el empaquetamiento en un vector AAV.

[0097] En determinados aspectos, el ácido nucleico heterólogo se proporciona en vectores AAV divididos, cada uno de los cuales proporciona ácido nucleico que codifica diferentes porciones de una proteína (por ejemplo, proteína terapéutica), por tanto, suministra múltiples porciones de una proteína (por ejemplo, proteína terapéutica) que se ensambla y funciona en la célula.

[0098] En otros aspectos, el ácido nucleico heterólogo se proporciona por medio de vectores AAV duales que usan tecnología de vector dual de superposición, corte y empalme en trans o corte y empalme en trans híbrido. En determinados modos de realización, se usan dos vectores AAV superpuestos que se combinan en la célula para generar un casete de expresión completo, a partir del cual se expresa una proteína de longitud completa (por ejemplo, proteína terapéutica).

[0099] El término “producto farmacéutico terapéutico” se refiere a cualquier fármaco

que se administra a un paciente y produce una respuesta clínicamente significativa para una indicación determinada. Dichos productos farmacéuticos son biológicos e incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, células modificadas, tratamientos celulares o génicas, virus, bacterias, nanopartículas, ácidos nucleicos y moléculas biológicas.

[00100] El término “aislado”, cuando se usa como modificador de una composición, significa que la composición se proporciona en un entorno diferente al que se produce en la naturaleza. Por ejemplo, la composición se puede producir o separar, completamente o al menos en parte, de su entorno in vivo natural. En general, las composiciones aisladas están sustancialmente libres de uno o más materiales con los que normalmente se asocian en la naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, membrana celular.

[00101] El término “aislado” no excluye otras combinaciones, por ejemplo, una secuencia de rAAV aislada o una partícula de rAAV aislada que encapsida una secuencia de rAAV se puede proporcionar en una formulación farmacéutica. El término “aislado” tampoco excluye formas físicas alternativas de la composición, tales como híbridos/quimeras, multímeros/oligómeros, modificaciones (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, lipidación) o formas derivadas, o formas expresadas en células huésped que proporcionan un entorno diferente al que se produce en la naturaleza.

[00102] El término "sustancialmente pura" se refiere a una preparación que comprende al menos 50-60 % en peso del compuesto o molécula de interés (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, cápside, partícula de rAAV, etc.). La pureza se mide por procedimientos apropiados para el compuesto o molécula de interés particular (por ejemplo, procedimientos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, análisis de HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento) y similares). En algunos modos de realización, una preparación de rAAV es sustancialmente pura de partículas de rAAV llenas cuando las partículas completas comprenden al menos el 70 % en peso de la preparación.

[00103] La frase "que consiste esencialmente en", en referencia a una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos particular, significa una secuencia que tiene las propiedades de una SEQ ID NO determinada. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a una secuencia de aminoácidos, la frase incluye la secuencia en sí y las modificaciones moleculares que no afecten las características básicas y novedosas de la secuencia.

[00104] Las moléculas de ácido nucleico, los vectores de expresión (por ejemplo, genomas de vector AAV), los plásmidos, que incluyen el ácido nucleico que codifica cápsides de AAV modificadas o variantes de la invención y los ácidos nucleicos

heterólogos se pueden preparar usando procedimientos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de información de secuencia de nucleótidos permite la preparación de moléculas de ácido nucleico de la invención por una variedad de medios. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico se pueden producir usando diversas técnicas de clonación estándar, tecnología de ADN recombinante, por medio de la expresión celular y técnicas de síntesis química. La pureza de los polinucleótidos se puede determinar a través de secuenciación, electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar por medio del uso de técnicas de hibridación o de selección de bases de datos computarizadas. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a: (1) hibridación de bibliotecas de ADN genómico o ADNc con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas; (2) cribado de anticuerpos para detectar polipéptidos que tienen características estructurales compartidas, por ejemplo, que usa una biblioteca de expresión; (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ADN genómico o ADNc que usa cebadores capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas informáticas de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) cribado diferencial de una biblioteca de ácido nucleico sustraída.

[00105] La fuerza iónica es una medida de la composición de sales eficaz y del apantallamiento electrostático de una solución. Los efectos de la fuerza iónica en una formulación pueden incluir interacciones electrostáticas en una solución e influir en la estabilidad coloidal. La fuerza iónica se estima típicamente como se muestra en la Ecuación 1, en la que C_i es la concentración de cada especie iónica, y Z_i es la carga de esa especie. En determinados modos de realización, una fuerza iónica "baja" está de manera aproximada entre 25-50 mM, y una fuerza iónica "moderada" está entre 50-95 mM.

$$FI = \sum C_i Z_i^2 / 2$$

Ecuación. 1

I. Vectores víricos

[00106] Un vector vírico que comprende ácido nucleico vírico encapsidado en una cápside proteica puede suministrar el ácido nucleico de vector vírico a células o tejidos. Dependiendo del vector particular, el vector vírico puede comprender además una envoltura vírica. Los ejemplos de vectores víricos que se pueden usar para el suministro de genes incluyen vectores de adenovirus, rAAV, vectores de retrovirus y vectores de herpes simple.

[00107] Existen serotipos diferentes dentro de diferentes tipos de virus. Los serotipos diferentes pueden proporcionar diferentes actividades, tales como tropismo celular o tisular y la probabilidad de generar una respuesta inmunitaria del huésped. El término “serotipo” se refiere en términos generales a virus serológicamente distintos así como a virus serológicamente no distintos que pueden estar dentro de un subgrupo o una variante de un serotipo determinado. El carácter distintivo serológico se puede determinar en base a la falta de reactividad cruzada entre anticuerpos con una cápside en comparación con otra cápside. Tales diferencias en la reactividad cruzada se deben, en general, a diferencias en secuencias de proteína de cápside/determinantes antigénicos (por ejemplo, debido a diferencias en secuencias VP1, VP2 y/o VP3 de serotipos de AAV).

[00108] A medida que se descubren más aislados de virus naturales o se generan mutantes de cápside, puede haber o no diferencias serológicas con respecto a cualquiera de los serotipos existentes actualmente. Por tanto, en casos donde el nuevo virus no tiene diferencia serológica, este nuevo virus sería un subgrupo o variante del serotipo correspondiente.

I.A. Vectores de adenovirus

[00109] Los adenovirus son virus de ADN bicatenario sin envoltura. Los vectores de adenovirus recombinantes comprenden ácido nucleico de adenovirus recombinante que carece de una o más proteínas implicadas en la replicación vírica y comprenden además una cápside adenovírica. Se pueden producir vectores de adenovirus recombinantes que contengan diferentes cantidades de ADN adenovírico. El genoma del adenovirus (Ad) está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en forma de horquilla cuya longitud varía de 30–371 pb en sus extremos. Las ITR actúan como estructuras autocebantes que promueven la replicación del ADN independiente de la primasa. Para el empaquetamiento del genoma vírico se requiere una señal de empaquetamiento localizada en el brazo izquierdo del genoma. (Liu y Seol (2020) BMB Reports; 53(11):565-575; y Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

[00110] En determinados modos de realización, el vector de adenovirus recombinante es un vector de tercera generación, también denominado “huecos” o “dependiente de auxiliar”. Se pueden producir vectores huecos a partir de ácido nucleico de adenovirus recombinante donde no están presentes todas o sustancialmente todas las secuencias virales, excepto las ITR y la señal de empaquetamiento. Los vectores de adenovirus huecos son vectores de alta capacidad capaces de alojar hasta aproximadamente 36 kb de inserto de ADN. El ácido nucleico del adenovirus recombinante preferido es de

aproximadamente 27 kb a aproximadamente 37 kb. Se pueden añadir secuencias de completamiento al ácido nucleico de adenovirus recombinante para incrementar el tamaño del ácido nucleico y la incorporación de la cápside. Las secuencias de completamiento preferentes evitan secuencias codificantes, secuencias repetitivas, secuencias de recombinación y secuencias inmunogénicas. (Liu y Seol (2020) BMB Reports, 53(11):565-575; Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53; y Sandig et al., PNAS (2000) 97(3):1002-1007, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

[00111] En determinados modos de realización, se pueden producir vectores de adenovirus recombinantes en base a serotipos humanos raros o serotipos de chimpancé. El uso de serotipos de chimpancé y humanos raros puede ser útil para reducir la respuesta inmunitaria del huésped contra vectores de adenovirus recombinantes debido a la inmunidad preexistente. (Guo et al., (2018) Human vaccines & immunotherapeutics, 14(7):1679–1685 y Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

[00112] Los vectores de adenovirus se pueden producir mediante el suministro de proteínas víricas necesarias para la producción del vector en trans usando, por ejemplo, virus o plásmidos auxiliares y líneas celulares apropiadas. (Liu y Seol (2020) BMB Reports; 53(11):565-575; y Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

I.B. Vectores AAV recombinantes

[00113] Los vectores de virus adenoasociados recombinantes se basan en el virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un virus de ADN monocatenario que contiene un genoma de 4,7 kb flanqueado por ITR de 145 nt en ambos extremos del genoma. La actividad de las ITR es importante para el autocebado y el empaquetamiento, y también puede proporcionar actividad adicional tal como actividad promotora. Las ITR 5' y 3' de AAV pueden variar en tamaño y no es necesario que las repeticiones invertidas 5' y 3' sean repeticiones invertidas exactas.

[00114] Un vector rAAV contiene ácido nucleico recombinante de AAV y una cápside vírica. El ácido nucleico recombinante de rAAV carece de una o más proteínas de AAV implicadas en la replicación vírica. En determinados modos de realización, el vector rAAV contiene una ITR 5' y/o 3' de AAV junto con un inserto de ADN. En determinados modos de realización, el ácido nucleico de rAAV comprende una ITR 5' y/o una ITR 3' seleccionadas independientemente de las ITR 5' y 3' proporcionadas en las ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.10, AAVrh.74 y AAV3B. En otros modos de realización están presentes ITR 5' y

3', y ambas ITR son de genoma del mismo serotipo.

[00115] Los vectores víricos adenoasociados recombinantes típicamente aceptan insertos de ADN que tienen un intervalo de tamaño en general de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5,2 kb. Si es necesario, se pueden usar secuencias de completamiento para incrementar el tamaño del ácido nucleico de rAAV y la eficiencia de empaquetamiento. En determinados modos de realización, el ácido nucleico de rAAV que incluye el completamiento es menor de 5,5 kb. En otros modos de realización, el ácido nucleico de rAAV que incluye el completamiento es menor que 5,2 kb, menor que 5,1 kb, menor que 5,0 kb, menor que 4,9 kb, menor que 4,8 kb, menor que 4,7 kb, menor que 4,6 kb; entre 4 kb y 5,2 kb, 3,0 kb y 5,5 kb, 4,0 kb y 5,0 kb, o 4,3 kb y 4,8 kb; o aproximadamente 4,2 kb, aproximadamente 4,3 kb, aproximadamente 4,4 kb, aproximadamente 4,5 kb, aproximadamente 4,6 kb, aproximadamente 4,7 kb, aproximadamente 4,8 kb, aproximadamente 4,9 kb o aproximadamente 5,0 kb. Las secuencias de completamiento preferentes evitan secuencias codificantes, secuencias repetitivas, secuencias de recombinación y secuencias inmunogénicas.

[00116] En determinados modos de realización, el rAAV es un vector de virus adenoasociado autocomplementario (scAAV) o un vector de virus adenoasociado de horquilla corta (shAAV). El scAAV y el shAAV proporcionan un ácido nucleico de rAAV bicatenario que se puede incorporar a una cápside de AAV. El scAAV y el shAAV comprenden repeticiones diméricas invertidas que proporcionan ADN bicatenario intramolecular. El scAAV se puede producir mediante la mutación de un sitio de resolución terminal de ITR, de modo que rep no pueda cortar el sitio de resolución terminal. El shAAV puede utilizar una horquilla corta para producir ácido nucleico de AAV bicatenario. El hecho de que el scAAV y el shAAV sean ADN bicatenario proporciona una ventaja al eludir la etapa de síntesis de ADN requerida para el ácido nucleico de rAAV monocatenario al ingresar a la célula. Una desventaja potencial de scAAV y shAAV es que el tamaño de los insertos de ADN que se pueden incorporar se reduce aproximadamente a la mitad en comparación con el ácido nucleico de rAAV monocatenario. (Patente de EE. UU. n.º 10,457,940; Xie et al., Mol Ther. (2017) 25(6):1363-1374; y McCarty Mol. Ther. (2008) 16(10):1648-1656; cada una de las cuales se incorpora de este modo en el presente documento por referencia en su totalidad).

[00117] Las cápsides de AAV naturales contienen las proteínas víricas VP1, VP2 y VP3 en una proporción de aproximadamente 1:1:10. Se pueden producir vectores AAV donde las tres proteínas víricas se basan en serotipos particulares o donde una, dos o las tres proteínas víricas se basan en serotipos diferentes.

[00118] La cápside y el ácido nucleico del AAV recombinante pueden basarse en el mismo serotipo (o subgrupo o variante) o pueden ser diferentes entre sí. En determinados modos de realización, un ácido nucleico de rAAV tiene el genoma (por ejemplo, ITR) del mismo serotipo que la proteína de la cápside encapsidante.

[00119] En diferentes modos de realización, la cápside de rAAV comprende una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,1 %, al menos 99,2 %, al menos 99,3 %, al menos 99,4 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 % o 100 % idéntica a una VP1, VP2 o VP3 de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.74, AAV3B, AAV-2i8, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS o AAV1/rh.10; o VP1 de SEQ ID NO: 1. Cápsides de AAV recombinantes que comprenden VP1 de SEQ ID NO: 1 se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 9840719, y se incorpora en el presente documento por referencia.

[00120] En determinados modos de realización, las cápsides de AAV comprenden VP1, VP2 y VP3, cada una de las cuales tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % con una VP1, VP2 o VP3 de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.74, AAV3B, AAV-2i8, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS, AAV1/rh.10, así como variantes (por ejemplo, variantes de la cápside, tales como inserciones, adiciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos) de las mismas. (Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 9,909,142 y 9,840,719 que divulgan RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6; y la publicación de patente de EE. UU. n.º 2013/0059732.

[00121] En determinados modos de realización, la cápside de rAAV comprende VP1 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En otro modo de realización, la cápside de AAV comprende además VP2 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. En un modo de realización preferente, la cápside de AAV comprende VP1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, VP2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 y VP3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

[00122] El genoma del AAV contiene dos genes principales: rep y cap. La transcripción del gen rep se inicia a partir de dos promotores diferentes, lo que da como resultado la

producción de proteínas no estructurales designadas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Las proteínas rep funcionan en la replicación y/o encapsidación del genoma. El gen cap codifica proteínas estructurales que forman la cápside (VP1, VP2 y Vp3); una proteína activadora del ensamblaje no estructural (APP), que realiza funciones relacionadas con el ensamblaje de la cápside; y la proteína auxiliar asociada a la membrana, que se puede asociar con las fases de producción del ciclo de replicación. (Maurer y Weitzman (2020) Hum. Gene Ther. 31(9-10):499-511, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad).

[00123] El AAV requiere funciones de virus auxiliares para completar su ciclo de replicación. Diferentes virus pueden desempeñar las funciones de virus auxiliares en líneas celulares permisivas. Las líneas celulares permisivas son líneas celulares capaces de dar soporte a la replicación vírica. Los ejemplos de virus auxiliares para AAV incluyen adenovirus, HSV-1, HPV-16 y HBoV1 que se pueden usar junto con, por ejemplo, células de primates permisivas; y baculovirus que se pueden usar junto con, por ejemplo, células de insectos permisivas tales como sf9. (Maurer y Weitzman (2020) Hum. Gene Ther. (2020) 31(9-10):499-511 y Meier et al., (2020) Viruses 19;12(6):662, ambos incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad).

[00124] El AAV recombinante se puede producir mediante el suministro de proteínas víricas necesarias para la producción del vector en trans usando, por ejemplo, virus auxiliares o plásmidos y líneas celulares apropiados. En determinados modos de realización, el rAAV se produce usando un plásmido del genoma del vector rAAV. El plásmido comprende aquella porción del ácido nucleico de rAAV en última instancia empaquetada o encapsidada para formar un vector vírico (por ejemplo, rAAV). La “estructura principal del plásmido” contiene elementos importantes para la propagación y producción de virus recombinantes. A excepción de posibles restos de clonación 3' ITR y/o 5' ITR, la estructura principal del plásmido no está empaquetada ni encapsidada en partículas virales.

[00125] El plásmido del genoma del vector puede contener regiones tales como un origen de replicación y un marcador de selección. Los sitios adicionales que pueden estar presentes incluyen sitios de clonación.

II. Formulaciones

[00126] En determinados modos de realización, la presente divulgación está dirigida a composiciones y procedimientos para la formulación y uso de productos de genoterapia. En determinados modos de realización, la solicitud se refiere a formulaciones de rAAV que mantienen un rendimiento predecible (estable) de

congelación-descongelación y liofilización (secado por congelación) y permiten un almacenamiento en estantería a largo plazo a temperaturas por encima de -60 °C con retención de la recuperación de genomas y atributos de calidad críticos. En determinados modos de realización, la selección de componentes específicos de la formulación de rAAV puede afectar atributos de calidad críticos específicos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los autores de la invención muestran que un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8 en las formulaciones puede ser ventajoso para potenciar la estabilidad y minimizar la degradación a diferentes temperaturas de almacenamiento (por ejemplo, 2-8 °C, -20 °C) y en condiciones de estrés. Además, las formulaciones descritas en el presente documento emplean una fuerza iónica menor que las formulaciones de rAAV convencionales y permiten un almacenamiento ventajoso a temperaturas mayores sin comprometer la calidad, la estabilidad y la funcionalidad, contrariamente a las creencias en general aceptadas (véase, Wright, J. Frasier, et al., "Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation", *Molecular Therapy*, (2005) 12:1, Rodrigues, Gerard A., et al., "Pharmaceutical development of AAV-based gene therapy products for the eye", *Pharmaceutical Research*, (2019) 36:29, y Srivastava, Arvind, et al. "Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors", *Journal of Pharmaceutical Sciences* 110.7 (2021): 2609-2624).

[00127] En determinados modos de realización, Los autores de la invención divulgan formulaciones de fuerza iónica baja (20-50 mM) y fuerza iónica moderada (50-95 mM) que mantienen atributos de calidad críticos clave. Se sabe que estos atributos se correlacionan con la seguridad y la eficacia, y con un tiempo de vida útil prolongado (>1,5 años). Se necesita un tiempo de vida útil prolongado en el campo para una formulación de rAAV con un perfil de CQA como el que se muestra aquí, dados los desafíos para el suministro y la distribución en todo el mundo en estados líquidos y congelados.

[00128] En algunos modos de realización, la formulación divulgada es susceptible a la liofilización, lo que extiende aún más el tiempo de vida útil y facilita el suministro y la distribución. A diferencia de las formulaciones de rAAV convencionales almacenadas a -80 °C, la formulación (F1) de fuerza iónica baja, que contiene azúcar y un pH bajo (pH 5,2) presenta una estabilidad y retención de calidad superiores en condiciones de temperatura tales como -20 °C, -40 °C y -80 °C durante un periodo de tiempo de almacenamiento prolongado (es decir, de 6 meses a 3 años). La formulación de fuerza

iónica moderada (F3) presenta una estabilidad y retención de calidad adecuadas en condiciones de temperatura tales como -20°C , -40°C y -80°C durante un periodo de tiempo de almacenamiento prolongado (es decir, de 6 meses a 3 años).

[00129] En determinados modos de realización, la proporción de las partículas vacías en la preparación con respecto a las partículas de rAAV llenas, también denominada proporción E/F, es preferentemente no más de 1:9 (vacías: llenas), que incluye no más de 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, o cualquier proporción intermedia, más preferentemente no menos de 1:49. En otros modos de realización, la proporción de las partículas vacías en la preparación con respecto a las partículas de rAAV llenas es preferentemente no más de 3:7, que incluye no más de 3:8, 3:9, 3:10, 3:11, 3:12 o cualquier proporción intermedia. En otros modos de realización, la proporción de las partículas vacías en la preparación con respecto a las partículas de rAAV llenas es preferentemente no más de 0:1.

[00130] En determinados modos de realización, Las formulaciones de rAAV de la presente divulgación comprenden: una pluralidad de genomas de rAAV; una sal o una mezcla de sales para ajustar la fuerza iónica de la formulación; un agente tampón; un azúcar; y un tensioactivo. Por ejemplo, en determinados modos de realización, la pluralidad de genomas de rAAV están presentes en una concentración de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{15} vg/ml (genomas víricos/ml) que incluyen 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} vg/ml o cualquier concentración intermedia.

[00131] En determinados modos de realización, el agente tampón en las formulaciones de rAAV de la presente divulgación es un agente tampón no fosfato. En determinados modos de realización, el agente tampón no fosfato es acetato de sodio. En determinados modos de realización, el agente tampón no fosfato es Tris (Tris(hidroximetil)aminometano), HEPES, citrato de sodio, succinato y mezclas de los mismos.

[00132] En determinados modos de realización, el agente tampón no fosfato está presente en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM (para fuerza iónica baja), tal como 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM o cualquier concentración intermedia. En determinados modos de realización, el agente tampón no fosfato está presente en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM (para una fuerza iónica moderada), que incluye 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM o cualquier concentración intermedia. En determinados modos

de realización, el agente tampón no fosfato es acetato de sodio presente en una concentración de aproximadamente 25 mM.

[00133] En determinados modos de realización, la sal que determina la fuerza iónica de las formulaciones de la presente divulgación es cloruro de sodio. En determinados modos de realización, el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 180 mM, que incluye 1 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM o cualquier concentración intermedia. En determinados modos de realización, el cloruro de sodio está preferentemente en una concentración de aproximadamente 60 mM. En determinados modos de realización, el cloruro de sodio está presente lo más preferentemente en una concentración de aproximadamente 25 mM.

[00134] En determinados modos de realización, la sal usada como excipiente en las formulaciones de la presente divulgación, es cloruro de magnesio. En determinados modos de realización, el cloruro de magnesio está presente en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, que incluye 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM o cualquier concentración intermedia. En algunos modos de realización, el sacárido está presente en una concentración de aproximadamente 5 mM.

[00135] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente solicitud comprenden un azúcar. En determinados modos de realización, el contenido de azúcar de la formulación es de aproximadamente 0 % a aproximadamente 20 %, que incluye 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % o cualquier concentración intermedia. En determinados modos de realización, el contenido de azúcar de la formulación es preferentemente de aproximadamente 5,4 %. En determinados modos de realización, el azúcar es sacarosa. En determinados modos de realización, el contenido de azúcar, que incluye el contenido de sacarosa, de la formulación es de aproximadamente 3 %.

[00136] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación comprende un tensioactivo. En determinados modos de realización, el tensioactivo está presente en una concentración de entre aproximadamente 0 y 0,05 %, que incluye 0 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 % o cualquier concentración intermedia. En determinados modos de realización, el tensioactivo es poloxámero 188 (Pluronic® f-68 o P188). En determinados modos de

realización, el(los) tensioactivo(s) se selecciona(n) de polisorbato 20 (PS20), polisorbato 80 (PS80) o una combinación de los mismos. En determinados modos de realización, el poloxámero 188 está presente lo más preferentemente en una concentración de aproximadamente 0,01 %. En determinados modos de realización, el poloxámero 188 está presente en una concentración de aproximadamente 0,001 %.

[00137] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación contienen un estabilizador. En determinados modos de realización, el estabilizador es un aminoácido. En determinados modos de realización, el aminoácido es arginina o histidina.

[00138] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación se preparan de modo que el pH sea de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, que incluye 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, o cualquier pH intermedio. En determinados modos de realización, el pH es lo más preferentemente de aproximadamente 5,2. En determinados modos de realización, el pH es de aproximadamente 7,4.

[00139] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación comprenden aproximadamente 25 mM de acetato de Na, aproximadamente 25 mM de NaCl, aproximadamente 5 mM de Mg₂Cl, pH de aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4 % de sacarosa y aproximadamente 0,01 % de poloxámero 188, denominadas en el presente documento "Formulación 1" o "F1".

[00140] En determinados modos de realización, el agente tampón en las formulaciones de rAAV de la presente divulgación es un agente tampón de fosfato. En determinados modos de realización, el agente tampón de fosfato es fosfato de sodio. En determinados modos de realización, el agente tampón de fosfato está presente en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, que incluye 1 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM o cualquier concentración intermedia. En determinados modos de realización, el agente tampón de fosfato es fosfato de sodio presente a aproximadamente 10 mM.

[00141] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación comprenden aproximadamente 10 mM de fosfato de sodio, 60 mM de cloruro de sodio, pH de aproximadamente 7,4, 3 % de sacarosa, 0,001 % de poloxámero 188, denominadas en el presente documento como "Formulación 3" o "F3".

[00142] En determinados modos de realización, la formulación mantiene su pH dentro de +/- 0,1 pH cuando se almacena a -40 °C durante 6 meses. En determinados modos de realización, la formulación mantiene su pH dentro de +/- 0,1 pH cuando se almacena

a -40 °C durante 2 meses. En determinados modos de realización, la formulación mantiene su pH dentro de +/- 0,1 pH cuando se almacena a -20 °C durante 6 meses. En determinados modos de realización, la formulación mantiene su pH dentro de +/- 0,1 pH cuando se almacena a -20 °C durante 2 meses. En determinados modos de realización, la formulación mantiene su pH dentro de +/- 0,1 pH cuando se almacena a 5 °C durante 6 meses. En determinados modos de realización, la formulación mantiene su pH dentro de +/- 0,1 pH cuando se almacena a 5 °C durante 2 meses.

[00143] En determinados modos de realización de la presente divulgación, la formulación de rAAV presenta una temperatura de transición vítrea del concentrado congelado de aproximadamente -39 °C. En determinados modos de realización, es beneficioso almacenar los productos biológicos por debajo de la temperatura de transición vítrea para una estabilidad potenciada y una movilidad mínima. El incremento de Tg' (temperatura de transición vítrea) también permite el almacenamiento a temperaturas mayores que -80 °C, lo que es favorable y muy conveniente considerando la facilidad de las prácticas de la cadena de suministro, que incluyen la manipulación/envío y el almacenamiento a temperaturas mayores. También es un enfoque susceptible a adoptarse ya que maximiza la garantía de esterilidad (es decir, el almacenamiento a baja temperatura puede comprometer los sistemas de cierre de recipientes, ya que -80 °C en general está por debajo de la transición vítrea de los plásticos y el caucho, por lo que el plástico en general se vuelve quebradizo a estas bajas temperaturas).

[00144] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación se preparan de modo que la formulación presente una recuperación similar o mejor de genomas de vector (recuperación de genomas) después del almacenamiento en diferentes condiciones en comparación con la recuperación de genomas de la misma formulación antes del almacenamiento. En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación se preparan de modo que la formulación presente una recuperación de genomas de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a 5 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la recuperación de genomas de la misma formulación antes del almacenamiento. La recuperación de genomas se puede medir como se describe en los

ejemplos a continuación.

[00145] En determinados modos de realización, la formulación presenta una recuperación de genomas de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a -40 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la recuperación de genomas de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00146] En determinados modos de realización, la formulación presenta una recuperación de genomas de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a -20 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la recuperación de genomas de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00147] En determinados modos de realización, la formulación presenta una recuperación de genomas de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a 5 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la recuperación de genomas de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00148] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación se preparan de modo que la formulación conserve una potencia similar o mejor después del almacenamiento en diferentes condiciones en relación con la de la misma formulación antes del almacenamiento (potencia relativa). En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación se preparan de modo que la formulación presente una potencia relativa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a 5 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5

meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la potencia relativa de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00149] En determinados modos de realización, la formulación presenta una potencia relativa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a -20 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la potencia relativa de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00150] En determinados modos de realización, la formulación presenta una potencia relativa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a -40 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la potencia relativa de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00151] En determinados modos de realización, la formulación presenta una potencia relativa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 % (que incluye 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 % o cualquier porcentaje intermedio) después del almacenamiento a -80 °C durante aproximadamente 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años o 3 años en comparación con la potencia relativa de la misma formulación antes del almacenamiento.

[00152] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación se preparan de modo que la formulación sea susceptible a inyección intravenosa, intraarterial, intraocular, intratecal o intracerebral. En determinados modos de realización, la formulación es un líquido. En determinados modos de realización, la formulación es susceptible a la liofilización. En determinados modos de realización, la formulación está en un recipiente de dosificación unitaria. En determinados modos de realización, el recipiente de dosificación unitaria es un vial. En determinados modos de realización, el vial es un vial de vidrio sellado. En determinados

modos de realización, el vial es un vial de polímero de olefina cíclica, también conocido como vial CZ.

[00153] En determinados modos de realización, las formulaciones de rAAV de la presente divulgación incluyen diversas cepas o serotipos víricos. En determinados modos de realización no limitantes, un rAAV puede basarse en cualquier genoma de AAV, que incluye, pero sin limitarse a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, Rh8, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8, RHM4-1, DJ, DJ8, NP59, Anc-80 y variantes de los mismos, que incluyen las variantes de las cápsides de AAV expuestas en Pulicherla et al., Mol. Ther., 19(6) 1070-1078 (2011) (que describe variantes de AAV9 que incluyen AAV9.47, entre otras), patente de EE. UU. n.º 7,906,111 (que describe AAV9(hu14), entre otras), patente de EE. UU. n.º 10,532,111 (que describe NP59, entre otras), patente de EE. UU. n.º 10,738,087 (que describe Anc80, entre otras), documentos WO2012/145601, WO2013/158879, WO2015/013313, WO2018/156654, patente de EE. UU. n.º 9,840,719 (que describe RHM4-1), 7,749,492, 7,588,772 (que describe DJ y DJ8) y 9,587,282, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades. Por lo tanto, los vectores rAAV incluyen secuencias de genes/proteínas idénticas a las secuencias de genes/proteínas características de un serotipo particular, así como serotipos mixtos.

[00154] En determinados modos de realización, el pH de la formulación se ajusta antes de la administración.

III. rAAV que comprende un gen de interés (GOI)

[00155] En determinados modos de realización, el rAAV comprende un gen de interés (GOI). En determinados modos de realización no limitantes, el GOI comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica o una secuencia de ácido nucleico inhibidora. En determinados modos de realización, el GOI se puede introducir/transferir por medio de un vector, que incluye la transducción o transfección de rAAV en una célula. En determinados modos de realización, el GOI introducido también puede existir en la célula receptora o el organismo hospedero de forma extracromosómica o solo de forma transitoria.

[00156] En determinados modos de realización, el GOI codifica una proteína (por ejemplo, proteína terapéutica) que se proporciona en formas modificadas o truncadas o el GOI se proporciona en múltiples construcciones, administradas por vectores AAV separados y múltiples.

[00157] En determinados modos de realización, el GOI se proporciona como una

variante truncada que mantiene la funcionalidad de la proteína codificada (por ejemplo, proteína terapéutica), lo que incluye la eliminación de porciones innecesarias para la función, de modo que el tamaño del GOI se reduce para el empaquetamiento en un vector AAV.

[00158] En determinados modos de realización, el GOI se proporciona en vectores AAV divididos, cada uno de los cuales proporciona ácido nucleico que codifica diferentes porciones de una proteína (por ejemplo, proteína terapéutica), que de esta manera suministra múltiples porciones de una proteína (por ejemplo, proteína terapéutica) que se ensamblan y funcionan en la célula productora de rAAV de mamífero de la presente divulgación.

[00159] En determinados modos de realización, el GOI es proporcionado por vectores duales de AAV que usan tecnología de vectores duales de superposición, trans-empalme o trans-empalme híbrido. En determinados modos de realización, se usan dos vectores AAV superpuestos que se combinan en la célula productora de rAAV de mamífero de la presente divulgación para generar un casete de expresión completo, a partir del cual se expresa una proteína de longitud completa (por ejemplo, proteína terapéutica).

[00160] Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos heterólogos que codifican productos génicos (por ejemplo, proteínas terapéuticas) que son útiles de acuerdo con la invención incluyen aquellos que se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que incluyen, pero sin limitarse a, "hemostasia" o trastornos de coagulación de la sangre que incluyen hemofilia A, pacientes con hemofilia A con anticuerpos inhibidores, hemofilia B, deficiencias en los factores de coagulación, VII, VIII, IX y X, XI, V, XII, II, factor de von Willebrand, deficiencia combinada de FV/FVIII, talasemia, deficiencia de vitamina K epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma-carboxilasa; anemia, hemorragia asociada con traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, apoplejía, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC); sobreanticoagulación asociada con heparina, heparina de peso molecular bajo, pentasacárido, warfarina, antitrombóticos de molécula pequeña (es decir, inhibidores de FXa); y trastornos plaquetarios que incluyen, síndrome de Bernard Soulier (BSS), trombastemia de Glanzman (GT) y deficiencia de reserva de almacenamiento.

[00161] En determinados modos de realización, la enfermedad o trastorno afecta o se origina en el sistema nervioso central (CNS). En determinados modos de realización, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa. En determinados modos de realización, la enfermedad del CNS o neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer

(AD), la enfermedad de Huntington (HD), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la hemiplejía espástica hereditaria, la esclerosis lateral primaria (PLS), la atrofia muscular espinal (SMA), la enfermedad de Kennedy (atrofia muscular espinal y bulbar o SBMA), una enfermedad de repetición de poliglutamina o la enfermedad de Parkinson. En determinados modos de realización, el CNS o enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de repetición de poliglutamina. En determinados modos de realización, la enfermedad de repetición de poliglutamina es una ataxia espinocerebelosa (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 o SCA17).

[00162] En determinados modos de realización, las partículas de rAAV presentes en las formulaciones de la presente divulgación comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un producto génico seleccionado del grupo que consiste en insulina, glucagón, hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de hormona de crecimiento (GRF), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), TGF β , activinas, inhibinas, proteína morfogénica ósea (BMP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de células gliales (GNFD), neurina, agrina, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), efrinas, noggina, hedgehog sónico, tirosina hidroxilasa.

[00163] En determinados modos de realización, las partículas de rAAV presentes en las formulaciones de la presente divulgación comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un producto génico seleccionado del grupo que consiste en trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL1 a IL-17), proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral α y β , interferones α , β y γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, receptores de células T, receptores de células T quiméricas, receptores de células T de cadena simple, moléculas de MHC de clase I y clase II.

[00164] En determinados modos de realización, las partículas de rAAV presentes en las formulaciones de la presente divulgación comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un producto génico seleccionado a partir del grupo que consiste en carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor V, factor VIII, factor IX, cistación beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, mutasa CoA de metil malonilo, deshidrogenasa CoA de glutarilo insulina, beta-glucosidasa, carboxilato de piruvato, fosforilasa hepática, cinasa de fosforilasa, glicina descarboxilasa (GLDC), RPE65, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora de transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y una secuencia de ADNc de distrofina

[00165] En determinados modos de realización, las partículas de rAAV presentes en las formulaciones de la presente divulgación comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido, un ácido nucleico que codifica una proteína o se transcribe en un transcrito de interés, o ácido nucleico, seleccionado del grupo que consiste en un ARNip, una molécula antisentido, miARN, una ribozima y un ARNhc.

[00166] En determinados modos de realización, las partículas de rAAV presentes en las formulaciones de la presente solicitud comprenden un nucleico heterólogo que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en GAA (alfa-glucosidasa ácida) para el tratamiento de la enfermedad de Pompe; ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre) para el tratamiento de la enfermedad de Wilson; alfa galactosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Fabry; ASS1 (arginosuccinato sintetasa) para el tratamiento de la citrulinemia tipo 1; beta-glucocerebrosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo 1; beta-hexosaminidasa A para el tratamiento de la enfermedad de Tay Sachs; SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1) para el tratamiento de angioedema hereditario (HAE), también conocido como deficiencia de inhibidor C1 tipo I y tipo II); y glucosa-6-fosfatasa para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I (GSDI).

[00167] En determinados modos de realización, un ácido nucleico heterólogo presente en el rAAV presente en las formulaciones de la presente divulgación codifica CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C, etc.), una ganancia de función del factor de coagulación sanguínea, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65),

eritropoyetina, receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad), lipasa de lipoproteína (LPL), ornitina transcarbamilasa (OTC), β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metales (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en la enfermedad de almacenamiento lisosómico (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento derivado de línea celular de la glía (GDNF), factor de crecimiento transformante α y β , una citocina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), linfotóxina (LT), un producto génico suicida, timidina cinasa del virus del herpes simple, citosina desaminasa (CD), toxina diftérica (DT), citocromo P450 (CYP), desoxicitidina cinasa (DCK), factor de necrosis tumoral (TNF), una proteína de resistencia a fármacos, una proteína supresora de tumor (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido o proteína tolerogénico o inmunogénico Tregitope o hCDR1 (Edratide), insulina, glucocinasa (GCK), guanilato ciclasa 2D (GUCY2D) (o amaurosis congénita de Leber (LCA) asociada con variantes de GUCY2D (GUCY2D-LCA)), proteína acompañante Rab 1 (REP1) (coroideremia (CHM) codifica REP1), LCA 5 (amaurosis congénita de Leber 5) (LCA-Lebercilina), ornitina cetoácido aminotransferasa (atrofia girada), retinosquisina 1 (retinosquiasis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (sordera por conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad poliquística del riñón), TPP1 (tripeptidil peptidasa 1), CLN2 (lipofuscinosis neuronal ceroid 2), una sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP (activador del gangliósido GM2), NPC1 (NPC transportador de colesterol intracelular 1), VPC2, una proteína activadora de esfingolípidos, una o más nucleasas con dedos de zinc para la edición del genoma, o una o más secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma, y variantes de los mismos.

[00168] Las moléculas de ácido nucleico, vectores que incluyen vectores de clonación, expresión (por ejemplo, genomas de vector) y plásmidos, se pueden preparar

usando procedimientos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de la información de la secuencia de nucleótidos permite la preparación de las moléculas de ácido nucleico por una variedad de medios. Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo que codifica el Factor IX (FIX) que comprende un vector o plásmido se puede producir usando diversas técnicas estándar de clonación, tecnología de ADN recombinante, por medio de expresión celular o traducción in vitro y síntesis química. La pureza de los polinucleótidos se puede determinar a través de secuenciación, electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar por medio del uso de técnicas de hibridación o de selección de bases de datos computarizadas. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a: (1) hibridación de bibliotecas de ADN genómico o ADNc con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas; (2) cribado de anticuerpos para detectar polipéptidos que tienen características estructurales compartidas, por ejemplo, que usa una biblioteca de expresión; (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ADN genómico o ADNc que usa cebadores capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas informáticas de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) cribado diferencial de una biblioteca de ácido nucleico sustraída.

IV. Secuencias

SEQ ID NO: 1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKG
EPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAFAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKR
VLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQSRPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDP
QPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRTVITSTRTW
ALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSPRDWQRLINNNWGRF
PKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADV
FMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFESYNFEDVPFHSSYAHSQSLD
RLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSL
QNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQGAGKDNVDYS
SVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP
WAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVS
VEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 2

TAPGKKRPVEPSPQSRPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPPAGPSGL
GSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRTVITSTRTWALPTYNNHLYKQI
SNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSPRDWQRLINNNWGRF PKRLNFKLFNIQV
KEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN
GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFESYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
LSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGAT
KYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTT
NPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHP
SPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 3

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD RVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGT
SGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVT
QNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA
VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRT
QSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHL
NGRDSLVPNGVAMATHKDDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVA
TEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLM
GGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNP
EIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

MODOS DE REALIZACIÓN

[00169] La solicitud incluye, pero no se limita a, los siguientes modos de realización numerados:

[00170] Modo de realización 1. Una formulación estable que comprende un producto farmacéutico terapéutico y:

- (a) 1-100 mM de una o más sales;
- (b) un agente tampón;
- (c) 0,001-0,05 % en peso de uno o más tensioactivos no iónicos;
- (d) 1-10 % en peso de uno o más azúcares; y
- (e) agua,
- (f) opcionalmente, uno o más aminoácidos, y

en el que la composición tiene un pH de 4,5-7,5 (tal como 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 o cualquier pH intermedio), y el 60 % o más (tal como 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier porcentaje intermedio) del producto farmacéutico se recupera después de congelar y descongelar la formulación.

[00171] Modo de realización 2. La formulación estable del modo de realización 1, en la que el producto farmacéutico terapéutico es un virus adenoasociado recombinante (AAV o rAAV).

[00172] Modo de realización 3. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-2, en la que el agente tampón comprende un agente tampón no fosfato.

[00173] Modo de realización 4. La formulación estable del modo de realización 3, en la que el agente tampón no fosfato es acetato de sodio.

[00174] Modo de realización 5. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 3-4, en la que el agente tampón no fosfato está presente en la formulación en una concentración de 1 mM a aproximadamente 50 mM.

[00175] Modo de realización 6. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-5, en la que la una o más sales incluyen 10-100 mM de cloruro de sodio.

- [00176]** Modo de realización 7. La formulación estable del modo de realización 6, en la que la una o más sales comprenden una primera sal y una segunda sal.
- [00177]** Modo de realización 8. La formulación estable del modo de realización 7, en la que la primera sal es cloruro de sodio y la segunda sal es cloruro de magnesio.
- [00178]** Modo de realización 9. La formulación estable del modo de realización 6, en la que el cloruro de sodio está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 25 mM.
- [00179]** Modo de realización 10. La formulación estable del modo de realización 8, en la que el cloruro de magnesio está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM.
- [00180]** Modo de realización 11. La formulación estable del modo de realización 10, en la que el cloruro de magnesio está presente en una concentración de aproximadamente 5 mM.
- [00181]** Modo de realización 12. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-11, en la que el azúcar es sacarosa.
- [00182]** Modo de realización 13. La formulación estable del modo de realización 12, en la que el contenido de sacarosa de la formulación es del 5,4 %.
- [00183]** Modo de realización 14. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-13, en la que el tensioactivo no iónico está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 0,01 %.
- [00184]** Modo de realización 15. La formulación estable del modo de realización 14, en la que el tensioactivo es poloxámero 188, polisorbato 20, polisorbato 80 o poloxámero 407.
- [00185]** Modo de realización 16. La formulación estable del modo de realización 15, en la que el tensioactivo es polisorbato seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 20 o polisorbato 80.
- [00186]** Modo de realización 17. La formulación estable del modo de realización 1, en la que el pH es de aproximadamente 5,2.
- [00187]** Modo de realización 18. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-2, en la que el agente tampón es un agente tampón de fosfato.
- [00188]** Modo de realización 19. La formulación estable del modo de realización 18, en la que el agente tampón de fosfato es fosfato de sodio.
- [00189]** Modo de realización 20. La formulación estable del modo de realización 19, en la que el fosfato de sodio está presente a aproximadamente 10 mM.
- [00190]** Modo de realización 21. La formulación estable de uno cualquiera de los

modos de realización 1-20, en la que la formulación se liofiliza.

[00191] Modo de realización 22. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-20, en la que la formulación es líquida.

[00192] Modo de realización 23. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-22, en la que el producto farmacéutico terapéutico es capaz de incrementar los niveles de proteínas en una célula de GAA (alfa-glucosidasa ácida), ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre), alfa galactosidasa A (GLA), ASS1 (arginosuccinato sintasa), beta-glucocerebrosidasa, beta-hexosaminidasa A, SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1), glucosa-6-fosfatasa, CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C), una ganancia de función del factor de coagulación sanguínea, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad), lipasa de lipoproteína (LPL), ornitina transcarbamilasa (OTC), β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metales (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en enfermedad de almacenamiento lisosómico (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento derivado de línea celular de la glía (GDNF), factor de crecimiento transformante α y β , una citocina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), linfotoxina (LT), un producto génico suicida, timidina cinasa del virus del herpes simple, citosina desaminasa (CD), toxina diftérica (DT), citocromo P450 (CYP), desoxicitidina cinasa (DCK), factor de necrosis tumoral (TNF), una proteína de resistencia a fármacos, una proteína supresora de tumor (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido o proteína tolerogénico o inmunogénico Tregitope o hCDR1 (Edratide), insulina, glucocinasa (GCK), guanilato ciclasa 2D (GUCY2D) (o amaurosis congénita de Leber (LCA) asociada con variantes de GUCY2D (GUCY2D-LCA)), proteína acompañante Rab 1

(REP1) (coroideremia (CHM) codifica REP1), LCA 5 (amaurosis congénita de Leber 5) (LCA-Lebercilina), ornitina cetoácido aminotransferasa (atrofia girada), retinosquisina 1 (retinosquiasis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (sordera por conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (acromatopsia), PKD-1+ o PKD-2 (enfermedad poliquística del riñón), TPP1 (tripeptidil peptidasa 1), CLN2 (lipofuscinosis neuronal ceroid 2), una sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP (activador del gangliósido GM2), NPC1 (NPC transportador de colesterol intracelular 1), VPC2, una proteína activadora de esfingolípidos, una o más nucleasas con dedos de zinc para la edición del genoma, una o más secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma o variantes de los mismos.

[00193] Modo de realización 24. Una formulación estable que comprende:

- (a) un virus adenoasociado recombinante (rAAV);
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua; y
- (h) a un pH de 5 a 5,5, tal como un pH de 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5 o cualquier pH intermedio.

[00194] Modo de realización 25. Una formulación estable que comprende:

- (a) un virus adenoasociado recombinante (rAAV);
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3.

[00195] Modo de realización 26. Una formulación estable, en la que la formulación comprende:

- (a) un virus adenoasociado recombinante (rAAV);
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;

- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 6,0.

[00196] Modo de realización 27. La formulación estable de los modos de realización 24-26, en la que el rAAV comprende una cápside derivada de uno o más AAV seleccionados del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, Rh8, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8, RHM4-1(VP1, SEQ ID NO: 1, o VP2, SEQ ID NO: 2, o VP3, SEQ ID NO: 3), DJ, DJ8, NP59, Anc-80 y variantes de los mismos.

[00197] Modo de realización 28. La formulación estable de los modos de realización 24 - 27, en la que el rAAV comprende un transgén que codifica un polipéptido o un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARNip, una molécula antisentido, un miARN, una ribozima y un ARNhc.

[00198] Modo de realización 29. La formulación estable del modo de realización 28, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica GAA (alfa-glucosidasa ácida), ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre), alfa galactosidasa A (GLA), ASS1 (arginosuccinato sintasa), beta-glucocerebrosidasa, beta-hexosaminidasa A, SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1), glucosa-6-fosfatasa, CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C), una ganancia de función del factor de coagulación sanguínea, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad), lipasa de lipoproteína (LPL), ornitina transcarbamilasa (OTC), β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metales (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en enfermedad de almacenamiento lisosómico (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento derivado de línea celular de la glía (GDNF), factor de crecimiento transformante α y β , una citocina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2

(IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), linfotóxina (LT), un producto génico suicida, timidina cinasa del virus del herpes simple, citosina desaminasa (CD), toxina diftérica (DT), citocromo P450 (CYP), desoxicitidina cinasa (DCK), factor de necrosis tumoral (TNF), una proteína de resistencia a fármacos, una proteína supresora de tumor (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel–Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido o proteína tolerogénico o inmunogénico Tregitope o hCDR1 (Edratide), insulina, glucocinasa (GCK), guanilato ciclasa 2D (GUCY2D) (o amaurosis congénita de Leber (LCA) asociada con variantes de GUCY2D (GUCY2D-LCA)), proteína acompañante Rab 1 (REP1) (coroideremia (CHM) codifica REP1), LCA 5 (amaurosis congénita de Leber 5) (LCA-Lebercilina), ornitina cetoácido aminotransferasa (atrofia girada), retinosquisina 1 (retinosquiasis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (sordera por conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (acromatopsia), PKD-1+ o PKD-2 (enfermedad poliquística del riñón), TPP1 (tripeptidil peptidasa 1), CLN2 (lipofuscinosis neuronal ceroid 2), una sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP (activador del gangliósido GM2), NPC1 (NPC transportador de colesterol intracelular 1), VPC2, una proteína activadora de esfingolípidos, una o más nucleasas con dedos de zinc para la edición del genoma, una o más secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma o variantes de los mismos.

[00199] Modo de realización 30. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica GAA (alfa-glucosidasa ácida).

[00200] Modo de realización 31. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre).

[00201] Modo de realización 32. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica alfa galactosidasa A (GLA).

[00202] Modo de realización 33. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica ASS1 (arginosuccinato sintasa).

[00203] Modo de realización 34. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica beta-glucocerebrosidasa.

[00204] Modo de realización 35. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el rAAV comprende el transgén que codifica beta-hexosaminidasa A.

[00205] Modo de realización 36. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el AAV comprende el transgén que codifica SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1).

[00206] Modo de realización 37. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el AAV comprende el transgén que codifica glucosa-6-fosfatasa.

[00207] Modo de realización 38. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el AAV comprende el transgén que codifica CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística).

[00208] Modo de realización 39. La formulación estable del modo de realización 29, en la que el AAV comprende el transgén que codifica un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (por ejemplo, factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C).

[00209] Modo de realización 40. La formulación estable de cualquiera de los modos de realización 1 a 39, en la que después de congelar la composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico o rAAV después de la descongelación en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[00210] Modo de realización 41. La formulación estable de cualquiera de los modos de realización 1 a 39, en la que después de congelar la composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, el producto farmacéutico o rAAV presenta al menos un 50 % de la potencia relativa en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[00211] Modo de realización 42. La formulación estable de cualquiera de los modos de realización 1 a 39, en la que después de congelar la composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, el producto farmacéutico o rAAV presenta una temperatura de transición vítrea de concentrado congelado de -45 °C a -35 °C, tal como -45 °C, -44 °C, -43 °C, -42 °C, -41 °C, -40 °C, -39 °C, -38 °C, -37 °C, -36 °C o -35 °C.

[00212] Modo de realización 43. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-39, en la que la composición se liofiliza.

[00213] Modo de realización 44. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-42, en la que la composición es líquida.

[00214] Modo de realización 45. Una composición liofilizada, en la que la composición está sustancialmente deshidratada y es capaz de formar la formulación de uno

cualquiera de los modos de realización anteriores mediante la reconstitución de la composición liofilizada con diluyente.

[00215] Modo de realización 46. La composición liofilizada de acuerdo con el modo de realización 45, en la que la reconstitución comprende combinar la composición liofilizada con agua para inyección (WFI).

[00216] Modo de realización 47. La formulación estable de uno cualquiera de los modos de realización 1-43 o la composición liofilizada de uno cualquiera de los modos de realización 44-46, en la que la formulación o composición está presente en un recipiente de dosificación unitaria.

[00217] Modo de realización 48. La formulación estable o la composición liofilizada del modo de realización 47, en la que el recipiente de dosificación unitaria es un vial.

[00218] Modo de realización 49. La formulación estable o la composición liofilizada del modo de realización 48, en la que el vial es un vial de vidrio sellado.

[00219] Modo de realización 50. Un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto farmacéutico terapéutico;
- (b) 1-100 mM de una o más sales;
- (c) un agente tampón;
- (d) 0,001-0,05 % en peso de uno o más tensioactivos no iónicos;
- (e) 3-10 % en peso de uno o más azúcares; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 4,5 a 7; y
- (h) opcionalmente, uno o más aminoácidos, y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de la descongelación en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[00220] Modo de realización 51. Un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;

- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de la descongelación en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[00221] Modo de realización 52. Un procedimiento para conservar al menos el 50 % de la potencia relativa de un producto farmacéutico terapéutico después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -60 °C y hasta -10 °C, tal como, por ejemplo -60 °C a -10 °C, -50 °C a -20 °C, -45 °C a -25 °C, o -30 °C a -40 °C, en la que después de la descongelación, dicho producto farmacéutico presenta al menos un 50 % de la potencia relativa en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C durante la misma duración.

[00222] Modo de realización 53. Un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa;

- (f) agua;
- (g) a un pH de 7,3; y

liofilizar dicha composición y almacenarla durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de reconstituir la composición liofilizada en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[00223] Modo de realización 54. Un procedimiento para reducir la degradación de un producto farmacéutico terapéutico, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

liofilizar dicha composición y almacenarla durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que se recupera el 60 % o más del producto farmacéutico terapéutico después de reconstituir la composición liofilizada en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[00224] Modo de realización 55. Un procedimiento para conservar al menos el 50 % de la potencia relativa de un producto farmacéutico terapéutico, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 7,3; y

liofilizar dicha composición y almacenarla durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que dicho producto farmacéutico presenta al menos un 50 % de la potencia relativa después de

reconstituir la composición liofilizada en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[00225] Modo de realización 56. Un procedimiento para conservar al menos el 50 % de la potencia relativa de un producto farmacéutico terapéutico, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el producto terapéutico;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

liofilizar dicha composición y almacenarla durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que dicho producto farmacéutico presenta al menos un 50 % de la potencia relativa después de reconstituir la composición liofilizada en comparación con el mismo producto almacenado a -80 °C sin liofilización.

[00226] Modo de realización 57. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 50-56, en el que el producto farmacéutico terapéutico es un virus adenoasociado recombinante (rAAV).

[00227] Modo de realización 58. Un procedimiento para reducir la desaminación de aminoácidos en la cápside de un rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua; y
- (h) a un pH de 5 a 5,5.

[00228] Modo de realización 59. Un procedimiento para reducir la degradación de proteínas víricas de un producto de rAAV después de congelar y descongelar la composición, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua; y
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

almacenar dicha composición congelada durante una duración a una temperatura entre -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que el cambio en la proporción VP1:VP3 es menor del 20 % en la composición descongelada en comparación con antes de congelar dicha composición.

[00229] Modo de realización 60. Un procedimiento para reducir la desaminación de aminoácidos en la cápside de un rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3.

[00230] Modo de realización 61. Un procedimiento para reducir la desaminación de aminoácidos en la cápside de un rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 6,0.

[00231] Modo de realización 62. Un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV después de congelar-descongelar

dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante al menos un año a -20 °C, en el que después de la descongelación, la concentración de SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00232] Modo de realización 63. Un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV después de congelar-descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante al menos un año a -20 °C, en el que después de la descongelación, la concentración de SVP es menor que 50 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 5 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes

[00233] Modo de realización 64. Un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV después de 5 ciclos de congelación-descongelación de dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;

- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que dicha composición se descongela y se vuelve a congelar cinco veces, y en la quinta descongelación, la concentración de SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00234] Modo de realización 65. Un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV después de 5 ciclos de congelación-descongelación de dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que dicha composición se descongela y se vuelve a congelar cinco veces, y en la quinta descongelación, la concentración de SVP es menor que 50 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 5 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00235] Modo de realización 66. Un procedimiento para reducir especies de peso molecular alto (HMW) en un producto de rAAV después de 5 ciclos de congelación-descongelación de dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante una duración a una temperatura por encima de -80 °C y hasta -10 °C, tal como una temperatura de -70 °C a -15 °C, -60 °C a -20 °C, -50 °C a -30 °C, o -45 °C a -35 °C, en la que dicha composición se descongela y se vuelve a congelar cinco veces, y en la quinta descongelación, las especies de HMW se incrementan en menos del 3 % en peso en comparación con el mismo producto a T0, según se mide por ultracentrifugación analítica.

[00236] Modo de realización 67. Un procedimiento para reducir especies de peso molecular alto (HMW) en un producto de rAAV después de congelar y descongelar dicho producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 25 mM de cloruro de sodio;
- (c) 5 mM de cloruro de magnesio;
- (d) 25 mM de acetato de sodio;
- (e) 0,01 % en peso de poloxámero 188;
- (f) 5,4 % en peso de sacarosa; y
- (g) agua;
- (h) a un pH de 5 a 5,5; y

congelar dicha composición durante al menos un año a -20 °C, en el que después de la descongelación, las especies de HMW se incrementan en menos del 3 % en peso en comparación con el mismo producto a T0, según se mide por ultracentrifugación analítica.

[00237] Modo de realización 68. Un procedimiento para reducir la degradación de proteínas víricas de un producto de rAAV después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;

- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el cambio en la proporción VP1:VP3 es menor del 20 % en el producto liofilizado reconstituido en comparación con antes de la liofilización.

[00238] Modo de realización 69. Un procedimiento para reducir la degradación de proteínas víricas de un producto de rAAV después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el cambio en la proporción VP1:VP3 es menor del 20 % en el producto liofilizado reconstituido en comparación con antes de la liofilización.

[00239] Modo de realización 70. Un procedimiento un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que la formulación se somete a un ciclo de liofilización y la SVP es menor que 100 partículas

por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00240] Modo de realización 71. Un procedimiento un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que la formulación se somete a un ciclo de liofilización y la SVP es menor que 50 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 5 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00241] Modo de realización 72. Un procedimiento un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa;
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que la formulación se somete a un ciclo de liofilización y la SVP es menor que 100 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 10 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00242] Modo de realización 73. Un procedimiento un procedimiento para reducir la concentración de partículas subvisibles (SVP) de un producto de rAAV, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que la formulación se somete a un ciclo de liofilización y la SVP es menor que 50 partículas por ml para partículas de 10 mm o más grandes, y menor que 5 partículas por ml para partículas de 25 mm o más grandes.

[00243] Modo de realización 74. Un procedimiento para reducir especies de peso molecular bajo (LMW) en un producto de rAAV después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el producto liofilizado se reconstituye y las especies de LMW son menos del 5 % en peso en comparación con el mismo producto sin liofilización, según se mide mediante ultracentrifugación analítica.

[00244] Modo de realización 75. Un procedimiento para reducir especies de peso molecular bajo (LMW) en un producto de rAAV después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y

- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el producto liofilizado se reconstituye y las especies de LMW son menos del 5 % en peso en comparación con el mismo producto sin liofilización, según se mide mediante ultracentrifugación analítica.

[00245] Modo de realización 76. Un procedimiento para reducir especies de peso molecular alto (HMW) en un producto de rAAV después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de citrato de sodio;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,001 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 7 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua;
- (g) a un pH de 6,0; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el producto liofilizado se reconstituye y las especies de HMW se incrementan en menos del 3 % en peso en comparación con el mismo producto sin liofilización, según se mide por ultracentrifugación analítica.

[00246] Modo de realización 77. Un procedimiento para reducir el peso molecular alto (HMW) en un producto de rAAV después de liofilizar el producto, comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende:

- (a) el rAAV;
- (b) 10 mM de Tris;
- (c) 75 mM de cloruro de sodio;
- (d) 0,005 % en peso de poloxámero 188;
- (e) 5 % en peso de sacarosa; y
- (f) agua; y
- (g) a un pH de 7,3; y

almacenar dicha composición liofilizada durante una duración a una temperatura entre -20 °C y 8 °C, tal como una temperatura de -20 °C a 0 °C o 0 °C a 8 °C, en la que el producto liofilizado se reconstituye y las especies de HMW se incrementan en menos

del 3 % en peso en comparación con el mismo producto sin liofilización, según se mide por ultracentrifugación analítica.

[00247] Modo de realización 78. El procedimiento de los modos de realización 57-77, en el que el rAAV comprende una cápside derivada de uno o más AAV seleccionados del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, Rh8, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8, RHM4-1 (VP1, SEQ ID NO: 1, o VP2, SEQ ID NO: 2, o VP3, SEQ ID NO: 3), DJ, DJ8, NP59, Anc-80 y variantes de los mismos.

[00248] Modo de realización 79. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 57-78, en el que el rAAV comprende un transgén que codifica un polipéptido o un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARNip, una molécula antisentido, un miARN, una ribozima y un ARNh_c.

[00249] Modo de realización 80. El procedimiento del modo de realización 79, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica GAA (alfa-glucosidasa ácida), ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre), alfa galactosidasa A (GLA), ASS1 (arginosuccinato sintasa), beta-glucocerebrosidasa, beta-hexosaminidasa A, SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1), glucosa-6-fosfatasa, CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C), una ganancia de función del factor de coagulación sanguínea, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad), lipasa de lipoproteína (LPL), ornitina transcarbamilasa (OTC), β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metales (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en enfermedad de almacenamiento lisosómico (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento derivado de línea celular de la glía (GDNF), factor de crecimiento transformante α y β , una citocina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), linfoxina (LT), un producto génico suicida, timidina cinasa del virus del herpes simple, citosina

desaminasa (CD), toxina diftérica (DT), citocromo P450 (CYP), desoxicitidina cinasa (DCK), factor de necrosis tumoral (TNF), una proteína de resistencia a fármacos, una proteína supresora de tumor (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel–Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido o proteína tolerogénico o inmunogénico Tregitope o hCDR1 (Edratide), insulina, glucocinasa (GCK), guanilato ciclasa 2D (GUCY2D) (o amaurosis congénita de Leber (LCA) asociada con variantes de GUCY2D (GUCY2D-LCA)), proteína acompañante Rab 1 (REP1) (coroideremia (CHM) codifica REP1), LCA 5 (amaurosis congénita de Leber 5) (LCA-Lebercilina), ornitina cetoácido aminotransferasa (atrofia girada), retinosquisina 1 (retinosquiasis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (sordera por conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (acromatopsia), PKD-1+ o PKD-2 (enfermedad poliquística del riñón), TPP1 (tripeptidil peptidasa 1), CLN2 (lipofuscinosis neuronal ceroid 2), una sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP (activador del gangliósido GM2), NPC1 (NPC transportador de colesterol intracelular 1), VPC2, una proteína activadora de esfingolípidos, una o más nucleasas con dedos de zinc para la edición del genoma, una o más secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma o variantes de los mismos.

[00250] Modo de realización 81. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica GAA (alfa-glucosidasa ácida).

[00251] Modo de realización 82. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica ATP7B (ATPasa2 transportadora de cobre).

[00252] Modo de realización 83. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica alfa galactosidasa A (GLA).

[00253] Modo de realización 84. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica ASS1 (arginosuccinato sintasa).

[00254] Modo de realización 85. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica beta-glucocerebrosidasa.

[00255] Modo de realización 86. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica beta-hexosaminidasa A.

[00256] Modo de realización 87. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica SERPING1 (inhibidor de proteasa C1 o inhibidor de esterasa C1).

[00257] Modo de realización 88. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica glucosa-6-fosfatasa.

[00258] Modo de realización 89. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica CFTR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística).

[00259] Modo de realización 90. El procedimiento del modo de realización 80, en el que el rAAV comprende el transgén que codifica un factor de coagulación (coagulante) sanguínea (por ejemplo, factor XIII, factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor VIIa, proteína C).

[00260] Modo de realización 91. La formulación y el procedimiento de cualquiera de los modos de realización 1-90, en los que el producto farmacéutico es un rAAV y el rAAV comprende una cápside que comprende VP1 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En un modo de realización adicional, la cápside de rAAV comprende además VP2 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. En un modo de realización preferente, la cápside de rAAV comprende VP1 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, VP2 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 y VP3 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3.

ASPECTOS Y MODOS DE REALIZACIÓN ADICIONALES

[00261] Aspectos, modos de realización adicionales y ejemplos de combinaciones de los mismos incluyen lo siguiente:

[00262] 1. Una formulación de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende los componentes:

- a) aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{15} vg/ml de rAAV;
- b) una fuerza iónica de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 90 mM;
- c) un agente tampón;
- d) 0,0005-0,05 % en peso de uno o más tensioactivos no iónicos;
- e) 1-10 % en peso de uno o más azúcares; y
- f) agua,
- g) a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5.

[00263] 2. La formulación de rAAV de 1, en la que dicha formulación comprende los componentes:

- a) 20 mM a 30 mM de acetato de Na;
- b) 10 mM a 50 mM de NaCl;

- c) 1 mM de MgCl_2 a 9,5 mM de MgCl_2
- d) 3 % a 8 % de sacarosa;
- e) 0,0005 % a 0,05 % de poloxámero 188 (P188); y
- f) agua;

en la que dicho pH es de 5,0 a 6,0.

[00264] 3. La formulación de rAAV de 2, en la que dicha formulación comprende los componentes:

- a) aproximadamente 25 mM de acetato de Na;
- b) aproximadamente 25 mM de NaCl;
- c) aproximadamente 5 mM de MgCl_2
- d) aproximadamente 5,4 % de sacarosa;
- e) 0,01 % de P188; y
- f) agua;

en la que dicho pH es de aproximadamente 5,2.

[00265] 4. La formulación de rAAV de 1, en la que dicha formulación comprende los componentes:

- a) 5 mM a 20 mM de Tris;
- b) 50 mM a 90 mM de NaCl;
- c) 3 % a 8 % en peso de sacarosa;
- d) 0,001 % a 0,01 % en peso de poloxámero 188 (P188); y
- e) agua;

en la que dicho pH es de 7,1 a 7,5.

[00266] 5. La formulación de rAAV de 4, en la que dicha formulación comprende los componentes:

- a) aproximadamente 10 mM de Tris;
- b) aproximadamente 75 mM de NaCl;
- c) aproximadamente 5 % de sacarosa;
- d) aproximadamente 0,005 % de P188; y
- e) agua;

en la que dicho pH es de aproximadamente 7,3.

[00267] 6. La formulación de rAAV de 1, en la que dicha formulación comprende los componentes:

- a) 5 mM a 20 mM de citrato de Na;
- b) 50 mM a 90 mM de NaCl;
- c) 5 % a 9 % en peso de sacarosa;

- d) 0,0005 % a 0,01 % en peso de poloxámero 188 (P188); y
- e) agua;

en donde dicho pH es de 5,5 a 6,5.

[00268] 7. La formulación de rAAV de 6, en la que dicha formulación comprende los componentes:

- a) aproximadamente 10 mM de citrato de Na;
- b) aproximadamente 75 mM de NaCl;
- c) aproximadamente 7 % en peso de sacarosa;
- d) aproximadamente 0,001 % de P188; y
- e) agua;

en la que dicho pH es de aproximadamente 6,0.

[00269] 8. La formulación de rAAV de uno cualquiera de 1-7, en la que dicha formulación consiste esencialmente en dichos componentes.

[00270] 9. La formulación de rAAV de uno cualquiera de 1-7, en la que dicha formulación consiste en dichos componentes.

[00271] 10. La formulación de rAAV de uno cualquiera de 1-9, en el que el rAAV comprende una cápside que comprende una VP1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, una VP2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 y una VP3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

[00272] 11. La formulación de rAAV de uno cualquiera de 1-10, en el que el rAAV se proporciona en aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{14} vg/ml

[00273] 12. La formulación de rAAV de 11, en la que el rAAV se proporciona a aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 4×10^{13} vg/ml.

[00274] 13. La formulación de rAAV de uno cualquiera de 1-12, en el que el rAAV comprende un ácido nucleico vírico recombinante que codifica GAA o GLA.

[00275] 14. Una formulación de virus adenoasociado recombinante (rAAV) liofilizado producida mediante un proceso que comprende liofilizar la formulación de rAAV de uno cualquiera de 1-13.

EJEMPLOS

[00276] Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos del objeto divulgado en la presente y no deben interpretarse como limitativos de ninguna manera.

Ejemplo 1: Estabilidad a largo plazo del rAAV en una formulación de fuerza iónica baja

A Materiales

[00277] Las sales de trihidrato de acetato de sodio, cloruro de sodio y hexahidrato de cloruro de magnesio se adquirieron de Fisher Scientific (Waltham, MA). Las sales dibásicas y monobásicas de fosfato de sodio eran de J.T. Baker (Radnor, PA) y la sacarosa era de Pfanstiehl (Waukegan, IL). Kolliphor® P188 BIO (Pluronic®F68) se adquirió de BASF (Ludwigshafen, Alemania). Las cápsides de AAV de RHM4-1 se prepararon como se describe en la patente de EE. UU. n.º 9,840,719 (VP1 de SEQ ID NO: 1, VP2 de SEQ ID NO: 2 y VP3 de SEQ ID NO: 3), que se incorpora en el presente documento por referencia. Se prepararon múltiples vectores AAV de la cápside RHM4-1, cada uno con un transgén diferente. Se produjo un rAAV que contenía un transgén que codifica la alfa-glucosidasa ácida (GAA) como se describe en el documento US20210222141, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Este vector que contiene GAA se denomina en el presente documento AAV-GAA. Otro tipo de vector con la misma cápside contenía un transgén que codifica la α -galactosidasa A (GLA) como se describe en el documento WO 2022/155665, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Este vector que contiene GLA se denomina en el presente documento AAV-GLA.

B Preparación de formulaciones

[00278] Las formulaciones se produjeron mediante intercambio de tampón con el tampón correspondiente en placas de 24 pocillos (corte de peso molecular (MWCO) de 100 kDa). Todas las formulaciones se diluyeron hasta un título objetivo de 2×10^{13} vg/ml a 3×10^{13} vg/ml (2×10^{13} vg/ml a 3×10^{13} vg/ml) con los tampones y tensioactivos correspondientes seguido de filtración final con filtros de jeringa de 0,22 μ m (EMD Millipore, Burlington, MA). Las formulaciones finales etiquetadas como F1 (formulación 1), F2 (formulación 2) y F3 (formulación 3) (Tabla 1) se llenaron en volúmenes en el intervalo de 1,3-3 ml en viales estériles de CZ de 5 ml (West Pharmaceuticals, Upper Darby, PA), se sellaron y cada uno se colocó en cámaras de estabilidad correspondientes a condiciones que incluían -80 °C, -20 °C, -40 °C, 5 °C y 25 °C. En cada punto de tiempo desde el tiempo 0 (denominado T0) hasta las 2 semanas (2s), 2 meses (2m) y 6 meses (6m) proporcionado en la tabla 2, se extrajeron muestras de la condición del estudio de estabilidad y se dividieron en alícuotas en viales estériles de CZ de 2 ml (West Pharmaceuticals, Upper Darby, PA) para someter a prueba los Atributos Críticos de Calidad (CQA) mediante diversos ensayos (que se muestran a continuación).

[00279] Tabla 1. Formulaciones usadas para el estudio actual y componentes de la formulación

Formulación	Composición de la matriz de formulación
F1	25 mM de acetato de Na, 25 mM de NaCl, 5 mM de MgCl ₂ , pH 5,2, 5,4 % de sacarosa, 0,01 % de poloxámero 188
F2	10 mM de fosfato de sodio, 180 mM de NaCl, pH 7,3, 0,001 % de poloxámero 188
F3	10 mM de fosfato de sodio, 60 mM de NaCl, 3 % de sacarosa, pH 7,3, 0,001 % de poloxámero 188

[00280] Tabla 2. Puntos de tiempo y condiciones del estudio

Condición del estudio	Puntos de tiempo
T0	Tiempo 0 (congelado a -80 °C)
25 °C	2 semanas y 2 meses
-80 °C	2 meses
-40 °C	2 meses y 6 meses
-20 °C	2 meses y 6 meses
5 °C	2 meses y 6 meses

C. Inspección visual

[00281] Todas las muestras se inspeccionaron visualmente con un fotómetro para evaluar la apariencia e identificar la presencia de partículas visibles.

[00282] Todas las muestras de F1 (pH bajo y fuerza iónica baja), F2 (pH convencional y fuerza iónica convencional), F3 (fuerza iónica moderada y pH convencional) en todas las condiciones del estudio, que incluyen T0, 25 °C – 2 semanas y 2 meses, -80 °C – 2 meses, -20 °C – 2 meses y 6 meses, -40 °C – 2 meses y 6 meses, 5 °C – 2 meses y 6 meses, resultaron ser soluciones transparentes e incoloras sin partículas visibles.

D. Transición vítrea del concentrado congelado (Tg')

[00283] Las temperaturas de transición vítrea del concentrado congelado (Tg') de todas las muestras de formulación T0 se determinaron mediante el procedimiento de calorimetría diferencial de barrido a baja temperatura (LT-DSC) USP (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos) <891>: Se realizó un análisis térmico para LT-DSC usando el equipo TA Instruments Q2000 con 9,8-18,6 mg de solución de muestra a una velocidad de 10 °C/minuto. El desprendimiento o absorción de calor de la muestra durante las etapas de enfriamiento y calentamiento durante el acontecimiento térmico reflejó las diferencias de energía que se registraron como mediciones.

[00284] Las transiciones vítreas del concentrado congelado (Tg') analizadas por LT-DSC se muestran en la tabla 3. Se observó que las Tg' para F1 y F3 eran -38,85 °C y -41,96 °C respectivamente. No se pudo detectar la Tg' para la formulación de plataforma

(F2), como se observa en la tabla; sin embargo, históricamente se ha informado en aproximadamente -65 °C. La temperatura de transición vítrea para F1 fue mayor que para F2. Es beneficioso almacenar productos biológicos por debajo de la transición vítrea para lograr una estabilidad potenciada con una movilidad mínima. El aumento de Tg' también permite el almacenamiento a temperaturas mayores que -80 °C, lo que es favorable y muy conveniente considerando la facilidad de las prácticas de la cadena de suministro, que incluye la manipulación/envío a temperaturas mayores. También es un enfoque susceptible a adoptarse ya que maximiza la garantía de esterilidad (el almacenamiento a baja temperatura puede comprometer los sistemas de cierre de los recipientes, ya que -80 °C en general está por debajo de la transición vítrea de los plásticos y el caucho, por lo que el plástico en general se vuelve quebradizo a estas bajas temperaturas).

[00285] Tabla 3. Mediciones de transición vítrea de formulaciones

Muestra	Transición vítrea		
	Inicio °C	Punto de inflexión °C	Capacidad calorífica
F1	-39,73	-38,85	0,15
F3	-42,71	-41,96	0,11

E. Título de genomas de vector mediante qPCR

[00286] Se realizó el ensayo de qPCR para medir el número de copias de genomas de vector de todas las muestras. En primer lugar, las muestras se incubaron con DNasa durante 15 minutos a temperatura ambiente para digerir el ADN genómico del vector no encapsulado. La reacción de la DNasa se detuvo y a continuación las muestras se incubaron a 95 °C para abrir la cápside y a continuación se diluyeron para que estuvieran dentro del intervalo de los estándares en base al título estimado. Las recuperaciones del título (%) se calcularon en base a las mediciones del título y las comparaciones con los valores T0.

[00287] La Figura 1 y la tabla 4 muestran las recuperaciones del título de todas las muestras en relación con los títulos T0. Se observó que la recuperación del título del vector se conservó para F1 en todas las condiciones de almacenamiento, que incluyen 5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C para puntos de tiempo más prolongados que incluyen 2-6 meses (recuperación de genomas del 87-107 %). Los datos son indicativos de un tiempo de vida útil extrapolado de > 1,5 años a 2-8 °C si se usa el criterio de aceptación común del 60-140 %. De forma similar, se admite un tiempo de vida útil de >2 años para todas las temperaturas de congelación que incluyen -20 °C. La recuperación del título del vector para F3 también se conservó en todas las condiciones de almacenamiento, que

incluyen 5 °C, -20 °C, -40 °C, -80 °C para puntos de tiempo más prolongados, que incluyen 2-6 meses (recuperación de genomas del 86-107 %). Sin embargo, en la formulación F2 (fuerza iónica alta), la recuperación del título cayó a ~73,7 % y 62,52 % para 25 °C – 2 semanas y 2 meses, respectivamente, mientras que las muestras de todas las demás condiciones presentaron recuperaciones del título mayores. Las formulaciones de fuerza iónica alta (es decir, donde NaCl > 150 mM) se usan comúnmente en preparaciones de rAAV y los informes previos indicaron la retención de la recuperación y la estabilidad para dichas formulaciones (véase Wright, J. Frasier, et al., "Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation", Molecular Therapy, (2005) 12:1, Rodrigues, Gerard A., et al., "Pharmaceutical development of AAV-based gene therapy products for the eye", Pharmaceutical Research, (2019) 36:29, y Srivastava, Arvind, et al. "Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors", Journal of Pharmaceutical Sciences 110,7 (2021): 2609-2624). Las formulaciones de fuerza iónica alta se usan para productos de AAV comercializados (véase, por ejemplo, el prospecto de ZOLGENSMA®; el prospecto de LUXTURNA®). Se muestra aquí que, en comparación con las formulaciones convencionales de fuerza iónica alta (por ejemplo, F2), la recuperación del título mejora y se mantiene dentro del tiempo de almacenamiento del estudio con formulaciones de fuerza iónica moderada (50-95 mM; 60 mM F3). La recuperación del título se mejoró y se mantuvo más con una formulación de fuerza iónica baja (<50 mM; 25 mM F1) a pH bajo (<7). La recuperación del título también se mantendría cuando se extrapolara más allá de 1,5 años.

[00288] Tabla 4. Recuperaciones del vector (%) para todas las muestras calculadas con respecto a los títulos T0

Muestra	Recuperación del título (% de T0)									
	T0	25 °C/ 2s	25 °C/ 2m	-80 °C/ 2m	-40 °C/ 2m	-20 °C/ 2m	5 °C/ 2m	-40 °C/ 6m	-20 °C/ 6m	5 °C/ 6m
F1	100	98,80	83,40	100,99	106,39	103,31	99,32	92,24	105,26	87,85
F2	100	73,70	62,52	103,05	106,31	102,60	97,22	118,42	137,67	82,69
F3	100	91,12	79,28	104,83	91,74	93,82	82,47	94,96	106,27	85,77

Nota: s = semanas, m = meses

F. Cromatografía de intercambio iónico (IEX) para el % de cápsides llenas

[00289] El ensayo de cromatografía de intercambio iónico (IEX) se realizó usando

procedimientos estándar y UV a 280 nm. Las muestras de rAAV eran predominantemente rAAV puros o llenos, donde la proporción de vacíos a llenos era de 3:7 o menos. Se informó que las muestras recuperadas para todas las formulaciones en todas las condiciones de estabilidad estaban enriquecidas solo con partículas llenas. Se observó que el tiempo de retención experimentó un cambio para las formulaciones F2 y F3 a 25 °C durante 2 meses (Figura 2), lo que indica la posibilidad de desamidación, lo que se confirmó además mediante datos de mapeo de péptidos. Sin embargo, no se observó cambio en el tiempo de retención ni desamidación en las muestras F1 en todas las condiciones del estudio. La desamidación se correlaciona inversamente con la eficacia y la transducción de rAAV y, por lo tanto, es altamente indeseable (Giles, April R., et al. "Deamidation of amino acids on the surface of adeno-associated virus capsids leads to charge heterogeneity and altered vector function". *Molecular Therapy*.2018. 26(12): 2848-2862).

G. SEC-MALS para agregación

[00290] El peso molecular del monómero, el radio hidrodinámico y la concentración de cápsides vacías, llenas y totales se sometieron a prueba con cromatografía de exclusión por tamaño. La abundancia de especies monoméricas y de peso molecular alto (HMW) fue igual a su porcentaje de la señal ultravioleta integrada total a 280 nm. Los datos de SEC MALS revelaron, como se ilustra en la Figura 3, que el % de abundancia de especies de HMW que indican impurezas y productos de degradación es menor para la formulación de pH bajo y fuerza iónica baja, F1, y para la formulación de fuerza iónica moderadamente baja, F3, en relación con la formulación de pH y fuerza iónica convencionales, F2. Este resultado indica una mejor calidad y estabilidad para F1 y F3 que para F2. Para F2, el % de HMW es relativamente alto para todas las condiciones de estabilidad.

H. CE-SDS para la pureza de proteínas de la cápside

[00291] Las muestras que contenían rAAV se desnaturalizaron con dodecilsulfato de sodio (SDS) y beta-mercaptoetanol (BME) a 70 °C. Las muestras desnaturalizadas se sometieron a electroforesis capilar y las proteínas separadas se detectaron mediante absorbancia a 220 nm.

[00292] Las proporciones de proteínas VP no se afectaron significativamente para todas las formulaciones bajo todas las condiciones de estabilidad como se observa en la Figura 4. Por lo tanto, la pureza de proteínas de la cápside se conservó en todas las formulaciones y no se afectó negativamente por un pH y/o por fuerzas iónicas más bajas.

I. Dispersión dinámica de la luz (DLS) para el tamaño

[00293] Se realizó DLS para estudiar la intensidad y la distribución del tamaño de partícula (PSD) en volumen y para determinar el tamaño hidrodinámico medio (Z-promedio). También se midió el índice de polidispersidad (PDI), que sirve como indicador de la agregación.

[00294] Los datos de DLS informados se muestran en tabla 5, que muestra que la calidad y estabilidad del vector se conservaron para las formulaciones F1 y F3 de pH bajo y/o fuerza iónica baja en diferentes condiciones. El tamaño de partícula se mantuvo alrededor de 24-30 nm para las formulaciones F1 y F3. Los valores de PDI para F1 fueron ligeramente mayores que los de F2 y F3, pero esto se debe a las especies complejas dentro de la matriz del tampón (confirmado con barridos de tampón) y no a la agregación del vector.

[00295] Tabla 5. Datos de distribución del tamaño de partícula de DLS que muestran el tamaño de rAAV, el diámetro hidrodinámico medio y los valores del índice de polidispersidad para todas las muestras.

Formulación		De PSD en volumen			
		TAMAÑO d.nm	% en VOL	Z-PROM d.nm	PDI
F1	T0	28,27	100	33,02	0,236
	25 °C, 2s	24,74	99,8	48,35	0,668
	25 °C, 2m	25,55	99,6	63,62	0,895
	-80 °C, 2m	23,3	100	34,59	0,282
	-40 °C, 2m	27,05	99,9	34,52	0,308
	-20 °C, 2m	28,53	99,9	34,33	0,284
	5 °C, 2m	27,34	99,9	34,65	0,32
	-40 °C, 6m	26,82	100	32,58	0,252
	-20 °C, 6m	29,49	100	32,03	0,21
	5 °C, 6m	28,83	99	33,99	0,285
F2		TAMAÑO d.nm	% en VOL	Z-PROM d.nm	PDI
	T0	23,32	100	24,17	0,1
	25 °C, 2s	22,91	100	24,85	0,088
	25 °C, 2m	22,67	100	25,16	0,104
	-80 °C, 2m	23,82	100	24,81	0,07
	-40 °C, 2m	21,92	100	25,18	0,155
	-20 °C, 2m	23,36	100	24,24	0,081
	5 °C, 2m	24,1	100	24,51	0,01
	-40 °C, 6m	23,16	100	24,24	0,058
	-20 °C, 6m	23,69	100	24,41	0,041
	5 °C, 6m	23,12	100	24,11	0,058

		TAMAÑO d.nm	% en VOL	Z-PROM d.nm	PDI
F3	T0	25,2	100	26,69	0,121
	25 °C, 2s	25,64	100	26,22	0,115
	25 °C, 2m	27,2	100	27,19	0,176
	-80 °C, 2m	24,42	100	25,89	0,104
	-40 °C, 2m	26,52	100	26,44	0,068
	-20 °C, 2m	23,35	100	25,72	0,144
	5 °C, 2m	23,66	100	25,6	0,127
	-40 °C, 6m	25,27	100	27,66	0,144
	-20 °C, 6m	25,14	100	27,35	0,187
	5 °C, 6m	24,83	100	27,7	0,146

Nota: m = meses, s = semanas

J. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) intrínseca para estabilidad térmica

[00296] Se evaluaron los cambios en las señales de fluorescencia intrínsecas de los residuos de triptófano presentes en las cápsides de rAAV tras el aumento térmico para estudiar el desplegamiento térmico de las proteínas víricas. Se midieron los datos correspondientes a la proporción de intensidad de fluorescencia 350/330 nm y los cambios en las temperaturas de fusión de proteína vírica (T_m) de muestras T0 de todas las formulaciones para investigar su estabilidad termodinámica usando muestras de 10 µl en réplicas en capilares sellados.

[00297] Los datos de DSF intrínseca mostrados en la Figura 5 indicaron que el punto de fusión (T_m) de F1 se desplazó ~5 °C en relación con F2 y F3, lo que muestra el cambio significativo en el desplegamiento de las proteínas víricas. F1 mostró la mayor T_m, de este modo enfatiza una estabilidad termodinámica o física superior.

K. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) extrínseca para estabilidad térmica

[00298] La liberación del genoma de muestras de rAAV teñidas con un tinte de unión al ADN, SYBR®Gold, tras la inducción de estrés térmico se detectó mediante DSF extrínseca. Se evaluaron los cambios en la temperatura de inicio de la exposición del ADN para muestras T0 para investigar la estabilidad termodinámica de las formulaciones de rAAV.

[00299] El ensayo de DSF extrínseca usando el tinte de unión al ADN (SYBR®Gold) mostró que se observó que la temperatura de inicio de la exposición del ADN para F1 se desplazaba ~5 °C en comparación con F2 y F3 (Figura 6). El desplazamiento destacó la mayor estabilidad termodinámica de la formulación F1 (fuerza iónica baja y pH bajo) y respalda nuestra conclusión de que la cápside estará más compactada estructuralmente alrededor del pH 5,5, que se alinea simultáneamente con el punto

isoelectrico.

L. Oscurecimiento de la luz para la evaluación de partículas subvisibles

[00300] Las partículas subvisibles se midieron con un contador de partículas dependiente de oscurecimiento de la luz (HIAC). Las mediciones de partículas en cubetas de diferentes tamaños, que incluyen >5 µm, >10 µm y >25 µm, se registraron como recuentos acumulados/ml. Los datos de HIAC de recuentos de partículas subvisibles en todos los intervalos de tamaño no mostraron ningún problema significativo (Figura 7). Todos los números cumplieron con los criterios de la USP (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos) <787> para recuentos admisibles de partículas subvisibles en inyecciones de proteínas terapéuticas.

M. Mapeo de péptidos para modificaciones postraduccionales (PTM)

[00301] Las proteínas en las cápsides RHM4-1 se desnaturalizaron, los disulfuros se redujeron a tioles libres y se alquilaron de forma irreversible. Se digirieron enzimáticamente por separado alícuotas de la muestra con tripsina y Asp-N, respectivamente. Los péptidos de cada muestra generados a partir de la digestión enzimática se separaron mediante cromatografía de líquidos de fase inversa y se detectaron mediante espectrometría de masas. Los datos primarios se procesaron usando una tubería bioinformática donde se mapeó la cobertura de la secuencia mediante comparación entre los péptidos identificados y los péptidos teóricos de las proteínas de las cápsides RHM4-1. Cada péptido se identificó usando datos de masa molecular intacta y de iones de fragmentos específicos de secuencia. Se determinaron los niveles de PTM que incluyen desamidación y oxidación.

[00302] Como se observa en la Figura 8, F1 no mostró niveles considerables de desamidación en comparación con F2 y F3, que mostraron niveles mayores en particular para muestras de 2 semanas y 2 meses a 25 °C (30-35 %) por el contrario de F1 (2,5 %). Se observó una oxidación significativa en las muestras bajo estrés a 25 °C durante 2 meses de F2 y F3 (20-30 %) por el contrario de F1 (9 %).

N. Potencia mediante ensayo basado en células

[00303] Las muestras con un vector AAV genomanipulado que codifica GAA (AAV-GAA) como se describe en el documento US20210222141 se sometieron a prueba en un ensayo de potencia que mide la actividad de GAA en células transducidas con el vector GAA. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se transdujeron con el vector de GAA estándar de referencia (RS), la muestra de control positivo (PC) y el(los) artículo(s) de prueba (TA). Al tercer día después de la transducción, se midió espectrofotométricamente la actividad enzimática (escisión para liberar un fluoróforo) de

la GAA secretada por las células usando un lector de microplacas de fluorescencia. La fluorescencia de cada estándar de referencia y dilución de muestra de prueba se representó gráficamente en función de la concentración de genomas de vector, y las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante un programa informático de regresión lineal. La línea de la muestra de prueba se comparó con la del estándar de referencia usando el análisis de la proporción de pendientes, y la potencia relativa de la muestra se informa como el porcentaje del estándar de referencia (%RP). Las muestras de tiempo cero (T0) almacenadas a -80 °C durante 6 meses sirvieron como muestras de control para todas las formulaciones.

[00304] No se observó que los tampones de formulación afectaran la viabilidad celular. Los datos de potencia en la Figura 9 mostraron que F1 conservó una alta potencia relativa para condiciones que incluían -20 °C, -40 °C y -80 °C durante 2 y 6 meses, lo que también indica el potencial para almacenar rAAV en la formulación F1 a estas temperaturas durante un tiempo de vida útil de al menos 2 años. Las formulaciones F2 y F3 conservaron una potencia relativa alta a 5 °C, -20 °C, -40 °C y -80 °C. Se espera que la formulación F3 de fuerza iónica moderada, conserve su potencia si se almacena durante más de 2 años a 2-8 °C (extrapolado a partir de las tendencias de los datos actuales).

O. Sumario

[00305] Los resultados generales del estudio de estabilidad a largo plazo confirman que una formulación con pH bajo, que contiene tensioactivo, a base de sacarosa, de fuerza iónica baja (F1) mostró el mejor rendimiento para la mayoría de los CQA (es decir, tuvo el mejor perfil de CQA). Los datos favorables con F1, que incluyen la retención del título y la potencia, menor degradación, menos agregación, menos impurezas y ningún potencial de desamidación, en comparación con las formulaciones F2 y F3, también respaldan un tiempo de vida útil prolongado a temperaturas mayores que incluyen -20 °C y -40 °C (en relación con -80 °C) con la formulación F1. Además, la presencia de sacarosa y los datos de Tg' resaltan el efecto estabilizador del azúcar y respaldan un mejor almacenamiento a temperaturas de congelación y la aptitud para la liofilización.

[00306] Quienes trabajan en este campo entienden que ningún CQA es determinante, sino que el perfil de CQA de cada formulación indicará cuál formulación es mejor para el propósito o producto particular. Aquí, la formulación F1 de fuerza iónica baja y pH bajo tiene el mejor perfil de CQA en comparación con las formulaciones convencionales y en general reconocidas de pH fisiológico (7,3) y fuerza iónica (> 150 mM NaCl) mayor

para el almacenamiento en congelación a largo plazo y la descongelación de productos de rAAV. También se espera que la adición de tensioactivo minimice las pérdidas potenciales por adsorción en los componentes de fabricación y administración, garantizando por tanto una exactitud de la dosis alta y potenciada.

Ejemplo 2: Excipientes optimizados para reducir la degradación durante la estabilidad a corto plazo

A. Preparación de soluciones de rAAV

[00307] Se prepararon varias soluciones de matriz con una variedad de tampones, aminoácidos, sal, detergentes y aditivos de azúcar. Los productos de rAAV genomanipulados, como se describe anteriormente en el ejemplo 1, se prepararon en las matrices mediante dilución o intercambio de tampón. A continuación, las soluciones de rAAV se expusieron a un estrés a corto plazo por medio de exposición controlada a temperatura (25-35 °C) durante entre 1-30 días.

B. Degradación forzada en fase líquida

[00308] La pérdida del título de genomas es un mecanismo de degradación característico de rAAV que reduce la eficacia terapéutica y aumenta la inmunogenicidad. El almacenamiento a corto plazo a temperaturas elevadas acelera este proceso de degradación en relación con las temperaturas de almacenamiento bajas, lo que permite la evaluación de condiciones clave para potenciar la estabilidad del almacenamiento de líquidos en plazos experimentalmente factibles.

[00309] Los rAAV se diluyeron en matrices de pH, fuerza iónica y aditivos adicionales variables en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las soluciones se sellaron y se incubaron entre 30-35 °C para aplicar estrés a corto plazo. Después de exponer las soluciones de rAAV al estrés, las soluciones se enfriaron a 4 °C para minimizar otros cambios y se analizaron para evaluar los cambios en el título usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento con intercambio iónico (IEX-HPLC).

[00310] En la Figura 10 se muestran ejemplos de cambios en el título de genomas de rAAV durante la degradación forzada para rAAV y se analizan usando un modelo de coeficiente de partición. Los cambios de título se miden mediante cambios relativos en el área de un vector rAAV lleno intacto mediante HPLC. Este análisis identifica tres condiciones preferentes para conservar el título del vector durante la incubación: pH <7,3, una concentración de NaCl <100 mM y una concentración de MgCl₂ <10 mM. Cualquiera de estos atributos reduce la pérdida de título durante la exposición de rAAV. En determinados modos de realización, puede preferirse la combinación de los tres atributos en F1 para reducir mejor la pérdida de título de rAAV.

[00311] Un resumen del análisis estadístico para identificar los parámetros clave proporcionados en la tabla 6 respalda estos resultados. El efecto de la condición (pH, fuerza iónica (mostrada por la concentración de cloruro de sodio), magnesio, arginina e histidina) en la prevención de la pérdida de título se determina usando el análisis de varianza (ANOVA). El efecto en general se determina como “fuerte” o “moderado” si la probabilidad del efecto (p) es inferior a 0,01 o entre 0,01-0,1, respectivamente. Las condiciones que mejoran la pérdida de título incluyen un pH por debajo de 7,0, concentraciones bajas de especies de sal (NaCl a una concentración <100 mM, MgCl₂ a una concentración <10 mM), y la adición de arginina e histidina. La importancia se determinó por medio de análisis con modelos de ANOVA y de partición. El intervalo preferente indica los intervalos que se prefieren para un atributo determinado.

[00312] Tabla 6. Ejemplo de excipientes clave obtenidos por cribado de degradación forzada.

Condición/Ingrediente	Prevención de la pérdida de título	Intervalo preferente
pH	Fuerte	pH ≤ 6,5
Fuerza iónica	Fuerte	10-50 mM
MgCl ₂	Fuerte	≤ 5 mM
Arginina	Media	≥ 20 mM
Histidina	Media	≥ 20 mM

C. Formación de partículas subvisibles durante la congelación-descongelación

[00313] Los procesos de congelación-descongelación (F-T) durante la producción vírica son una fuente común de agregación vírica y formación de partículas subvisibles (SVP), lo que aumenta la inmunogenicidad del producto farmacéutico y el riesgo para el paciente. La formación de partículas predecibles es necesaria para los procesos de congelación-descongelación en las escalas de fabricación clave y la variación en la composición del producto entre lotes, que incluye la acumulación durante la fabricación corriente abajo, el almacenamiento del producto congelado y la congelación para la liofilización. Se estudió el impacto de F-T en la formación de SVP en el producto de rAAV (como se describió anteriormente) diluyendo el producto de rAAV en matrices con tampones, tensioactivos, sales y otros excipientes variables. Se sometieron a prueba más de 100 condiciones experimentales, con variación estratégica de parámetros para permitir la creación de un modelo estadístico para describir la formación de SVP. Las soluciones se sellaron, se expusieron a F-T a tasas controladas de cambio de temperatura y se monitorearon para detectar la formación de SVP generadas. A

continuación, el tamaño y la abundancia de SVP se ajustaron a un modelo estadístico empírico para comprender los comportamientos generales observados en las condiciones sometidas a prueba.

[00314] El modelo estadístico para la formación de SVP en matrices no optimizadas se muestra en las Figuras 11A y 11B. La cantidad y el tamaño de las SVP dependen en gran medida de la tasa de F-T, el contenido de rAAV vacíos y las especies tampón. Dentro del campo, cada uno de estos parámetros son difíciles de controlar en los procesos de producción. El contenido de rAAV vacíos se refiere a la proporción de partículas vacías (AAV que no contienen el genoma completo) en la muestra. Es conocido que el contenido de rAAV vacíos puede variar ampliamente entre lotes, con entre un 90 % llenos y más del 80 % vacíos entre lotes y proyectos dentro de un serotipo determinado. Las tasas de congelación-descongelación pueden variar en más de 10 veces según los cambios en el tamaño del contenedor y las temperaturas de congelación o descongelación. Las especies tampón suelen estar muy restringidas por la compatibilidad con etapas de procesamiento clave y/o vías de administración al paciente. La dependencia de la formación de SVP en dichas condiciones de procesamiento y producción puede dar lugar a un nivel de SVP indeseable e impredecible en los productos farmacéuticos que puede variar según la etapa de procesamiento, la escala de procesamiento, la temperatura de almacenamiento, la variación de la composición del producto de lote a lote y la vía de administración a los pacientes.

[00315] La formación de SVP con características mejoradas y predecibles se muestra en las Figuras 11C y 11D. La adición de azúcar y tensioactivo es importante para reducir la formación general de SVP, así como para eliminar la formación de SVP independiente de la tasa de F-T, el contenido de rAAV vacíos y las especies tampón tanto a pH neutro como ácido. La formación de SVP mejorada se obtiene con el intervalo de 0,001-0,05 % de tensioactivo, o más preferentemente 0,01-0,05 %. También se observa una formación de SVP mejorada con la adición de azúcares al 1-6 %, o más preferentemente al 2-4 %. El análisis estadístico de los efectos para respaldar estos resultados se muestra en la tabla 7.

[00316] Tabla 7. Resumen de los efectos de la matriz y los excipientes identificados en la degradación forzada por congelación-descongelación.

Condición	Efecto sobre el número de SVP	Dirección o intervalo preferente
Tampón: acetato, histidina, citrato (pH 5,2)	Fuerte efecto en ausencia de sacarosa (azúcar) y poloxámero 188 (tensioactivo)	Acetato, histidina, preferente (solo en ausencia de azúcar y tensioactivo),
Tampón: histidina, tris (pH 7-8)	Fuerte efecto en ausencia de sacarosa (azúcar) y poloxámero 188 (tensioactivo)	Histidina, tris, preferente (solo en ausencia de azúcar y tensioactivo),
Poloxámero 188	Fuerte	0,01-0,05, en particular si se usa fosfato
Sacarosa	Fuerte	1-4 %, en particular si se usa fosfato
Poloxámero 188 y sacarosa combinados	Fuerte	Se prefiere >0,01 % de poloxámero 188 y >3 % de sacarosa
Fuerza iónica	Moderado	Se prefiere <100 mM

[00317] En conjunto, estos estudios de degradación forzada investigan los efectos clave de la fuerza iónica, las especies tampón, el pH, el tensioactivo, el azúcar, la pureza del vector (por ejemplo, el porcentaje de cápsides vacías) y la tasa de congelación-descongelación en la estabilidad general del rAAV. En conjunto, identifican lo siguiente: (a) una fuerza iónica moderada puede mitigar la pérdida tanto del genoma de vector como de la agregación del vector; (b) tanto un pH ligeramente ácido (5-6,5) como un pH neutro (6,5-7,5) pueden estabilizar el rAAV; (c) la combinación de tensioactivo no iónico (se prefiere >0,005 % v/v) y azúcar (se prefiere >1,5 %) producen propiedades de congelación donde las especies tampón comunes son todas equivalentes y la agregación de partículas no se ve afectada por las tasas de congelación o la concentración de cápsides vacías. En base a los resultados del ejemplo 2, se desarrollaron las formulaciones F4 y F5 (F4 (Formulación 4) = 10 mM de Tris, 75 mM de NaCl, 5 % de sacarosa, 0,005 % de poloxámero 188, pH 7,3; F5 (Formulación 5) = 10 mM de citrato, 75 mM de NaCl, 7 % de sacarosa, 0,001 % de poloxámero, pH 6,0). La formulación susceptible a las condiciones de liofilización incluye (a) fuerza iónica moderada de 50-95 mM, (b) pH de 5-7,5, (c) tampón no volátil que pueda actuar como tampón en el intervalo de pH de 5-7,5 y concentración mínima de azúcar suficiente para proporcionar una torta liofilizada estable.

Ejemplo 3: Estabilidad a largo plazo de AAV-GLA en una formulación de fuerza iónica baja

A Estudio de la composición y estabilidad de la formulación de AAV-GLA

[00318] Se preparó un vector de la cápside RHM4-1 (como se muestra en la patente de

EE. UU. n.º 9,840,719 con VP1 de SEQ ID NO: 1, VP2 de SEQ ID NO: 2 y VP3 de SEQ ID NO: 3) que contiene un transgén que codifica la α -galactosidasa A (GLA), (AAV-GLA), (como se describe en el documento WO 2022/155665), se formuló en la formulación F1 (25 mM de acetato de sodio, 25 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$, 5,4 % de sacarosa, 0,01 % de Kolliphor P188, pH 5,2) como una solución acuosa estéril, de dosis única sin conservantes, en un vial de CZ de 5 ml (número de cat.: 19550209, West Pharmaceutical Services).

[00319] Se monitoreó la estabilidad a largo plazo de AAV-GLA en la formulación F1 en condiciones de almacenamiento que incluyeron $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3, 6, 9 y 12 meses, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6, 12 meses y $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1, 3 y 6 meses. El estudio también evaluó la estabilidad del material en condiciones de estabilidad acelerada, tales como $25\text{ }^{\circ}\text{C}/60\text{ }\%$ de HR durante 2 semanas y 1 mes.

B pH de AAV-GLA durante el almacenamiento

[00320] El pH de AAV-GLA durante el almacenamiento se midió mediante potenciometría. El procedimiento analítico se realizó de acuerdo con los procedimientos de la farmacopea USP <791> y Ph. Eur. 2.2.3. Los valores medidos después del almacenamiento (Figura 12) son consecuentes en todas las condiciones y puntos de tiempo en comparación con T0, dentro de la especificación prevista para el pH.

C. Título de genomas de vector mediante ddPCR

[00321] El título de genomas víricos de AAV-GLA en la formulación F1 durante el almacenamiento se midió usando la reacción en cadena de la polimerasa digital de gotas (ddPCR). Las muestras se añadieron a una solución de ddPCR que contenía cebadores específicos del transgén y una sonda fluorescente. Cada muestra se dividió en gotas uniformes del tamaño de nanolitros, y los ADN objetivo y de fondo se distribuyeron aleatoriamente en las gotas durante el proceso de partición. Las gotas se transfirieron a una placa de 96 pocillos para la amplificación por PCR donde se amplificó un segmento del transgén. Un lector de gotas lee cada gota para determinar la fracción de gotas positivas. La fracción de gotas positivas se usó para calcular la concentración del número de copias del ADN objetivo. El resultado de la concentración de genomas de vector para cada artículo de prueba y control se informó como copias de genomas de vector por ml de producto (vg/ml).

[00322] El título y la recuperación del vector (Figura 13) muestran las recuperaciones del título de todas las muestras en relación con los títulos T0. Se observó que la recuperación del título de genomas se conservó en la condición de almacenamiento objetivo de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para puntos de tiempo tales como 3 (97 %), 6 (78 %), 9 (74 %) y 12

(80 %) meses y, por lo tanto, no mostró problemas. El almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C hasta 6 meses y el almacenamiento a -20 °C durante hasta 12 meses también mostraron recuperaciones mayores (75-101 %). Por lo tanto, aquí se muestra que la recuperación del título se mantiene en más del 70 % para muestras de hasta 12 meses.

D. Potencia *in vitro*

[00323] La potencia basada en células fue diseñada para reflejar el mecanismo de acción de la proteína α -Gal A en relación con el estándar de referencia. La potencia se midió mediante la evaluación de la actividad enzimática debida a la expresión de α -GalA de las células indicadoras transducidas con AAV-GLA, y la actividad enzimática se evaluó usando un indicador fluorogénico.

[00324] La potencia (Figura 14) se conservó dentro de al menos el 65 % en todas las muestras a -20 °C, -80 °C y 1 mes y 2-8 °C. Las pérdidas de hasta un 35 % se encuentran dentro de la variación típica para los ensayos de potencia basados en células sin una disminución consecuente para la temperatura de almacenamiento de -20 °C y -80 °C. En conjunto, estos resultados indican la idoneidad del almacenamiento entre -20 °C y -80 °C durante al menos 1 año.

E. Infectividad *in vitro*

[00325] Las pruebas de infectividad basadas en células evaluaron la actividad infecciosa *in vitro* de AAV-GLA. Este procedimiento basado en células implicó la coinfección de células de empaquetamiento de AAV portadoras de los genes rep y cap de AAV con AAV-GLA y Ad5. La lectura incorporó la determinación del criterio de valoración del 50 % del ADN del vector mediante ddPCR usando los mismos reactivos de cebador y sonda que el procedimiento de ddPCR de concentración de genomas de vector. El análisis de datos y los cálculos de títulos infecciosos se basaron en el procedimiento de Kärber. Los datos se informaron como la proporción entre la concentración de partículas del vector y el título del vector infeccioso.

[00326] Las proporciones PI (relación entre la concentración de partículas del vector y el título del vector infeccioso, Figura 15A) y los títulos infecciosos (Figura 15B) presentan una variación típica de los ensayos basados en células *in vitro*. Sin embargo, el comportamiento concuerda con la potencia basada en células *in vitro* (Figura 14) sin una disminución consecuente de la infectividad. Es importante destacar que se encontró que el título infeccioso se conservó a 2-8 °C durante 6 meses y a -20 °C y -80 °C para todos los puntos de tiempo hasta 12 meses.

F. Concentración de cápsides y proporción de vacías: llenas por absorbancia UV

[00327] Se usó la absorbancia a 280 nm y 260 nm para evaluar el total de cápsides y la proporción de partículas de cápsides vacías respecto a partículas de cápsides llenas (E:F) en preparaciones de AAV-GLA. Para todas las mediciones, el total de cápsides (Figura 16A) es consecuente entre $5,5\text{-}5,9 \times 10^{13}$ cápsides/ml y la proporción E:F (Figura 16A) es $\leq 0,25$ para todas las muestras, sin cambios eficaces durante 12 meses de almacenamiento.

G. Pureza y proporción de cápsides mediante CE-SDS

[00328] La abundancia relativa y la pureza de las proteínas de la cápside vírica se evaluaron usando electroforesis capilar con dodecil sulfato de sodio (CE-SDS). Esto mide la abundancia de las proteínas víricas VP1, VP2 y VP3, una variante de proteína de la cápside (pre-VP3), así como impurezas y fragmentos de péptidos adicionales clave. Las partículas de AAV-GLA se redujeron y desnaturalizaron. Las proteínas de la cápside reducidas se separaron en base a su tamaño usando electroforesis capilar (CE) basada en la movilidad electroforética de las moléculas de proteína. La proporción estequiométrica de proteínas de la cápside y la pureza de proteínas de la cápside se determinaron en base a las áreas de pico corregidas de VP1, VP2, VP3 y la variante de VP3 pre-VP3.

[00329] Las proporciones relativas de las proteínas VP (Figura 17A) varían dentro del 20 % del valor T0 medido, sin incrementos ni disminuciones consecuentes durante el almacenamiento. La pureza total de las proteínas VP (porcentaje asociado con VP1, VP2 y VP3, Figura 17B) es superior al 98 %, con una pequeña disminución de T0 a 96 % solo asociada con el almacenamiento a 25 °C. De forma similar, la proporción de impurezas de péptidos se mantiene consecuentemente por debajo del 2 % para todas las muestras, excepto para las muestras a 25 °C con un pequeño incremento de manera aproximada del 4 %. La Figura 17C ilustra el porcentaje promedio de impurezas. En base a los datos, se descubrió que la pureza de proteínas se conservó para todas las condiciones de almacenamiento, tales como 2-8 °C, -20 °C y -80 °C durante al menos 1 año.

H. Porcentaje de cápsides llenas por IEX

[00330] La carga de la cápside y las variantes de carga se caracterizaron con cromatografía de intercambio aniónico (AEX) analítica. Las partículas de cápsides vacías y llenas se eluyeron de una columna de AEX analítica, y la absorbancia se monitoreó a 280 nm. La proporción E:F se determinó mediante la proporción entre el área del pico de cápsides vacías y el área del pico de cápsides llenas, después de la corrección de las diferencias en el coeficiente de extinción debido al ADN encapsidado

en las cápsides llenas y vacías.

[00331] Tabla 7. Relación de cápsides vacías : llenas para AAV-GLA en la formulación F1 durante la estabilidad a largo plazo, medida mediante cromatografía de intercambio iónico analítica.

Muestra	Pico de llenas A260/280	Proporción E:F
T0	N/A	<LOD (E/F=0,2)
25 °C_2s	1,3	<LOD(E:F 0,2)
25 °C_1M	1,4	<LOD(E:F 0,2)
2-8 °C_1M	1,3	<LOD(E:F 0,2)
2-8 °C_3M	1,4	<LOD(E:F 0,2)
2-8 °C_6M	1,4	<LOD(E/F=0,2)
-20 °C_6M	1,4	<LOD(E/F=0,2)
-20 °C_12M	1,3	<LOD(E/F=0,2)
-80 °C_3M	1,3	<LOD(E:F 0,2)
-80 °C_6M	1,4	<LOD(E/F=0,2)
-80 °C_9M	1,3	<LOD(E/F=0,2)
-80 °C_12M	1,4	<LOD(E/F=0,2)

[00332] Los resultados de IEX se resumen en la tabla 7. Se informó que las muestras recuperadas en todas las condiciones de estabilidad tuvieron una proporción E:F $\leq$ 0,2 (LOD) y una proporción A260/280 consecuente de 1,3-1,4 para todas las muestras durante 12 meses. No hubo cambios notables en el tiempo de retención para todas las muestras, lo que implica además que no hay posibilidades de desamidación (respaldado además por los datos de mapeo de péptidos).

I. Agregación por SEC-MALS

[00333] Los agregados oligoméricos se evaluaron con exclusión por tamaño analítica con dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS), que separa las especies en base al volumen hidrodinámico. Se usaron detectores MALS en línea para determinar el peso molecular y el radio hidrodinámico en un solo análisis. La abundancia relativa de especies de peso molecular alto (Figura 18) mostró niveles de abundancia de monómeros muy similares (<1 %) para todas las muestras durante 1 año de

almacenamiento.

J. Evaluación de partículas subvisibles mediante oscurecimiento de la luz

[00334] Las partículas subvisibles se evaluaron mediante oscurecimiento de la luz (HIAC), usando un procedimiento de bajo volumen de 1 ml. Las mediciones de partículas en cubetas de diferentes tamaños, tales como >5 µm, >10 µm y >25 µm, se registraron como recuentos acumulados/ml en la tabla 8. Todas las condiciones demuestran niveles muy bajos de partículas, típicamente al menos 10 veces menores que los límites de la farmacopea para productos de pequeño volumen. Además, no se observó ningún incremento aparente para todas las muestras dentro de hasta 1 año de almacenamiento.

[00335] Tabla 8. Recuentos de partículas subvisibles medidos por HIAC para AAV-GLA en la formulación F1.

Nombre de la muestra	Recuentos acumulados/ml		
	>5 µM	>10 µM	>25 µM
T0	87	19	0
2-8 °C_1M	0,00	0,00	0,00
2-8 °C_6M	24,00	9,33	0,00
-20 °C_6M	108,00	18,67	1,33
-80 °C_6M	36,00	9,33	0,00
-20 °C_12M	34,67	1,33	0
-80 °C_12M	6,67	0	0

K. Tamaño y distribución de partículas por DLS

[00336] La distribución del tamaño de partícula y la polidispersidad se evaluaron con dispersión de luz dinámica (los datos de DLS (Tabla 9) no muestran una agregación perceptible para todas las muestras durante 12 meses, con un tamaño de pico principal (radio en nm) en el intervalo de 25-32 nm, un índice de polidispersidad (PDI) del pico principal ≤0,3 y una composición porcentual en masa de monómero ≥98 %.

[00337] **Tabla 9.** Agregación de AAV-GLA después de la formulación en F1, almacenamiento y reconstitución. Agregación evaluada por DLS, con datos que informan un ajuste acumulativo para determinar un peso molecular promedio y polidispersidad, y (b) un ajuste de regularización para estimar la abundancia relativa de monómero frente a agregados.

Nombre de la muestra	Ajuste acumulativo		Ajuste de regularización			
	Z promedio (nm)	PDI	Pico de monómero (nm)	PDI de monómero	% de masa de monómero	% de masa de HMW
T0	30,1 ± 0,3	0,1±0,0	31,9±0,9	0,2±0,1	98,1±4,6	2,0±4,6

25 °C_2s	31,2 ± 0,3	0,1±0,0	28,8±0,6	0,2±0,1	99,4±0,9	0,6±0,9
25 °C_1M	28,3±0,4	0,2±0,0	26,0±0,8	0,2±0,1	98,4±0,3	1,6±0,3
2-8 °C_1M	25,8±0,1	0,1±0,0	25,8±0,5	0,1±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
2-8 °C_3M	25,5±0,1	0,1±0,0	27,2±0,3	0,1±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
2-8 °C_6M	25,6±0,2	0,1±0,0	27,0±0,2	0,1±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
-20 °C_6M	25,9±0,1	0,1±0,0	27,4±0,3	0,1±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
-20 °C_12M	26,1±0,1	0,1±0,0	27,7±0,2	0,14±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
-80 °C_3M	26,0±0,2	0,1±0,0	27,4±0,3	0,1±0,0	99,9±0,2	0,1±0,2
-80 °C_6M	26,0±0,1	0,1±0,0	27,3±0,3	0,1±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
-80 °C_9M	25,8±0,1	0,1±0,0	27,4±0,3	0,1±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
-80 °C_12M	26,4±0,2	0,1±0,0	28,0±0,2	0,15±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0

L. Mapeo de péptidos para modificaciones postraduccionales (PTM)

[00338] La degradación química de péptidos clave se analizó por espectrometría de masas con proteólisis limitada. Se desnaturalizaron muestras de proteínas de la cápside RHM4-1, se redujeron los disulfuros a tioles libres y a continuación se alquilaron de forma irreversible. La muestra se digirió enzimáticamente, se separó por cromatografía de líquidos de fase inversa y se detectó mediante un espectrómetro de masas. Los datos primarios se procesaron usando una tubería bioinformática donde se mapeó la cobertura de la secuencia mediante comparación entre los péptidos identificados y los péptidos teóricos de las proteínas de las cápsides RHM4-1. Cada péptido se identificó usando datos de masa molecular intacta y de iones de fragmentos específicos de secuencia, y se analizó para determinar las modificaciones postraduccionales de desamidación y oxidación.

[00339] Se observó que los niveles de desamidación (Figura 19) eran menores o iguales al 8 % en todos los residuos de asparagina para todas las muestras de todas las condiciones. La desamidación tampoco muestra un incremento aparente de ningún residuo.

M. Sumario

[00340] Los resultados generales del estudio de estabilidad a largo plazo confirman

que una formulación de fuerza iónica baja, basada en sacarosa, con alto contenido de Pluronic, de pH bajo, no demostró cambios en los atributos analíticos durante un año de monitoreo a -20 °C. Muchos atributos, que incluyen la agregación, la formación de partículas y el título de genomas de vector, tampoco mostraron cambios en condiciones de estabilidad acelerada (4 °C y 25 °C) hasta 6 meses. En conjunto, esto indica una estabilidad profunda que es aceptable durante al menos 1 año entre -20 °C y -80 °C, y razonablemente hasta al menos 2 años.

Ejemplo 4. Estabilidad de AAV-GAA liofilizado en una formulación de fuerza iónica moderada

A. Estabilidad después de un ciclo de liofilización

[00341] Como se describe en el ejemplo 2, el desarrollo de la formulación respaldó modificaciones en F1 para crear formulaciones de fuerza iónica moderada, F4 y F5 (descritas en la tabla 10). Se sometió a prueba la estabilidad de AAV-GAA bajo un ciclo de liofilización en las formulaciones de fuerza iónica moderada F4 y F5. Las soluciones de rAAV se prepararon mediante intercambio de tampón de AAV-GAA purificado en soluciones acuosas y adición de excipientes clave, y filtración a través de 0,2 µm, y se llenaron en viales de vidrio. Las soluciones se congelaron a -50 °C, se calentaron a -35 °C para secado principal y se calentaron a 25 °C para 30 °C para secado secundario. A continuación, la torta liofilizada se reconstituyó en agua desionizada y se sometió a prueba para detectar cambios en los atributos de calidad críticos.

[00342] Tabla 10. Soluciones en pruebas de ciclos de liofilización.

Nombre de la formulación	Matriz
F4	10 mM de Tris, 75 mM de NaCl, 5 % de sacarosa, 0,005 % de P188, pH 7,3
F5	10 mM de citrato de sodio, 75 mM de NaCl, 7 % de sacarosa, 0,001 % de P188, pH 6,0

B. Recuperación del vector después de la liofilización

[00343] Después del ciclo de liofilización, la torta liofilizada se reconstituyó y se analizó el título de genomas encapsulados para comprobar los cambios de título debido al proceso de liofilización. El título de genomas de vector se midió usando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). La Figura 20 representa el título antes y después de la reconstitución para el secado secundario a 25 °C frente a 35 °C. El título se normalizó en relación con el título antes de la liofilización (T0). El AAV-GAA presenta un título del 15 % en F4 y un incremento del 5 % en F5 (dentro del error experimental de los ensayos de qPCR típicos, lo que indica que no hay degradación por el ciclo de

liofilización ni en F4 ni en F5.

C. Potencia después de la liofilización

[00344] Después del ciclo de liofilización, la torta se reconstituyó y se analizó la potencia celular in vitro para comprobar los cambios en el título debido al proceso de liofilización. La Figura 21 representa la potencia celular relativa después de la liofilización, normalizada respecto a la potencia antes de la liofilización. Los vectores presentan una pérdida de potencia relativa menor que el 10 %, lo que indica una degradación aceptable debido al proceso de liofilización en estas matrices de solución.

D. Peso molecular alto después de la liofilización

[00345] Después del ciclo de liofilización, la torta se reconstituyó y se analizaron las especies de peso molecular alto usando SEC-MALS. La Figura 22 representa el porcentaje de especies de peso molecular alto determinado por el porcentaje de área a una absorbancia de 280 nm. Todas las muestras presentan un incremento de menos del 0,5 % en especies de peso molecular alto, lo que indica un impacto mínimo del proceso de liofilización en las especies agregadas.

E. Integridad de la proteína VP después de la liofilización

[00346] Después del ciclo de liofilización, la torta se reconstituyó y se analizaron los cambios en las proteínas de la cápside. La Figura 23 representa la proporción relativa de las proteínas VP1, VP2, VP3 y pre-VP3. Todas las proporciones están normalizadas respecto a la ocupación de VP1 y la pre-VP3, lo que indica una especie producto de degradación común formada a partir de la degradación de VP2 y VP3. La formulación F5 con secado secundario a 30 °C indica cierta fragmentación, con un incremento de manera aproximada del 15 % en VP3 y pre-VP3. Todas las demás condiciones no muestran cambios importantes respecto a T0.

F. Estabilidad a largo plazo de una formulación F4 de AAV-GAA liofilizada

[00347] El AAV-GAA en la formulación F4 se liofilizó y se monitoreó su estabilidad a largo plazo. Las soluciones de rAAV se prepararon mediante intercambio de tampón del vector AAV-GAA purificado, se diluyeron a títulos objetivo de $1,5 \times 10^{13}$ vg/ml, se añadieron azúcar y tensioactivo de soluciones de reserva de alta concentración y la solución final se filtró a través de filtros de 0,22 μ m. A continuación, las soluciones de rAAV preparadas se liofilizaron por congelación a -50 °C, secado principal a -35 °C, y secado secundario a 25 °C o 30 °C. A continuación, los viales se taparon bajo nitrógeno filtrado (NF) y se sellaron. Los viales sellados se almacenaron como se describe en la tabla 11. Después de las duraciones indicadas en la tabla 11, las muestras se reconstituyeron y se dividieron en alícuotas en viales estériles de 2 ml para someter a prueba los atributos

de calidad críticos mediante diversos ensayos.

[00348] Tabla 11. Condiciones en el estudio de estabilidad a largo plazo de rAAV-GAA liofilizado en la formulación F4.

	Puntos de tiempo
T0 Líquido	Tiempo 0 (congelado a –80 °C)
T0	Tiempo 0 (liofilizado)
25 °C/ 60 % de HR	3 meses y 6 meses
35 °C/65 % de HR	2 semanas
-20 °C	1 mes, 3 meses y 6 meses
2-8 °C	1 mes, 3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses y 24 meses

G. Título de genomas de vector mediante qPCR.

[00349] El título de AAV-GAA liofilizado durante el almacenamiento (Figura 24) se evalúa con qPCR. El título de todas las muestras es equivalente o mayor que el título del control T0 (sin liofilización). Por tanto, la recuperación del título del vector se conservó para todas las condiciones de almacenamiento, que incluyen 35 °C/65 % de HR, 25 °C/60 % de HR, -20 °C, y 2-8 °C durante hasta 6 meses (recuperación de genomas del 100-114 %), sin una disminución apreciable después de hasta 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

H. Potencia mediante ensayo basado en células

[00350] La potencia basada en células in vitro (Figura 25) evalúa la actividad funcional de AAV-GAA liofilizado durante el almacenamiento. La formulación liofilizada conserva una potencia de al menos el 60 % para condiciones de 2-8 °C y –20 °C. Esto es equivalente al control T0, ya que los ensayos de potencia in vitro tienen errores estándar relativos grandes de al menos 20 %. Se observa cierta disminución de la potencia a 35 °C/65 % de HR (de manera aproximada una disminución del 50 % en 0,5 meses) y 25 °C/60 % de HR (52 % después de 3 meses, 63 % después de 6 meses). Esta disminución es aceptable para dichas condiciones de estabilidad acelerada y a temperaturas significativamente por encima del almacenamiento (-20 °C a 4 °C).

I. Agregación oligomérica (SEC-MALS)

[00351] La formación de especies oligoméricas de peso molecular alto (HMW) en AAV-GAA liofilizado se evaluó con cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo y se informó como el porcentaje de la señal UV integrada total a 280. Como se muestra en las Figuras 26A a 26C, la abundancia relativa estuvo entre 2-3 % para todas las muestras antes de la liofilización y durante el almacenamiento, lo que indica que no hubo cambios en el estado del monómero ni en

la agregación de oligómeros durante el estudio. A partir de esto, es razonable extrapolar que el almacenamiento en 4 °C prevé una formación insignificante de HMW durante al menos 1 año.

J. Fragmentación y agregación (ultracentrifugación analítica)

[00352] La ultracentrifugación analítica es un procedimiento sensible para la detección de especies de peso molecular alto (HMW) y fragmentos de cápside (especies de peso molecular bajo, LMW), productos de degradación clave que pueden formarse durante el almacenamiento. El AAV-GAA liofilizado reconstituido se evaluó con AUC usando un gradiente de CsCl₂, monitoreo del perfil de sedimentación con absorbancia a 230 nm y modelación usando la ecuación de Lamm.

[00353] La Figura 27 muestra poblaciones de HMW, parciales y LMW en el almacenamiento. Tanto para HMW como para parciales, todas las muestras varían dentro del 2 % de la muestra antes de la liofilización, lo que indica que no hay ningún cambio eficaz. Las especies de LMW estuvieron por debajo del límite de detección para la mayoría de las muestras (de manera aproximada el 5 %), lo que indica que no hubo fragmentación tras la liofilización o el almacenamiento durante al menos 6 meses. Se prevé que el almacenamiento a 4 °C provoque un cambio insignificante en LMW, HMW y E:F durante al menos 1 año.

K. Formación de partículas subvisibles

[00354] Las partículas subvisibles son un atributo estrictamente regulado para los tratamientos parenterales. Las partículas subvisibles se midieron mediante oscurecimiento de la luz usando un procedimiento de bajo volumen de 1 ml. Las mediciones de partículas se muestran en la Figura 28 en diferentes intervalos de tamaño de ≥ 10 μ m y ≥ 25 μ m, y se registran como recuentos acumulados/ml. Los niveles medidos están por debajo de 50 partículas/ml para todas las muestras, que incluyen las condiciones de estrés acelerado a 35 °C y 25 °C, todas ellas 100 veces inferiores a las pautas de la farmacopea en USP <787>.

L. CE-SDS

[00355] Se evaluó la proporción de proteínas víricas de la cápside para AAV-GAA liofilizado reconstituido. La abundancia de proteínas VP se monitoreó con electroforesis capilar en condiciones reducidas con tensioactivo SDS. Las relaciones de VP normalizadas respecto a la ocupación de VP1 (Figura 29) no muestran cambios para todas las condiciones de almacenamiento entre -20 °C y 25 °C. En relación con la condición de preliofilización, la condición de 35 °C/65 % de HR muestra un incremento de manera aproximada del 10 % en la abundancia de Pre-vp3 + vp3, lo que indica cierta

fragmentación de las proteínas VP en esta condición. Sin embargo, este cambio es aceptable para una estabilidad acelerada. Todos los puntos de tiempo de muestras no muestran cambios adicionales significativos en comparación con el T0 líquido (antes de la liofilización).

M. Sumario de la estabilidad de la liofilización

[00356] Se sometieron a prueba el ciclo de liofilización y el almacenamiento a largo plazo para AAV-GAA. En dos formulaciones de fuerza iónica media F4 y F5, el ciclo de liofilización demostró un impacto mínimo en el título de rAAV, la potencia y los atributos clave, que incluyen la fragmentación de la cápside, la agregación y las partículas subvisibles. La estabilidad a largo plazo en la formulación F4 no demostró cambios en el título, la agregación, la fragmentación de la cápside y la fragmentación de proteínas VP a lo largo de 6 meses y 4 °C. La potencia in vitro demostró una variación dentro de dos desviaciones estándar del error de ensayo (40 %) para un almacenamiento hasta 4 °C durante 6 meses, con disminuciones significativas solo para condiciones de estabilidad acelerada a los 3 meses. Por tanto, estas formulaciones de fuerza iónica moderada estabilizan adecuadamente el rAAV durante la liofilización y durante el almacenamiento de -20 °C a 4 °C durante al menos 1 año.