

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 519**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 47/02** (2006.01)

**A61K 47/18** (2007.01)

**A61K 31/195** (2006.01)

**A61K 47/22** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2017 PCT/US2017/059971**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018 WO18128689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2017 E 17866366 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3534922**

54 Título: **Formulaciones de virus adeno-asociados**

30 Prioridad:

**04.11.2016 US 201662417750 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.10.2024**

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED  
(100.0%)  
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku  
Osaka-shi, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

**FIEDLER, CHRISTIAN;  
FRITSCHER, EVA;  
HASSLACHER, MEINHARD;  
MITTERGRADNEGGER, DOMINIK y  
TABISH, TANVIR**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

ES 2 981 519 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de virus adeno-asociados

## 5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 62/417,750 presentada el 4 de noviembre de 2016.

## 10 Antecedentes

15 El virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en inglés) es un virus pequeño, sin envoltura, que empaqueta un genoma de ADN de hebra sencilla lineal. El AAV pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*, ya que la infección productiva por AAV se produce solo en presencia de un virus auxiliar, tal como, por ejemplo, el virus de adenovirus o herpes. Incluso en ausencia de un virus auxiliar, el AAV (serotipo 2) puede lograr latencia al integrarse en el cromosoma 19q13,4 de un genoma humano anfitrión. Es el único virus de ADN de mamíferos que se sabe que es capaz de integrarse en un sitio específico (Daya y Berns, *Clinical Microbiology Reviews*, páginas 583–593 (2008)).

20 Para que el AAV se use de forma segura en medicina clínica, el AAV se ha modificado genéticamente en varias ubicaciones dentro de su genoma. Por ejemplo, el gen *Rep*, que se requiere para la replicación viral, y el elemento requerido para la integración específica del sitio se han eliminado del genoma de AAV en muchos vectores virales. Este AAV recombinante (rAAV), existe en un estado extracromosómico y tiene una eficiencia de integración muy baja en el ADN genómico. La posibilidad de que rAAV induzca mutagénesis aleatoria en una célula anfitriona se reduce así, si no se elimina por completo. Debido a estas propiedades y la falta de patogenicidad, el rAAV ha demostrado ser una gran promesa como vector de terapia génica en múltiples aspectos de las aplicaciones preclínicas y clínicas. Se están probando nuevos serotipos y vectores autocomplementarios en medicina clínica. Junto con estos desarrollos continuos de vectores, el esfuerzo continuo se ha centrado en los procedimientos de fabricación escalables que pueden generar de manera eficiente cantidades de títulos elevados de vectores de rAAV con alta pureza y potencia.

35 La investigación de AAV también se ha centrado en las formulaciones de AAV destinadas a la administración a seres humanos. Se entiende que tales formulaciones de AAV no solo deben ser seguras, estériles y de buena práctica de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés), sino que también deben mostrar y promover la estabilidad a largo plazo del AAV, minimizando la pérdida de potencia de AAV durante los procedimientos de fabricación, envasado, y almacenamiento. Además, las formulaciones deberían evitar la adsorción a las superficies de los recipientes en los que se envasan y almacenan los AAV y de la maquinaria utilizada durante la fabricación. Si bien los esfuerzos para diseñar tales formulaciones de AAV han sido excelentes, todavía existe la necesidad de mejores las formulaciones de AAV.

40 El documento WO 2016/154055 A1 (Bluebird Bio Inc.) tiene que ver con formulaciones de vectores. En particular, formulaciones de trehalosa o derivados de la misma como protectores adecuados para el almacenamiento a largo plazo de vectores virales y para aplicaciones tanto in vitro como in vivo.

45 Wright J F et al., *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of gene therapy*, Academic Press; Nature Publishing Group, US, vol. 12, Núm. 1, 1 de julio de 2005 (01-07-2005), páginas 171-178 tiene que ver con la identificación de factores que contribuyen a la agregación de partículas de AAV2 recombinante y métodos para prevenir su aparición durante la purificación y formulación del vector.

50 El documento US 9 051 542 B2 (Wright J F et al.) tiene que ver con composiciones y métodos para prevenir la agregación de vectores de AAV.

55 El documento US 2012/141528 A1 (Coffey M C et al.) tiene que ver con formulaciones virales liofilizadas útiles para la estabilización y almacenamiento de virus y métodos para preparar estas formulaciones.

## Compendio

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

60 La presente divulgación proporciona formulaciones compatibles para administración a seres humanos que atiende las necesidades no satisfechas descritas anteriormente. Ventajosamente, en algunas realizaciones, las formulaciones son adecuadas para el almacenamiento a largo plazo de AAV, minimizando la pérdida de potencia de AAV, y ventajosamente evitan la formación de partículas visibles y evitan la adsorción a las superficies de los recipientes en los que se empaquetan y almacenan los AAV y de la maquinaria utilizada durante la fabricación. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-asociados (AAV) y de un agente tamponador de aproximadamente 5 mM a

aproximadamente 25 mM, de una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, de un tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y de un azúcar o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la formulación comprende de una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la formulación comprende de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la formulación comprende de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM de una sal farmacéuticamente aceptable.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: AAV (p. ej., AAV8), L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y sacarosa, trehalosa, manitol o una combinación de los mismos de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación se liofilizada a partir de una formulación líquida.

En ciertos aspectos, la composición farmacéutica liofilizada de la presente divulgación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende: AAV (p. ej., AAV8), L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), glicina de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM y sacarosa, trehalosa, manitol, o una combinación de los mismos de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.

Los métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende AAV se proporcionan adicionalmente en el presente documento. En aspectos ilustrativos, el método comprende combinar L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), sacarosa, trehalosa, manitol o una combinación de los mismos de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) y AAV, obteniendo así una composición farmacéutica que comprende AAV. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.

Una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en métodos de tratamiento de un sujeto de un trastorno tratable mediante terapia génica. En aspectos ilustrativos, una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en los métodos comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz para tratar el trastorno.

Por otra parte, se proporcionan en el presente documento métodos para almacenar una composición que comprende AAV. En aspectos ilustrativos, el método comprende combinar L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), sacarosa, trehalosa, manitol, o una combinación de los mismos de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) y AAV. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la formulación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente



formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: AAV y L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 0 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la invención proporciona una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida.

En general, las formulaciones de AAV proporcionadas en el presente documento son adecuadas para administración farmacéutica. En ciertas realizaciones, el AAV es AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10. En ciertas realizaciones, el AAV es AAV 2, AAV 5, AAV 8 o AAV 9. En ciertas realizaciones, el AAV es AAV8.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona formulaciones, p. ej., composiciones farmacéuticas compatibles para la administración a seres humanos o veterinaria que también son adecuadas para el almacenamiento a largo plazo de AAV y minimizan la pérdida de potencia de AAV. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento son ventajosas, porque las formulaciones evitan la formación de partículas visibles y también evitan la adsorción a las superficies de los recipientes en los que se envasan y almacenan los AAV, y evitan la adsorción a la maquinaria utilizada durante la fabricación. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento conservan una actividad de AAV significativa cuando se almacenan durante largos periodos de tiempo. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento reducen o retardan la degradación y/o la agregación.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones de AAV que comprenden una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un AAV, una concentración sub-fisiológica a fisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable, una concentración estabilizadora de uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar, un tensioactivo no iónico, uno o más agentes tamponadores que proporcionan un pH neutro a la formulación y, opcionalmente, un aminoácido para ayudar a la estabilidad y recuperación del AAV durante la purificación y/o procesamiento. En general, las formulaciones de AAV proporcionadas en el presente documento son adecuadas para administración farmacéutica. En ciertas realizaciones, el AAV es AAV8.

En ciertas realizaciones, la composición que contiene el AAV es una composición deshidratada. Como se emplea en el presente documento, una composición deshidratada es una composición que incluye agua en una cantidad baja, tal como 25% o menos, o 20% o menos, o 15% o menos, o 10% o menos, o 9% o menos, o 8% o menos, o 7% o menos, o 6% o menos, o 5% o menos, o 4% o menos, o 3% o menos, o 2% o menos, o 1% o menos agua según se mide mediante la titulación Karl Fischer (KF). En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 3% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 2% o menos de agua según se mide por la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 1% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,9% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,8% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,7% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,6% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,5% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,4% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,3% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición deshidratada tiene 0,2% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer. Se puede utilizar cualquier protocolo conveniente para producir una composición deshidratada, tal como aumento de la temperatura de la composición (p. ej., calentamiento), reducción de la presión, liofilización (también conocida como secado por congelación) y similares, y combinaciones de los mismos. Otros métodos para determinar el contenido de humedad de la composición incluyen la pérdida por secado (LOD) (mide la cantidad de agua y materias volátiles en una muestra cuando la muestra se seca bajo condiciones específicas), sensores electrolíticos (p. ej., utilizando un sensor de P2O5), sorción piezoeléctrica, sensores de óxido, sensores de óxido de aluminio, espectroscopia de absorción e infrarrojo cercano (NIR).

Adicionalmente, se encontró que la reducción de la concentración de sal en la formulación liofilizada reducía la humedad residual en la torta liofilizada y ayudaba a la formación de una torta liofilizada mejorada.

Debido al bajo contenido de agua de una composición liofilizada como se describió anteriormente, la composición liofilizada puede estar en forma de un sólido. En algunos casos, la composición liofilizada sólida

es un polvo. En algunos casos, una composición liofilizada puede facilitar el almacenamiento de la composición durante un período de tiempo prolongado (p. ej., en comparación con una formulación líquida de la misma composición). Por ejemplo, una composición liofilizada puede ser una composición estable al almacenamiento (p. ej., una composición estable al almacenamiento liofilizada), en donde la composición es sustancialmente estable durante un período de tiempo prolongado. Por “estable” o “almacenamiento estable” o “sustancialmente estable” se entiende una composición que no se degrada y/o pierde actividad significativamente durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, una composición estable al almacenamiento puede no tener impurezas significativas debido a la degradación de la composición durante un período de tiempo prolongado, tal como 10% o menos de impurezas, o 9% o menos, u 8% o menos, o 7% o menos, o 6% o menos, o 5% o menos, o 4% o menos, o 3% o menos, o 2% o menos, o 1% o menos productos de degradación durante un período de tiempo prolongado. En ciertos casos, una composición estable al almacenamiento tiene 5% o menos de impurezas durante un período de tiempo prolongado. En algunos casos, una composición estable al almacenamiento conserva sustancialmente su actividad durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, conserva 100% de su actividad, o 99% o más, o 98% o más, o 97% o más, o 96% o más, o 95% o más, o 94% o más, o 93% o más, o 92% o más, o 91% o más, o 90% o más, o 85% o más, o 80% o más, o 75% o más de su actividad durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, una composición estable al almacenamiento puede conservar 90% o más de su actividad durante un período de tiempo prolongado. En algunos casos, una composición estable al almacenamiento conserva 95% o más de su actividad durante un período de tiempo prolongado. Un período de tiempo prolongado es un período de tiempo tal como 1 semana o más, o 2 semanas o más, o 3 semanas o más, o 1 mes o más, o 2 meses o más, o 3 meses o más, o 4 meses o más, o 6 meses o más, o 9 meses o más, o 1 año o más, o 1,5 años (p. ej., 18 meses) o más, o 2 años o más, o 2,5 años (p. ej., 30 meses) o más, o 3 años o más, o 3,5 años (p. ej., 42 meses) o más, o 4 años o más, o 4,5 años (p. ej., 54 meses) o más, o 5 años o más. Por ejemplo, un período de tiempo prolongado puede ser de 6 meses o más. En algunos casos, un período de tiempo prolongado es de 9 meses o más. En algunos casos, un período de tiempo prolongado es de 1 año (p. ej., 12 meses) o más. En algunos casos, un período de tiempo prolongado es de 1,5 años (p. ej., 18 meses) o más. En algunos casos, un período de tiempo prolongado es de 2 años (p. ej., 24 meses) o más. En algunas realizaciones, una composición estable al almacenamiento es sustancialmente estable durante un período de tiempo prolongado a temperatura ambiente, tal como una temperatura de 20 a 40°C, o de 25 a 35°C, o de 25 a 30°C. En algunos casos, una composición estable al almacenamiento es sustancialmente estable durante un período de tiempo prolongado a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como una temperatura de 0 a 20°C, o de 0 a 15°C, o de 0 a 10°C, o 2 a 8°C.

#### Definiciones

Como se emplea en el presente documento, el término “AAV” se refiere a virus adeno-asociados en formas tanto naturales como recombinantes (rAAV), y abarca formas mutantes de AAV. El término AAV incluye adicionalmente AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3, AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de primate y AAV no de primate. En ciertas realizaciones, el AAV es AAV8.

La frase “farmacéuticamente aceptable”, como se emplea con relación a las composiciones descritas en el presente documento, se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de tales composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente reacciones adversas cuando se administran a un sujeto. Preferiblemente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figuran en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en mamíferos, y más particularmente en seres humanos. Una “sal farmacéuticamente aceptable” es una sal que puede formularse en un compuesto o producto conjugado para uso farmacéutico que incluye, p. ej., sales metálicas (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amonio o aminas orgánicas que son seguras para su administración a un sujeto (p. ej., un ser humano) en una formulación de fármaco (véase, por ejemplo, Berge, et al. “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 1977; 66: 1. Las “sales farmacéuticamente aceptables” adecuadas incluyen sales metálicas tales como sales de sodio, potasio y cesio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio; sales de aminas orgánicas tales como sales de trietilamina, guanidina y guanidina N-sustituida, sales de acetamidina y acetamidina N-sustituida, piridina, picolina, etanolamina, trietanolamina, diciclohexilamina y N,N'-dibenciletildiamina. Las “sales farmacéuticamente aceptables” (de centros nitrogenados alcalinos) incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato, fosfato; sales de ácidos orgánicos tales como sales trifluoroacetato y maleato; sulfonatos tales como metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, canforsulfonato y naftalensulfonato; sales de aminoácidos tales como arginato, alaninato, asparinato y glutamato; y sales de carbohidratos tales como gluconato y galacturonato. La selección y el uso de sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véase Stahl and Wermuth, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, 2ª edición revisada, Wiley, Hoboken, N.J. Los ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, sales de amonio, sales de potasio (p. ej., cloruro de sodio, amonio y potasio; acetato de sodio, amonio y potasio; citrato de sodio, amonio y potasio; fosfato de sodio, amonio y potasio, fluoruro de sodio, amonio y potasio, bromuro de sodio, amonio y potasio y yoduro de sodio, amonio y potasio).

Como se emplea en el presente documento, una “concentración fisiológica” de sal se refiere a una concentración de sal de entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable.

5

Como se emplea en el presente documento, una “concentración subfisiológica” de sal se refiere a una concentración de sal de menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, una concentración sub-fisiológica de sal es menor que aproximadamente 80 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una concentración sub-fisiológica de sal es menor que aproximadamente 70 mM, menor que aproximadamente 60 mM, menor que aproximadamente 50 mM, menor que aproximadamente 40 mM, menor que aproximadamente 30 mM, menor que aproximadamente 20 mM, o menos que aproximadamente 10 mM de una sal farmacéuticamente aceptable.

10

Como se emplean en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” de un estado, trastorno o afección incluyen: (1) prevenir, retrasar o reducir la incidencia y/o la probabilidad de la aparición de al menos un síntoma clínico o subclínico del estado, trastorno o afección que se desarrolla en un sujeto que puede estar afligido o predispuesto al estado, trastorno o afección, pero aún no experimenta o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección; o (2) inhibir el estado, trastorno o afección, es decir, detener, reducir o ralentizar el desarrollo/progresión de la enfermedad o una recaída de la misma o al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma; o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o afección o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos. Como se emplean estos términos, no necesariamente implican un tratamiento de 100% o completo. Más bien, existen diversos grados de tratamiento que un experto normal en la técnica reconoce que tiene un beneficio potencial o efecto terapéutico. El beneficio para un sujeto que se debe tratar es estadísticamente significativo o al menos perceptible para el paciente o el médico. A este respecto, la composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso en los métodos para tratar un trastorno, p. ej. un trastorno de sangrado, puede proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento. Además, la composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso en los métodos para tratar un trastorno o una afección puede incluir el tratamiento de una o más afecciones o síntomas o signos del trastorno que se esté tratando.

15

20

25

30

Como se emplean en el presente documento, una “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente” se refieren a una dosis que produce efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y la podrá determinar un experto en la técnica utilizando mecanismos conocidos (véanse, p. ej., Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vol.1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

35

Los términos “paciente” y “sujeto” se utilizan indistintamente y se utilizan en su sentido convencional para referirse a un organismo vivo que padece o es propenso a una afección que se puede prevenir o tratar mediante la administración de una composición de la presente divulgación, e incluye tanto a seres humanos como a animales no humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, chimpancés y otras especies de primates y monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. El término no denota una edad particular. Por lo tanto, los individuos adultos, juveniles y recién nacidos revisten interés.

40

45

Como se emplea en el presente documento, “almacenamiento” significa que una formulación no se administra inmediatamente a un sujeto una vez preparada, pero se mantiene durante un período de tiempo bajo condiciones particulares (p. ej., temperatura particular, etc.) antes de su uso. Por ejemplo, una formulación líquida o liofilizada se puede mantener durante días, semanas, meses o años, antes de la administración a un sujeto a temperaturas variadas, tal como temperatura refrigerada (0° a 10°C) o temperatura ambiente (p. ej., temperatura hasta 32°C)

50

55

Como se emplea en el presente documento, el término “aproximadamente” denota un rango aproximado de más o menos 10% de un valor especificado. Por ejemplo, la expresión “aproximadamente 20%” abarca un rango de 18-22%. Como se emplea en el presente documento, aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, “aproximadamente 20%” significa “aproximadamente 20%” y también “20%”.

60

Como se emplea en el presente documento, el término “y/o” se refiere a y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

65

Como se emplea en el presente documento, el término “o” se refiere a un miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

Como se emplean en el presente documento, los términos “un”, “uno”, “una”, “el” y “la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la divulgación (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse de modo que cubran tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o sea claramente contradicho por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluyen, pero no están limitados a”) a menos que se indique lo contrario.

Se pretende que la enumeración de los rangos de valores en el presente documento sirva simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango y cada punto final, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor y punto final separados se incorporan en la memoria descriptiva como si fueran recitados individualmente en el presente documento.

#### 15 Composiciones y formulaciones de AAV

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adenoasociados (AAV) y un agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, un tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y un azúcar o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v).

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adenoasociados (AAV) y un agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, un tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y un azúcar o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v).

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adenoasociados (AAV) y un agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 0 mM a menos de 100 mM, un tensioactivo no iónico entre aproximadamente 0,001% (p/v) y aproximadamente 0,01% (p/v), y un azúcar o alcohol de azúcar entre aproximadamente 1% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v).

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adenoasociados (AAV) y un agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 30 mM a menos de 100 mM, un tensioactivo no iónico entre aproximadamente 0,001% (p/v) y aproximadamente 0,01% (p/v), y un azúcar o alcohol de azúcar entre aproximadamente 1% (p/v) y aproximadamente 10% (p/v).

En ciertos casos, la composición es una composición estéril. Por “estéril” se entiende que no hay sustancialmente componentes inmunogénicos en la composición, tal como, p. ej., sustancialmente no hay microbios (p. ej., hongos, bacterias, virus, formas de esporas, etc.).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende un agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende un agente tamponador aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM, o aproximadamente 25 mM.

Los agentes tamponadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones de fosfato, histidina, citrato de sodio, HEPES, Tris, Bicina, glicina, N-glicilglicina, acetato de sodio, carbonato de sodio, glicilglicina, lisina, arginina, fosfato de sodio y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones, el tampón es histidina (p. ej., L-histidina).

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente

- 25 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende L-histidina aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM, o aproximadamente 25 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende L-histidina aproximadamente 10 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente L-histidina 20 mM.
- 10 En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable (como se definió anteriormente) de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 70 mM,
- 15 de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, de 50 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 55 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 70 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 5 mM.
- 30 5 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 0 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 105 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 115 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 135 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 145 mM, o aproximadamente 150 mM. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende una sal farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 10 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 20 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 40 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 50 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 60 mM a menos de aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 70 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 0 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 30 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 60 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende aproximadamente una sal farmacéuticamente aceptable 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende aproximadamente una sal farmacéuticamente aceptable 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio (p. ej., cloruro de sodio).
- 60 De manera ventajosa, se ha encontrado que las composiciones farmacéuticas que contienen una concentración subfisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable forman tortas liofilizadas compactas
- 65

con un menor contenido de humedad y ayudan en la formación de una torta liofilizada mejorada. En ciertas realizaciones, la concentración subfisiológica de la sal farmacéuticamente aceptable da como resultado tortas liofilizadas de color blanco, compactas y homogéneas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas con bajo contenido de sal que contienen una concentración subfisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable, p. ej., menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, una formulación con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéutica. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 80 mM de una sal farmacéutica. En otras realizaciones, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 70 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 60 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 50 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 40 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 30 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 20 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 10 mM de una sal farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal contiene entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 60 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones más, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal contiene aproximadamente 0 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, o aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 0 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 30 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 60 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 80 mM. En una realización preferida, una composición farmacéutica con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada. En una realización preferida, la sal es una sal de sodio (p. ej., cloruro de sodio).

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 55 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 70 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0 mM a

aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 5 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 100 mM, menos de aproximadamente 80 mM, menos de aproximadamente 70 mM, o menos aproximadamente 60 mM. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 10 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 20 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 30 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 40 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 50 mM a menos de aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 60 mM a menos de aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 70 mM a menos de aproximadamente 100 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio aproximadamente 0 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 105 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 115 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 135 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 145 mM, o aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 0 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 10 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 20 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 30 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 60 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende cloruro de sodio aproximadamente 100 mM.

De manera ventajosa, también se encontró que la inclusión de un tensioactivo no iónico reduce sustancialmente la pérdida de AAV en las superficies y evita la formación de partículas visibles de las composiciones farmacéuticas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen una concentración estabilizante de un detergente no iónico. Los tensioactivos no iónicos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las formulaciones divulgadas en el presente documento son conocidos en la técnica de la ciencia farmacéutica e incluyen Polisorbato 80 (Tween 80; PS80), Polisorbato 20 (Tween 20; PS20) y varios poloxámeros o plurónicos, incluyendo Pluronic F-68, y BRIJ 35, o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el tensioactivo no iónico utilizado en las presentes composiciones farmacéuticas es polisorbato 80. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende PS80 Super Refined™ disponible comercialmente de Croda Health Care (Snaith, Reino Unido).

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v) o de aproximadamente 0,0025% (p/v) a aproximadamente 0,0075% (p/v). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,001% (p/v), a aproximadamente 0,0015% (p/v), a aproximadamente 0,002% (p/v), a aproximadamente 0,0025% (p/v), a aproximadamente 0,003% (p/v), a aproximadamente 0,0035% (p/v), a aproximadamente 0,004% (p/v), a aproximadamente 0,0045% (p/v), a aproximadamente 0,005% (p/v), a aproximadamente 0,0055% (p/v), a aproximadamente 0,006% (p/v), a aproximadamente 0,0065% (p/v), a aproximadamente 0,007% (p/v), a aproximadamente 0,0075% (p/v), a aproximadamente 0,008% (p/v), a aproximadamente 0,0085% (p/v), a aproximadamente 0,009% (p/v), a aproximadamente 0,0095% (p/v), a aproximadamente 0,001% (p/v). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v).

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende polisorbato 80 (p. ej., PS80 Super Refined™) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v) o de aproximadamente 0,0025% (p/v) a aproximadamente 0,0075% (p/v). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende PS80 a aproximadamente 0,001% (p/v), a aproximadamente 0,0015% (p/v), a aproximadamente 0,002% (p/v), a aproximadamente 0,0025% (p/v), a aproximadamente 0,003% (p/v), a aproximadamente 0,0035% (p/v), a aproximadamente 0,004% (p/v), a aproximadamente 0,0045% (p/v), a aproximadamente 0,005% (p/v), a aproximadamente 0,0055% (p/v), a aproximadamente 0,006% (p/v), a aproximadamente 0,0065% (p/v), a aproximadamente 0,007% (p/v), a aproximadamente 0,0075% (p/v), a

aproximadamente 0,008% (p/v), a aproximadamente 0,0085% (p/v), a aproximadamente 0,009% (p/v), a aproximadamente 0,0095% (p/v), a aproximadamente 0,001% (p/v). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende PS80 a aproximadamente 0,005% (p/v).

5 Se encontró que la inclusión de niveles moderados (es decir, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10%) de uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar ayuda a la estabilidad de las formulaciones líquidas y/o liofilizadas. Por ejemplo, el azúcar y/o el alcohol de azúcar permiten mejores propiedades durante los ciclos de congelación/descongelación. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen entre aproximadamente 2% y aproximadamente 10% de uno o  
10 más azúcares y/o alcoholes de azúcar. Se puede utilizar cualquier azúcar, como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidos por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, trehalosa, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa. En una realización particular, el azúcar es sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, la trehalosa es trehalosa dihidratada. Los alcoholes de azúcar se  
15 definen como un hidrocarburo que tiene entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 átomos de carbono y un grupo hidroxilo. Los ejemplos de alcoholes de azúcar que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento incluyen, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En ciertas realizaciones, el manitol se utiliza como un aditivo de alcohol de azúcar. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica contiene tanto un aditivo de azúcar como un alcohol  
20 de azúcar.

Los azúcares y alcoholes de azúcar se pueden utilizar individualmente o combinados. En algunas realizaciones, el azúcar, el alcohol de azúcar o una combinación de los mismos estarán presentes en la formulación a una concentración de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (p/v), de  
25 aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 1,5% (p/v), de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 7,5% (p/v), o de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% (p/v). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende azúcar, alcohol de azúcar, o una combinación de los mismos a aproximadamente 1,0% (p/v), a aproximadamente 1,1% (p/v), a aproximadamente 1,2% (p/v), a  
30 aproximadamente 1,3% (p/v), a aproximadamente 1,4% (p/v), a aproximadamente 1,5% (p/v), a aproximadamente 1,6% (p/v), a aproximadamente 1,7% (p/v), a aproximadamente 1,8% (p/v), a aproximadamente 1,9% (p/v), a aproximadamente 2,0% (p/v), a aproximadamente 2,5% (p/v), a aproximadamente 3,0% (p/v), a aproximadamente 3,5% (p/v), a aproximadamente 4,0% (p/v), a  
35 aproximadamente 4,5% (p/v), a aproximadamente 5,0% (p/v), a aproximadamente 5,5% (p/v), a aproximadamente 6,0% (p/v), a aproximadamente 6,5% (p/v), a aproximadamente 7,0% (p/v), a aproximadamente 7,5% (p/v), a aproximadamente 8,0% (p/v), a aproximadamente 8,5% (p/v), a aproximadamente 9,0% (p/v), a aproximadamente 9,5% (p/v), o a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, el azúcar es sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, la trehalosa es trehalosa dihidratada.

40 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa, o una combinación de las mismas de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (p/v), de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 1,5% (p/v), de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 7,5% (p/v), o de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% (p/v). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas a  
45 aproximadamente 1,0% (p/v), a aproximadamente 1,1% (p/v), a aproximadamente 1,2% (p/v), a aproximadamente 1,3% (p/v), a aproximadamente 1,4% (p/v), a aproximadamente 1,5% (p/v), a aproximadamente 1,6% (p/v), a aproximadamente 1,7% (p/v), a aproximadamente 1,8% (p/v), a aproximadamente 1,9% (p/v), a aproximadamente 2,0% (p/v), a aproximadamente 2,5% (p/v), a aproximadamente 3,0% (p/v), a aproximadamente 3,5% (p/v), a aproximadamente 4,0% (p/v), a  
50 aproximadamente 4,5% (p/v), a aproximadamente 5,0% (p/v), a aproximadamente 5,5% (p/v), a aproximadamente 6,0% (p/v), a aproximadamente 6,5% (p/v), a aproximadamente 7,0% (p/v), a aproximadamente 7,5% (p/v), a aproximadamente 8,0% (p/v), a aproximadamente 8,5% (p/v), a aproximadamente 9,0% (p/v), a aproximadamente 9,5% (p/v), o a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa, o una  
55 combinación de las mismas a aproximadamente 1,3% (p/v). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas a aproximadamente 5% (p/v). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa, o una combinación de las mismas de 10 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM, o de aproximadamente 35 mM a aproximadamente  
60 132 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM,  
65 aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130

mM, aproximadamente 140 mM, o aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas aproximadamente 35 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas aproximadamente 132 mM. En aspectos  
5 ilustrativos, la trehalosa es trehalosa dihidratada.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-  
asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, sal farmacéuticamente  
aceptable de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, tensioactivo no iónico de  
10 aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y azúcar y/o alcohol de azúcar de  
aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente  
aceptable es de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal  
farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 100 mM. En ciertas  
15 realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 150  
mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 50 nM a  
aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende adicionalmente  
glicina. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende glicina  
20 de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 35 mM a aproximadamente  
65 mM, glicina de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 45 mM a  
aproximadamente 55 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación  
comprende glicina aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM,  
25 aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM,  
aproximadamente 65 mM o aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica  
de la presente divulgación comprende adicionalmente glicina aproximadamente 50 mM.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende adicionalmente  
manitol. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende manitol  
30 de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 60 mM a aproximadamente  
140 mM, de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 130 mM, de aproximadamente 80 mM a  
aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 90 mM a aproximadamente 110 mM. En ciertas  
realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende manitol aproximadamente  
110 mM. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende glicina  
35 o manitol, pero no glicina y manitol.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-  
asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, sal farmacéuticamente  
aceptable de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, tensioactivo no iónico de  
40 aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y azúcar y/o alcohol de azúcar de  
aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente  
aceptable es de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la  
farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 100 mM. En ciertas  
realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 150  
45 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 50 nM a  
aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, el azúcar y/o alcohol de azúcar son sacarosa, trehalosa,  
manitol y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es  
cloruro de sodio.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-  
asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, sal farmacéuticamente  
aceptable de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, tensioactivo no iónico de  
50 aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y azúcar y/o alcohol de azúcar de  
aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente  
aceptable es de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal  
farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 100 mM. En ciertas  
realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 150  
55 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 50 nM a  
aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, el tensioactivo no iónico es polisorbato 20, polisorbato  
80, Pluronic F-68, BRIJ 35, y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el azúcar y/o alcohol  
de azúcar son sacarosa, trehalosa, manitol y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el  
60 tensioactivo no iónico es PS80. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de  
sodio.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-  
asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, sal farmacéuticamente

aceptable menos de aproximadamente 100 mM, tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y azúcar y/o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 0 nM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende glicina o manitol, pero no glicina y/o manitol juntos. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende glicina o manitol, pero no glicina y manitol. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adenoasociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, sal farmacéuticamente aceptable menos de aproximadamente 100 mM, tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y azúcar y/o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 0 nM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, el azúcar y/o alcohol de azúcar son sacarosa, trehalosa, manitol y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adenoasociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, sal farmacéuticamente aceptable menos de aproximadamente 100 mM, tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y azúcar y/o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 0 nM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 0 nM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a menos de aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, el tensioactivo no iónico es polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, BRIJ 35 y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el azúcar y/o alcohol de azúcar son sacarosa, trehalosa, manitol y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el tensioactivo no iónico es PS80. En ciertas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-

asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v).

5

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

10

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende: virus adeno-asociados (AAV) y L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

15

20

En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas con concentración de sal más baja que comprenden virus adeno-asociados (AAV) y cloruro de sodio de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende adicionalmente glicina de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

25

30

En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas con concentración de sal más baja que comprenden virus adeno-asociados (AAV) y cloruro de sodio de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 0 mM a menos de aproximadamente 100 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), y sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende adicionalmente glicina de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 60 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio menos de aproximadamente 30 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 60 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cloruro de sodio de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación liofilizada. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica con concentración de sal más baja es una formulación liofilizada.

35

40

45

50

55

60

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende virus adeno-asociados (AAV) y L-histidina aproximadamente 20 mM, cloruro de sodio aproximadamente 70 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v) y sacarosa a aproximadamente 5% (p/v). En ciertas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente  $7,5 \pm 0,2$  y/o la osmolalidad es de

65



L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 0 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005 % (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v) y glicina aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente  $7,0 \pm 0,2$ .

## 5 Componentes adicionales

En realizaciones ilustrativas, las formulaciones o composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden ingredientes farmacéuticamente aceptables adicionales. En aspectos ilustrativos, las formulaciones o composiciones farmacéuticas comprenden uno cualquiera o una combinación de los siguientes: agentes acidulantes, aditivos, adsorbentes, propelentes de aerosol, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalinizantes, agentes antiaglomerantes, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes tamponadores, agentes quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, desecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, disgregantes, agentes dispersantes, agentes potenciadores de la disolución, colorantes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de emulsión, cargas, agentes formadores de película, potenciadores de sabor, aromatizantes, potenciadores de flujo, agentes gelificantes, agentes granulantes, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de pomadas, pomadas, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases de pastillas, pigmentos, plastificantes, agentes abrillantadores, conservantes, agentes secuestrantes, penetrantes de la piel, agentes solubilizantes, disolventes, agentes estabilizantes, bases de supositorios, agentes tensioactivos, surfactantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes que aumentan la viscosidad, agentes absorbentes de agua, codisolventes miscibles con agua, suavizantes de agua o agentes humectantes. En algunas realizaciones, las formulaciones o composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden uno cualquiera o una combinación de los siguientes componentes: acacia, acesulfamo de potasio, citrato de tributilo acetilado, citrato de trietiloacetilado, agar, albúmina, alcohol, alcohol deshidratado, alcohol desnaturalizado, alcohol diluido, ácido aleurítico, ácido alginico, poliésteres alifáticos, alúmina, hidróxido de aluminio, estearato de aluminio, amilopectina,  $\alpha$ -amilosa, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, aspartamo, agua bacteriostática para inyectables, bentonita, magma de bentonita, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, bronopol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butilparabeno, butilparabeno de sodio, alginato de calcio, ascorbato de calcio, carbonato de calcio, ciclamato de calcio, fosfato de calcio anhidro dibásico, fosfato de calcio deshidratado dibásico, fosfato de calcio tribásico, propionato de calcio, silicato de calcio, sorbato de calcio, estearato de calcio, sulfato de calcio, sulfato de calcio hemihidrato, aceite de canola, carbómero, dióxido de carbono, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio,  $\beta$ -caroteno, carragenina, aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado, cera emulsionante catiónica, acetato de celulosa, ftalato acetato de celulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, celulosa microcristalina silicificada, carboximetil celulosa de sodio, alcohol cetoestearílico, cetrimida, alcohol cetílico, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, colesterol, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, hidrocloreuro de clorhexidina, clorodifluoroetano (HCFC), clorodifluorometano, clorofluorocarbonos (CFC) clorofenoxietanol, cloroxilenol, sólidos de jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro, ácido cítrico monohidratado, manteca de cacao, agentes colorantes, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmelosa de sodio, crospovidona, ácido ciclámico, ciclodextrinas, dextratos, dextrina, dextrosa, dextrosa anhidra, diazolidinil urea, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, dietanolamina, ftalato de dietilo, difluoroetano (HFC), dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, compuestos tipo ciclodextrina tales como Captisol<sup>®</sup>, dimetil éter, ftalato de dimetilo, edetato dipotásico, edetato disódico, hidrogenofosfato disódico, docusato de calcio, docusato de potasio, docusato de sodio, galato de dodecilo, bromuro de dodeciltrimetilamonio, edetato de calcio disódico, ácido edítico, eglumina, alcohol etílico, etilcelulosa, galato de etilo, laurato de etilo, etil maltol, oleato de etilo, etilparabeno potásico, etilparabeno de sodio, etil vanillina, fructosa, fructosa líquida, fructosa molida, fructosa libre de pirógeno, fructosa en polvo, ácido fumárico, gelatina, glucosa, glucosa líquida, mezclas de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, glicerina, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monooleato de glicerilo autoemulsionante, palmitoesteroato de glicerilo, glicina, glicoles, glicofurol, goma guar, heptafluoropropano (HFC), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, jarabe de alto contenido de fructosa, albúmina de suero humano, hidrocarburos (HC), ácido clorhídrico diluido, aceite vegetal hidrogenado tipo II, hidroxietilcelulosa, 2-hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, imidurea, carmín índigo, intercambiadores de iones, óxidos de hierro, alcohol isopropílico, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, solución salina isotónica, caolín, ácido láctico, lactitol, lactosa, lanolina, alcoholes de lanolina, lanolina anhidra, lecitina, silicato de magnesio y aluminio, carbonato de magnesio, carbonato de magnesio normal, carbonato de magnesio anhidro, hidróxido carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, lauril sulfato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, trisilicato de magnesio anhidro, ácido málico, malta, maltitol, solución de maltitol, maltodextrina, maltol, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, meglumina, mentol, metilcelulosa, metacrilato de metilo, oleato de metilo, metilparabeno, metilparabeno de potasio, metilparabeno de sodio, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica, aceite mineral, aceite mineral ligero, aceite mineral y alcoholes de lanolina, aceite, aceite de oliva, monoetanolamina, montmorillonita, galato de octilo, ácido oleico, ácido palmítico,

parafina, aceite de cacahuete, vaselina, vaselina y alcoholes de lanolina, glaseado farmacéutico, fenol, fenol licuado, fenoxietanol, fenoxipropanol, alcohol fenilético, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, poliacrilina, poliacrilina potásica, poloxamero, povidona, polidextrosa, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poliacrilatos, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polimetacrilatos, polioxi-etilen alquil éteres, derivados del aceite de ricino polioxi-etilenado, ésteres de ácidos grasos de polioxi-etilen sorbitol, estearatos de polioxi-etileno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, alginato de potasio, benzoato de potasio, bicarbonato de potasio, bisulfato de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, citrato de potasio anhidro, hidrogenofosfato de potasio, metabisulfato de potasio, fosfato de potasio monobásico, propionato de potasio, sorbato de potasio, povidona, propanol, ácido propiónico, carbonato de propileno, propilenglicol, alginato de propilenglicol, galato de propilo, propilparabeno, propilparabeno potásico, propilparabeno sódico, sulfato de protamina, aceite de colza, solución de Ringer, sacarina, sacarina amónica, sacarina cálcica, sacarina sódica, aceite de cártamo, saponita, proteínas de suero, aceite de ajonjolí, sílice coloidal, dióxido de silicio coloidal, alginato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bicarbonato de sodio, bisulfato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio anhidro, citrato de sodio deshidratado, cloruro de sodio, ciclamato de sodio, edetato sódico, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, metabisulfato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, propionato de sodio anhidro tribásico, propionato de sodio, sorbato de sodio, glicolato de almidón de sodio, estearil fumarato de sodio, sulfato de sodio, ácido sórbico, ésteres de sorbitán (ésteres grasos de sorbitán), sorbitol, solución de sorbitol al 70%, aceite de soja, cera de espermaceti, almidón, almidón de maíz, almidón de patata, almidón pregelatinizado, almidón de maíz esterilizable, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, alcohol estearílico, sacarosa, azúcares, azúcar comprimible, azúcar de confitería, esferas de azúcar, azúcar invertido, *Sugartab*, *Sunset Yellow FCF*, parafina sintética, talco, ácido tartárico, tartrazina, tetrafluoroetano (HFC), aceite de teobroma, timerosal, dióxido de titanio, alfa-tocoferol, acetato de tocoferilo, succinato ácido de alfa-tocoferol, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma-tocoferol, tragacanto, triacetina, citrato de tributilo, trietanolamina, citrato de trietilo, trimetil-β-ciclodextrina, bromuro de trimetiltetradecilamonio, tampón tris, edetato trisódico, vainillina, aceite vegetal hidrogenado tipo I, agua, agua blanda, agua dura, agua libre de dióxido de carbono, agua libre de pirógenos, agua para inyectables, agua estéril para inhalación, agua estéril para inyectables, agua estéril para irrigación, ceras, cera emulsionante aniónica, cera de carnaúba, cera emulsionante catiónica, cera de éster cetílico, cera microcristalina, cera emulsionante no iónica, cera de supositorio, cera blanca, cera amarilla, vaselina blanca, grasa de lana, goma xantana, xilitol, zeína, propionato de zinc, sales de zinc, estearato de zinc o cualquier excipiente en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, tercera edición, AH Kibbe (Pharmaceutical Press, Londres, Reino Unido, 2000), Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980) divulgan diversos componentes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier agente convencional sea incompatible con las composiciones farmacéuticas, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. En realizaciones ilustrativas, las formulaciones o composiciones farmacéuticas de la presente divulgación no comprenden una o una combinación de los ingredientes anteriores. En realizaciones ilustrativas, las formulaciones o composiciones farmacéuticas de la presente divulgación no comprenden ninguno de estos ingredientes. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación no comprende dextrano. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación no comprende cloruro de calcio.

#### pH

En realizaciones ilustrativas, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene un pH fisiológicamente compatible. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se proporcionan formulaciones de AAV que contienen un agente tamponador adecuado para mantener la formulación a un pH neutro.

En aspectos ilustrativos, el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,0, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0, de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,7, o de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación es aproximadamente 6,5 o aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0. En aspectos ilustrativos, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 7,0 o aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 7,0. En ciertas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 7,5.

#### Osmolalidad

En realizaciones ilustrativas, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una osmolalidad de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mOsmoles/kg, de aproximadamente 250 a

aproximadamente 400 mOsmoles/kg, o de aproximadamente 290 a aproximadamente 390 mOsmoles/kg. En ciertas realizaciones, una formulación de AAV proporcionada en el presente documento tendrá una osmolaridad, p. ej., de aproximadamente 200 mOsmoles/L, aproximadamente 210 mOsmoles/L, aproximadamente 220 mOsmoles/L, aproximadamente 230 mOsmoles/L, aproximadamente 240 mOsmoles/L, aproximadamente 250 mOsmoles/L, aproximadamente 260 mOsmoles/L, aproximadamente 270 mOsmoles/L, aproximadamente 280 mOsmoles/L, aproximadamente 290 mOsmoles/L, aproximadamente 300 mOsmoles/L, aproximadamente 310 mOsmoles/L, aproximadamente 320 mOsmoles/L, aproximadamente 330 mOsmoles/L, aproximadamente 340 mOsmoles/L, aproximadamente 350 mOsmoles/L, aproximadamente 360 mOsmoles/L, aproximadamente 370 mOsmoles/L, aproximadamente 380 mOsmoles/L, aproximadamente 390 mOsmoles/L, aproximadamente 390 mOsmoles/L, o aproximadamente 400 mOsmoles/L. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsmoles/kg a aproximadamente 400 mOsmoles/kg. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una osmolalidad de aproximadamente  $300 \pm 10$  mOsmoles/kg o de aproximadamente  $380 \pm 10$  mOsmoles/kg. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una osmolalidad de aproximadamente  $300 \pm 10$  mOsmoles/kg. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una osmolalidad de aproximadamente  $380 \pm 10$  mOsmoles/kg.

Los ejemplos de agentes de tonicidad que se pueden utilizar en las formulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen cloruro de sodio, dextrosa, sacarosa, xilitol, fructosa, glicerol, sorbitol, manitol, trehalosa, cloruro de potasio, manosa, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, otras sales inorgánicas, otros azúcares, otros alcoholes de azúcar, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una formulación de AAV puede comprender al menos un agente de tonicidad, o al menos dos, tres, cuatro, cinco o más agentes de tonicidad.

#### AAV

En realizaciones ilustrativas, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende AAV. El AAV puede ser de cualquier serotipo de AAV. En aspectos ilustrativos, el AAV es de serotipo de AAV1, serotipo de AAV2, serotipo de AAV3, serotipo de AAV4, serotipo de AAV5, serotipo de AAV6, serotipo de AAV7, serotipo de AAV8, serotipo de AAV9 o serotipo de AAV10. En aspectos ilustrativos, el AAV es de serotipo de AAV8.

En ciertas realizaciones de las formulaciones proporcionadas en el presente documento, el AAV es un rAAV como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Núm. 2017/0233455 y la Solicitud Provisional Núm. 62/509616.

En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende un producto de AAV de alto título. En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente  $10^{10}$  partículas de virus (pv) o al menos aproximadamente  $10^{11}$  partículas de virus (pv) o al menos aproximadamente  $10^{12}$  partículas de virus (pv) o al menos aproximadamente  $10^{13}$  partículas de virus (pv). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente  $10^{14}$  partículas de virus (pv) o al menos aproximadamente  $10^{15}$  partículas de virus (pv), p. ej., al menos aproximadamente  $2 \times 10^{15}$  partículas de virus (pv), al menos aproximadamente  $5 \times 10^{15}$  partículas de virus (pv). La composición farmacéutica comprende también aproximadamente  $10^{10}$  genomas de vectores (gv) o al menos aproximadamente  $10^{11}$  genomas de vectores (gv) o al menos aproximadamente  $10^{12}$  genomas de vectores (gv) o al menos aproximadamente  $10^{13}$  genomas de vectores (gv). En aspectos ilustrativos, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente  $10^{14}$  genomas de vectores (gv) o al menos aproximadamente  $10^{15}$  genomas de vectores (gv), p. ej., al menos aproximadamente  $2 \times 10^{15}$  genomas de vectores (gv), al menos aproximadamente  $5 \times 10^{15}$  genomas de vectores (gv).

#### Métodos de fabricación y usos

Los métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende AAV se proporcionan adicionalmente en el presente documento. En aspectos ilustrativos, el método comprende combinar agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM o sal farmacéuticamente aceptable menos de aproximadamente 100 mM, tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) y AAV, obteniendo así una composición farmacéutica que comprende AAV. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM o sal farmacéuticamente aceptable menos de aproximadamente 100 mM, tensioactivo no iónico de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 20 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 70 mM,

tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v) y azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v) y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 100 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 80 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 70 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 60 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 50 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 40 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 30 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativo, el método comprende preparar una composición, por ejemplo, una solución acuosa, que comprende aproximadamente 10 mM de agente tampón, aproximadamente 40 mM de sal farmacéuticamente aceptable, aproximadamente 0,005 % (p/v) de tensioactivo no iónico, aproximadamente 5 % (p/v) azúcar y/o alcohol de azúcar, y aproximadamente 50 mM de glicina y añadiendo AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, por ejemplo, una solución acuosa, que comprende aproximadamente 10 mM de agente tampón, aproximadamente 30 mM de sal farmacéuticamente aceptable, aproximadamente 0,005 % (p/v) de tensioactivo no iónico, aproximadamente 5 % (p/v) azúcar y/o alcohol de azúcar, y aproximadamente 50 mM de glicina y añadiendo AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 10 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 0 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), azúcar y/o alcohol de azúcar a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende agente tamponador aproximadamente 20 mM, sal farmacéuticamente aceptable aproximadamente 60 mM, tensioactivo no iónico a aproximadamente 0,005% (p/v), aproximadamente 35 mM de azúcar y/o alcohol de azúcar, y manitol aproximadamente 110 mM y añadir AAV a la composición. En ciertas realizaciones, la solución acuosa es liofilizada.

Los métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende AAV se proporcionan adicionalmente en el presente documento. En aspectos ilustrativos, el método comprende combinar L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01% (p/v), sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) y AAV, obteniendo así una composición farmacéutica que comprende AAV. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 (PS80) de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 0,01 % (p/v), y sacarosa o trehalosa de aproximadamente 1% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v) y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende L-histidina aproximadamente 20 mM, cloruro de sodio aproximadamente 70 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v) y sacarosa a aproximadamente 5% (p/v) y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 100 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 80 mM, polisorbato 80 (PS80) a

aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 70 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 60 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 50 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 40 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 30 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 20 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa, que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 10 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 0 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa a aproximadamente 5% (p/v), y glicina aproximadamente 50 mM y añadir AAV a la composición. En aspectos ilustrativos, el método comprende preparar una composición, p. ej., una solución acuosa que comprende L-histidina aproximadamente 20 mM, cloruro de sodio aproximadamente 60 mM, polisorbato 80 (PS80) a aproximadamente 0,005% (p/v), trehalosa aproximadamente 35 mM, y manitol aproximadamente 110 mM y añadir AAV a la composición. En ciertas realizaciones, la solución acuosa es liofilizada.

En ciertas realizaciones, la liofilización se utiliza para producir una composición deshidratada, y por lo tanto la composición (p. ej., la composición que contiene el AAV) es una composición liofilizada. En algunos casos, una composición liofilizada es una composición en la que el agua se ha eliminado de la composición por sublimación, en donde el agua en la composición sufre una transición de fase de un sólido a un gas. Por ejemplo, una composición liofilizada puede ser una composición en la que el agua se ha eliminado de la composición al congelar la composición (p. ej., al congelar el agua de la composición) y después reducir la presión que rodea la composición de modo que el agua en la composición experimente sublimación. Como se describió anteriormente, una composición liofilizada puede incluir agua en una cantidad baja, tal como 25% o menos, o 20% o menos, o 15% o menos, o 10% o menos, o 9% o menos, o 8% o menos, o 7% o menos, o 6% o menos, o 5% o menos, o 4% o menos, o 3% o menos, o 2% o menos, o 1% o menos, o 0,5% o menos, o 0,25% o menos, o 0,1% o menos agua según lo medido por la titulación Karl Fischer (KF). En ciertas realizaciones, una composición liofilizada tiene 3% o menos de agua, según lo medido por la titulación Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición liofilizada tiene 2% o menos de agua según se mide por la titulación de Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición liofilizada tiene 1% o menos de agua, según lo medido por la titulación Karl Fischer. En ciertas realizaciones, una composición liofilizada tiene 0,5% o menos de agua según se mide mediante la titulación de Karl Fischer.

Durante la liofilización, la temperatura de la composición puede reducirse, p. ej., a una temperatura por debajo del punto de congelación del agua en la composición. Por ejemplo, la temperatura de la composición puede reducirse a 0°C o menos, o -5°C o menos, o -10°C o menos, o -15°C o menos, o -20°C o menos, o -25°C o menos, o 30°C o menos, o -35°C o menos, o -40°C o menos, o -45°C o menos, o -50°C o menos, o 55°C o menos, o -60°C o menos, o -65°C o menos, o -75°C o menos. En algunos casos, la temperatura de la composición se reduce a -20°C. En algunos casos, la temperatura de la composición se reduce a  $\leq$  -60°C (punto de ajuste -80°C).

En ciertas realizaciones, la presión que rodea la composición se reduce por debajo de la presión atmosférica normal. Por ejemplo, la presión que rodea la composición puede reducirse a 500 mmHg (Torr) o menos, tal como 250 mmHg (Torr) o menos, o 100 mmHg (Torr) o menos, o 50 mmHg (Torr) o menos, o 10 mmHg (Torr) o menos, o 1 mmHg (Torr) o menos, o 0,5 mmHg (Torr) o menos, o 0,4 mmHg (Torr) o menos, o 0,3 mmHg (Torr) o menos, o 0,2 mmHg (Torr) o menos, o 0,1 mmHg (Torr) o menos, o 0,09 mmHg (Torr) o menos, o 0,08 mmHg (Torr) o menos, o 0,07 mmHg (Torr) o menos, o 0,06 mmHg (Torr) o menos, o 0,05

mmHg (Torr) o menos, o 0,04 mmHg (Torr) o menos, o 0,03 mmHg (Torr) o menos, o 0,02 mmHg (Torr) o menos, o 0,01 mmHg (Torr) o menos, o 0,005 mmHg (Torr) o menos, o 0,001 mmHg (Torr) o menos. En algunos casos, la presión que rodea la composición se reduce de 0,04 a 0,05 mmHg (Torr) o menos, y por ejemplo de 0,015 a 0,02 mmHg (Torr).

5

En algunas realizaciones, la liofilización también puede incluir aumentar la temperatura de la composición mientras se reduce la presión que rodea a la composición. Por ejemplo, la temperatura de la composición se puede aumentar desde una temperatura mínima como se describió anteriormente a una temperatura mayor que la temperatura mínima. En algunos casos, la temperatura aumenta para facilitar la sublimación del agua de la composición a la presión circundante reducida.

10

Las realizaciones del método para preparar la composición de AAV liofilizada también pueden incluir la producción de la composición de producto concentrado acuoso, que posteriormente es liofilizada.

15

En aspectos ilustrativos, el método comprende colocar la composición que comprende AAV en un recipiente de vidrio o plástico, p. ej., un vial de vidrio o un tubo de plástico. En aspectos ilustrativos, el recipiente de vidrio o plástico es uno cualquiera de los conocidos en la técnica, disponible comercialmente y/o descrito en el presente documento (véase, p. ej., el Ejemplo 3). En aspectos ilustrativos, el método comprende colocar de aproximadamente 0,1 mL a aproximadamente 10 ml de la composición que comprende AAV en el

20

recipiente de vidrio o plástico. En aspectos ilustrativos, el método comprende colocar aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 6 mL (p. ej., aproximadamente 0,2 ml, aproximadamente 0,3 ml, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 5,6 ml) de la composición que comprende AAV en el recipiente de vidrio o plástico. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas se describen en el presente documento (véanse, p. ej., los Ejemplos 1 y 2).

25

La provisión de la composición en un recipiente puede facilitar el mantenimiento de la composición como una composición estéril. Por ejemplo, el recipiente puede estar configurado para mantener la composición encerrada en el recipiente en un ambiente estéril. Como tal, el recipiente puede ser un recipiente sellado, por ejemplo, el recipiente puede incluir un sello, tal como un sello hermético al agua y/o un sello hermético al aire. El sello puede ser separable del recipiente para permitir que el usuario acceda al contenido del recipiente. En algunos casos, el sello puede ser un sello frangible, o en otros casos, el sello puede configurarse para permitir la inserción de una aguja, cánula o jeringa en el interior del recipiente sin quitar el sello del recipiente. En algunos casos, un sello configurado para permitir el acceso al interior del recipiente sin quitar el sello del recipiente puede facilitar el mantenimiento del contenido del recipiente (p. ej., la composición del recipiente)

30

en un ambiente estéril antes de la administración de la composición a un sujeto. Los materiales adecuados para el sello incluyen, por ejemplo, sellos de caucho o polímero, tales como caucho de silicona, caucho natural, caucho de estireno butadieno, copolímeros de etileno-propileno, policloropreno, poliácrlato, polibutadieno, poliuretano, estireno butadieno, y similares, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sello es un septo perforable por una aguja, jeringa o cánula. El sello también puede proporcionar un acceso conveniente a una muestra en el recipiente, así como una barrera protectora que cubra la abertura del recipiente. En algunos casos, el sello es un sello separable, tal como una tapa roscada o a presión u otro elemento de sellado adecuado que se puede aplicar a la abertura del recipiente. Por ejemplo, una tapa roscada se puede atornillar sobre la abertura antes o después de haber añadido una muestra al recipiente.

40

45

En algunos casos, el recipiente es un recipiente de dosificación unitaria. Un recipiente de dosificación unitaria se refiere a un recipiente que contiene una o más dosificaciones unitarias para su administración a un sujeto. En algunas realizaciones, un recipiente de dosificación unitaria incluye una cantidad predeterminada de una composición sujeto calculada en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado en un sujeto. Ciertas realizaciones de las composiciones se pueden proporcionar en un recipiente de dosificación unitaria adecuado para la administración individual de dosificaciones precisas. La cantidad de composición activa administrada a un sujeto puede depender del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la dolencia y la forma de administración. Por ejemplo, el recipiente de dosificación unitaria puede contener una cantidad de la composición que se debe administrar como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz para lograr el efecto deseado en el sujeto que se esté tratando. En ciertos casos, un recipiente de dosificación unitaria incluye una composición que tiene un AAV en una cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, el recipiente de dosificación unitaria es un vial. En algunos casos, el vial es un vial sellado (p. ej., como se describió anteriormente con respecto a un recipiente sellado).

50

55

60

El recipiente puede estar compuesto de cualquier material conveniente que sea compatible con el AAV y otros componentes de la composición. Por ejemplo, el recipiente puede ser un recipiente compatible con sólidos configurado para contener un sólido (p. ej., una composición liofilizada). En algunos casos, el recipiente es un recipiente compatible con líquidos configurado para contener un líquido. Los recipientes también pueden ser compatibles con sólidos y líquidos, donde el recipiente está configurado para contener sólidos y líquidos. En algunos casos, un líquido en el recipiente puede ser un líquido acuoso, y en estos casos, el recipiente puede ser compatible con composiciones acuosas. Por "compatible" se entiende que el

65

recipiente es sustancialmente inerte (p. ej., no reacciona significativamente con) el líquido y/o las composiciones u otros componentes en contacto con el recipiente. Los ejemplos de materiales de recipientes adecuados incluyen vidrio y plástico. Por ejemplo, el recipiente puede estar compuesto de vidrio, tal como vidrio de silicato, vidrio de borosilicato, vidrio de borosilicato de sodio (p. ej., PYREXTM), vidrio de cuarzo fundido, vidrio de sílice fundido y similares. Otros ejemplos de materiales de recipientes adecuados para el recipiente incluyen plásticos, tales como polipropileno, polimetilpenteno, politetrafluoroetileno (PTFE), perfluoroéteres (PFE), etileno propileno fluorado (FEP), perfluoroalcoxi alcanos (PFA), tereftalato de polietileno (PET), polietileno (PE), polieterecetona (PEEK), poliestireno y similares. En ciertos casos, como se describió anteriormente, el recipiente es un vial, y como tal puede ser un vial de vidrio. Como se describió anteriormente, el recipiente puede ser un recipiente sellado, y como tal puede ser un vial de vidrio sellado.

En aspectos ilustrativos, el volumen de la composición que comprende AAV colocado en el recipiente de vidrio o plástico es de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml, de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 6 ml, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 2,5 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 4 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 10 ml, de aproximadamente 6 ml a aproximadamente 9 ml o de aproximadamente 7 ml a aproximadamente 8 ml. En aspectos ilustrativos, el volumen es de aproximadamente 0,1 ml, aproximadamente 0,2 ml, aproximadamente 0,25 ml, aproximadamente 0,3 ml, aproximadamente 0,4 ml, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,6 ml, aproximadamente 0,7 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 0,8 ml, aproximadamente 0,9 ml, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 3 ml, aproximadamente 4 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 5,5 ml, aproximadamente 5,6 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 7,5 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 9 ml o aproximadamente 10 ml.

En aspectos ilustrativos, la composición que comprende AAV se almacena a una temperatura de aproximadamente -80°C a aproximadamente -10°C durante al menos 1 mes (p. ej., al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, a menos 5 meses, al menos 6 meses). En aspectos ilustrativos, la composición que comprende AAV se almacena a una temperatura aproximadamente -60°C a aproximadamente -20°C durante al menos 1 mes (p. ej., al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses). En aspectos ilustrativos, la composición que comprende AAV se almacena durante 3, 4, 5 o 6 meses o más. Los métodos para almacenar la composición se describen en el presente documento (véanse, p. ej., los Ejemplos 1 a 3). En aspectos ilustrativos, más de 80% de la cantidad inicial de AAV (p. ej., la cantidad de AAV en la composición antes del almacenamiento) es potente después del período de almacenamiento (p. ej., un período de almacenamiento de aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses o más). En aspectos ilustrativos, más de 90% de la cantidad inicial de AAV es potente después del período de almacenamiento (p. ej., un período de almacenamiento de aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o aproximadamente 6 meses o más). En aspectos ilustrativos, más de 95% de la cantidad inicial de AAV es potente después del período de almacenamiento (p. ej., un período de almacenamiento de aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o aproximadamente 6 meses o más). En aspectos ilustrativos, la biopotencia del AAV al final del período de almacenamiento es sustancialmente la misma que la biopotencia del AAV al comienzo del período de almacenamiento. En aspectos ilustrativos, la biopotencia del AAV al final del período de almacenamiento se incrementa con relación a la biopotencia del AAV al comienzo del período de almacenamiento. En aspectos ilustrativos, la apariencia de la composición al final del período de almacenamiento es sustancialmente la misma que la composición al comienzo del período de almacenamiento. En aspectos ilustrativos, la apariencia de la composición al final del período de almacenamiento se caracteriza por no tener partículas visibles. En aspectos ilustrativos, la concentración de partículas de la composición al final del período de almacenamiento es sustancialmente la misma que la concentración de partículas de la composición al comienzo del período de almacenamiento. En aspectos ilustrativos, la concentración de partículas de la composición al final del período de almacenamiento se determina mediante imágenes de microflujo (MFI).

Una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en métodos para tratar un trastorno tratable mediante terapia génica en un sujeto. En aspectos ilustrativos, el trastorno es un trastorno de sangrado (p. ej., hemofilia A o B) y una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en el método de tratamiento comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad eficaz para tratar el trastorno de sangrado.

En aspectos ilustrativos, los métodos comprenden administrar la composición farmacéutica mediante administración parenteral. El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario sino por alguna otra vía. Por ejemplo, las formulaciones divulgadas en el presente documento pueden formularse para su administración a través de métodos conocidos, tales como la administración intravenosa (p. ej., como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo), por vía intramuscular, intraperitoneal,

intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o mediante inhalación. En ciertas realizaciones, las formulaciones de AAV proporcionadas en el presente documento se pueden administrar sistémicamente o localmente. La administración sistémica incluye: vías de administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, sublingual o rectal. La administración local incluye: vías de administración tópica, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

Los métodos de administración de AAV para la terapia génica de un sujeto son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Monahan, Gene therapy in an era of emerging treatment options for hemophilia B, *J Thromb Haemost.* junio de 2015; 13(01): S151–S160.

Las composiciones reconstituidas de la presente divulgación se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección o por vía intravenosa. En estas realizaciones, antes de la administración de la composición reconstituida a un sujeto, una composición sólida, p. ej., como se describió anteriormente, se puede combinar con un líquido para proporcionar una composición líquida adecuada para su administración, por ejemplo mediante inyección o por vía intravenosa. En algunos casos, antes de la administración de la composición a un sujeto, se puede combinar una composición sólida con agua (p. ej., agua para inyectables, WFI) o tapón/agente tamponador (p. ej., como se describió anteriormente) para proporcionar una composición acuosa adecuada para su administración, por ejemplo mediante inyección o por vía intravenosa. Por ejemplo, una composición liofilizada puede ser reconstruido con agua (p. ej., agua para inyección, WFI) o tampon/agente tamponador (p. ej., como se describió anteriormente) para producir una unidad de dosificación reconstituida adecuada para la administración a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección o por vía intravenosa.

En ciertas realizaciones, la unidad de dosificación reconstituida tiene un pH compatible con las condiciones fisiológicas. En algunos casos, el pH de la unidad de dosificación reconstituida varía de 6 a 8. En algunos casos, el pH de la unidad de dosificación reconstituida varía de 7 a 8. Por ejemplo, el pH de la unidad de dosificación reconstituida puede variar de 7 a 7,5. En algunos casos, el pH de la unidad de dosificación reconstituida es de 7,0. En algunos casos, el pH de la unidad de dosificación reconstituida es 7,1. En algunos casos, el pH de la dosis reconstituida es de 7,2. En algunos casos, el pH de la unidad de dosificación reconstituida es 7,3. En algunos casos, el pH de la dosis reconstituida es de 7,4.

La unidad de dosificación reconstituida puede incluir una cantidad predeterminada de la composición de la presente divulgación calculada en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico deseado en un sujeto. La cantidad de la composición en una unidad de dosificación reconstituida que se administra a un sujeto puede depender del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la dolencia y la forma de administración. Por ejemplo, la unidad de dosificación reconstituida puede incluir una cantidad de la composición que se debe administrar como se divulga en el presente documento en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Cuando se administra a un sujeto, la unidad de dosificación líquida o reconstituida puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz del AAV de tal manera que la unidad de dosificación reconstituida libere de  $1E + 10$  pv/ml a  $5E + 15$  pv/ml o  $1E + 10$  cp/ml a  $5E + 15$  cp/ml.

En ciertas realizaciones, el método incluye administrar el líquido o la unidad de dosificación reconstituida al sujeto de acuerdo con un régimen de tratamiento. Por ejemplo, en algunos casos, a un sujeto que se debe tratar se le puede haber prescrito un régimen de tratamiento por parte de un profesional de la salud. En algunos casos, un régimen de tratamiento incluye la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez por mes, una vez cada 5 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada dos meses, y cualquiera de sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el régimen de tratamiento incluye administrar una o más dosis durante un período de tiempo prolongado. En ciertos casos, se administra una dosis única (p. ej., una unidad de dosificación única) al sujeto, y la dosis inicial puede ser seguida por una o más dosis administradas al sujeto en un momento posterior. En algunos casos, se administra más de una dosis (p. ej., más de una unidad de dosificación) al sujeto, y las dosis iniciales pueden ir seguidas de una o más dosis administradas al sujeto en un momento posterior. Por ejemplo, se puede administrar al sujeto una dosis única (p. ej., una unidad de dosificación única), y la dosis única puede estar seguida por una dosis única administrada al sujeto en un momento posterior. Se pueden administrar dosis únicas adicionales en puntos posteriores en el tiempo. En otros casos, se puede administrar una dosis única (p. ej., una unidad de dosificación única) al sujeto, y la dosis única puede estar seguida por dos dosis administradas al sujeto en un momento posterior. Se pueden administrar dosis únicas o múltiples adicionales en puntos posteriores en el tiempo.

En ciertas realizaciones, las unidades de dosificación reconstituidas de la presente divulgación se pueden administrar antes, concurrentemente o después de otros agentes activos para tratar afecciones relacionadas

o no relacionadas, p. ej., en terapia combinada. Los ejemplos de tales terapias adicionales incluyen terapias de radiación, terapias quirúrgicas y terapias quimioterapéuticas. Si se proporcionan al mismo tiempo que otros agentes activos, las unidades de dosificación reconstituidas de la presente divulgación se pueden proporcionar en la misma formulación o en una formulación diferente. Por ejemplo, la terapia concurrente se puede lograr administrando una unidad de dosificación reconstituida y una composición farmacéutica que tiene al menos otro agente activo, tal como un agente quimioterapéutico, que combinado proporciona una dosis terapéuticamente eficaz, de acuerdo con un régimen de tratamiento particular. Se puede realizar la administración de composiciones farmacéuticas separadas simultáneamente o en diferentes momentos (p. ej., secuencialmente, en cualquier orden, en el mismo día o en días diferentes), siempre que se produzca un efecto terapéuticamente eficaz de la combinación de estas sustancias en el sujeto que se encuentra bajo terapia.

En consecuencia, los aspectos de la presente divulgación incluyen adicionalmente terapias combinadas. En ciertas realizaciones, el método en cuestión incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes activos adicionales. Por terapia combinada se entiende que una composición de AAV (p. ej., como se describió en el presente documento) se puede utilizar en una combinación con otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección únicas. En ciertas realizaciones, se administra un compuesto de la presente divulgación simultáneamente a la administración de otro agente terapéutico, que se puede administrar como un componente de una composición que incluye el compuesto de la presente divulgación o como un componente de una composición diferente. En ciertas realizaciones, una composición que incluye un compuesto de la presente divulgación se administra antes o después de la administración de otro agente terapéutico.

Los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente para ilustrar la presente invención.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra los estudios iniciales que llevaron a la selección de tres formulaciones para un desarrollo adicional.

Se fabricaron seis formulaciones diferentes. En resumen, un lote único que comprendía material de cápsidas en su mayor parte vacías se diluyó con tampón de PBS/NaCl/Sorbitol para generar 180,8 g. La solución se enriqueció con un Tween 80 super refinado Croda al 0,005% para evitar la pérdida excesiva de material por adsorción. Esta solución se dividió en 6 partes, que contenían cada una 30 g de material. La solución tampón se cambió después en una de los seis tampones utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer y esta etapa se realizó tres veces con un volumen de 100 veces. Después de las tres etapas de diálisis, cada una de las soluciones sometidas a diálisis se cargó en viales de 2 ml de SiO<sub>2</sub> (volumen de carga = 0,25 ml) y después se almacenaron a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $\leq -60^\circ\text{C}$  (punto de calibración:  $-80^\circ\text{C}$ ) durante hasta 6 meses y a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta 4 meses. Las Tablas 1-6 describen las Formulaciones 1-6 (también conocidas como Tampones 1-6 y Muestras 1-6), respectivamente.

TABLA 1: Formulación 1: Tampón de PBS/NaCl/Sorbitol con Polisorbato 80 (PS80)

45

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
Cloruro de sodio	350	20,45
Cloruro de potasio	2,68	0,20
Dihidrato de hidrogenofosfato disódico	8,09	1,44
Fosfato monopotásico	1,47	0,20
D-Sorbitol	5%	50,00
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
HCl al 25%		Ajuste de pH
NaOH 1 M		
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		$7,4 \pm 0,3$

TABLA 2: Formulación 2

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
------------	--------------------	------------------------------

## ES 2 981 519 T3

L-histidina	20	3,103
NaCl	70	4,091
Sacarosa	5%	50,00
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,050
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,5

TABLA 3: Formulación 3

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	20	3,103
NaCl	60	3,506
Manitol	110	20,039
Dihidrato de trehalosa	35	13,24
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 4: Formulación 4

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	100	5,844
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50,00
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 5: Formulación 5

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
Dihidrato de citrato trisódico	15	4,41
Glicina	15	1,13
Manitol	2%	20,00
Dihidrato de trehalosa	1%	10,00
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,3 ± 0,1

TABLA 6: Formulación 6

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
TRIS	80	9,691
Dextrano T40	1,77%	17,70
Dextrano T 10	0,53%	5,30
Sacarosa	6,9%	69,00
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,1

## ES 2 981 519 T3

5 El título de partículas totales (vacías + completas) se probó mediante un ELISA de partículas de rAAV totales. La pureza de AAV y la degradación química se probaron mediante SDS-PAGE (tinción de fluorescencia, gel BisTris al 4-12% con Tinción Flamingo). La degradación física (cápsidas dañadas o fragmentos) se probó mediante SEC y MFI. También se probaron la apariencia y el pH.

10 Las formulaciones almacenadas a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $\leq -60^\circ\text{C}$  (punto de calibración:  $-80^\circ\text{C}$ ) se probaron para determinar MFI, apariencia, pH, ELISA de partículas rAAV8 totales, SDS-PAGE y SEC en los puntos temporales de prueba indicados en la Tabla 7. Un "-" indica que no se tomaron muestras.

TABLA 7: Esbozo del estudio para muestras almacenadas a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $\leq -60^\circ\text{C}$  (\*punto de calibración  $-80^\circ\text{C}$ )

Prueba	Volumen de la Muestra	Punto temporal de la prueba (meses)					Número total de muestras
		0	1	2 (8 semanas)	3	6	
IMF	3 ml	x	-	-	-	x	50
Apariencia	1 ml	x	x	x	x	x	10
Valor de pH		x	x	x	x	x	
ELISA partículas rAAV8 totales	2x 0,3 ml	x	x	x	x	x	100
SDS-PAGE	0,3 ml	x	x	x	x	x	50
(tinción fluorescencia, gel BisTris al 4-12 % con Tinción Flamingo)							
SEC	0,3 ml	x	x	x	x	x	50

15 Las formulaciones almacenadas a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  se probaron para determinar MFI, apariencia, pH, ELISA de partículas rAAV8 totales, SDS-PAGE y SEC en los puntos temporales de prueba indicados en la Tabla 8. Un "-" indica que no se tomaron muestras.

TABLA 8: Esbozo de estudio para muestras almacenadas a  $+5 \pm 3^\circ\text{C}$

Prueba	Volumen de la Muestra	Punto temporal de la prueba (meses)				Número total de muestras
		0	1	2 (8 semanas)	4	
IMF	3 ml	x	-	-	-	x
Apariencia	1 ml	x	x	x	x	20
Valor de pH		x	x	x	x	
ELISA partículas rAAV8 totales	2x 0,3 ml	x	x	x	x	40
SDS-PAGE (tinción fluorescencia, gel BisTris al 4-12 % con Tinción Flamingo)	0,3 ml	x	x	x	x	20
SEC	0,3 ml	x	x	x	x	20

20 Los resultados de la prueba de apariencia se muestran en la Tabla 9, en donde la clasificación de la inspección de partículas a simple vista fue la siguiente: Nivel A = no hay partículas visibles; Nivel B = partículas pequeñas individuales, apenas visibles; Nivel C = partículas pequeñas individuales, fácilmente visibles; Nivel D muchas partículas pequeñas, fácilmente visibles; y Nivel E = partículas visibles mayores o iguales a 1 mm.

## ES 2 981 519 T3

TABLA 9 Apariencia con almacenamiento a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Punto temporal de la prueba/tampón a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	4 meses	/
tampón 1 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	A	A-B	A-B	C	
tampón 2 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	
tampón 3 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	
tampón 4 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	
tampón 5 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	
tampón 6 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	A (amarillo)	A (amarillo)	A (amarillo)	A (amarillo)	
Punto temporal de la prueba/tampón a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
tampón 1 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	A	A-B	A-B	A-B	A-B
tampón 2 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
tampón 3 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
tampón 4 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
tampón 5 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
tampón 6 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	A (amarillo)	A (amarillo)	A (amarillo)	A (amarillo)	A(amarillo)
Punto temporal de la prueba/tampón a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
Tampón 1 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	A	A-B	A-B	A	A
Tampón 2 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
Tampón 3 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
Tampón 4 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
Tampón 5 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	A	A	A	A	A
Tampón 6 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	A (amarillo)	A (amarillo)	A (amarillo)	A (amarillo)	A(amarillo)

Los resultados de los ensayos de pH se muestran en la Tabla 10. No se pueden observar cambios significativos para los valores de pH después de almacenarse a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante hasta 4 meses y a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  durante hasta 6 meses después de la descongelación.

5 TABLA 10: Valores de pH totales con almacenamiento a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Punto temporal de la prueba/tampón a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	Valor de pH objetivo	0 meses	1 mes	8 semanas	4 meses	/
tampón 1 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	7,4	7,24	7,29	7,31	7,31	
tampón 2 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	7,5	7,37	7,38	7,40	7,47	
tampón 3 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	7,0	6,86	6,95	7,00	7,01	
tampón 4 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	7,0	6,93	6,89	7,01	7,01	
tampón 5 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	7,3	7,22	7,08	7,13	7,23	
tampón 6 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	7,1	7,12	7,11	7,10	7,09	
Punto temporal de la prueba/tampón a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	Valor de pH objetivo	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
tampón 1 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	7,4	7,24	7,32	7,33	7,34	7,33
tampón 2 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	7,5	7,37	7,37	7,42	7,40	7,38
tampón 3 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	7,0	6,86	7,00	7,02	7,00	7,00
tampón 4 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	7,0	6,93	6,97	6,99	6,97	6,99
tampón 5 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	7,3	7,22	6,90	6,93	6,92	6,93
tampón 6 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	7,1	7,12	6,88	6,98	6,98	6,98
Punto temporal de la prueba/tampón a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	Valor de pH objetivo	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
Tampón 1 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	7,4	7,24	7,31	7,34	7,34	7,31
Tampón 2 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	7,5	7,37	7,40	7,42	7,41	7,39
Tampón 3 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	7,0	6,86	6,98	7,04	7,01	7,00
Tampón 4 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	7,0	6,93	6,89	7,00	7,00	7,00
Tampón 5 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	7,3	7,22	6,88	6,93	6,94	6,92
Tampón 6 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	7,1	7,12	6,86	6,98	6,98	6,97

Los resultados del ELISA de titulación de AAV8 se muestran en la Tabla 11. Ninguno de los resultados durante el almacenamiento a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  muestra diferencias significativas entre las seis

## ES 2 981 519 T3

formulaciones investigadas. Se muestran los resultados armonizados (calculados con 0,44).

TABLA 11: ELISA de titulación de AAV8 calculado con almacenamiento a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Punto temporal de la prueba/tampón a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	4 meses	/
tampón 1 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,45E+13	1,74E+13	2,43E+13	1,77E+13	
tampón 2 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,45E+13	1,57E+13	1,93E+13	1,80E+13	
tampón 3 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,31E+13	1,49E+13	1,94E+13	1,64E+13	
tampón 4 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,46E+13	1,57E+13	2,00E+13	1,92E+13	
tampón 5 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,41E+13	1,52E+13	2,02E+13	1,72E+13	
tampón 6 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,74E+13	1,88E+13	2,42E+13	2,09E+13	
Punto temporal de la prueba/tampón a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
tampón 1 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,45E+13	1,58E+13	1,93E+13	1,89E+13	1,92E+13
tampón 2 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,45E+13	1,59E+13	1,83E+13	1,87E+13	1,89E+13
tampón 3 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,31E+13	1,48E+13	1,70E+13	1,74E+13	1,94E+13
tampón 4 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,46E+13	1,57E+13	1,82E+13	1,86E+13	1,95E+13
tampón 5 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,41E+13	1,47E+13	1,78E+13	1,78E+13	1,81E+13
tampón 6 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,74E+13	1,89E+13	2,22E+13	2,29E+13	2,19E+13
Punto temporal de la prueba/tampón a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
Tampón 1 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,45E+13	1,58E+13	2,03E+13	1,80E+13	1,72E+13
Tampón 2 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,45E+13	1,57E+13	2,19E+13	1,86E+13	1,72E+13
Tampón 3 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,31E+13	1,50E+13	1,76E+13	1,76E+13	1,73E+13
Tampón 4 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,46E+13	1,65E+13	1,94E+13	1,78E+13	1,43E+13
Tampón 5 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,41E+13	1,51E+13	1,82E+13	1,80E+13	1,64E+13
Tampón 6 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,74E+13	1,98E+13	2,44E+13	2,13E+13	1,54E+13

El porcentaje de agregados se midió como se muestra en la Tabla 12. Los valores de agregados más altos se sembraron para la Formulación 3 a los 0 meses y después del almacenamiento a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  y a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . Todos los demás tampones muestran valores fluctuantes.

5

TABLA 12: Agregados [%] con almacenamiento a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Punto temporal de la prueba/tampón a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	4 meses	/
tampón 1 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,55	1,50	1,90	1,84	
tampón 2 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,59	1,50	1,57	1,85	
tampón 3 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	2,34	1,75	2,00	1,98	
tampón 4 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,56	1,57	1,50	1,69	
tampón 5 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,72	1,81	1,49	1,81	
tampón 6 a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1,64	1,76	1,88	1,85	
Punto temporal de la prueba/tampón a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses
tampón 1 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,55	1,47	2,21	1,31	1,41
tampón 2 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,59	1,52	2,24	1,43	1,42
tampón 3 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	2,34	1,49	1,74	1,37	1,44
tampón 4 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,56	1,58	1,58	1,38	1,50
tampón 5 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,72	1,70	1,43	1,90	1,54
tampón 6 a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	1,64	1,69	2,78	2,41	1,87
Punto temporal de la prueba/tampón a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes	8 semanas	3 meses	6 meses

## ES 2 981 519 T3

Tampón 1 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,55	1,54	2,30	1,38	1,47
Tampón 2 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,59	1,53	1,70	1,46	1,51
Tampón 3 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	2,34	2,25	1,95	1,61	2,27
Tampón 4 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,56	1,52	1,63	1,49	1,46
Tampón 5 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,72	2,81	2,07	2,26	1,95
Tampón 6 a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1,64	1,58	1,93	1,47	1,59

Los resultados de los ensayos de SDS-PAGE se muestran en las Tablas 13-18, que muestran las mediciones a los 0, 1, 2, 3, 4 y 6 meses. Todas las muestras presentan estabilidad durante el tiempo de almacenamiento para todas las temperaturas, excepto el Tampón 1, que muestra una banda adicional a 163 kDa después de 4 meses de almacenamiento a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

TABLA 13: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 0 meses

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	15,85	15,33	16,11	16,58	16,62	16,43
VP2	22,55	22,92	22,08	23,58	23,4	24,51
VP3	61,6	61,75	61,82	59,84	59,98	59,06
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 14A: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 1 mes a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 3	Calle 4	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	15,8	16,7	16,5	16,6	16,6	17,3
VP2	27,1	27,1	26,3	26,7	26,2	26,7
VP3	57,2	56,2	57,3	56,6	57,2	56,0
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 14B: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 1 mes a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 9	Calle 10	Calle 11	Calle 12	Calle 13	Calle 14
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	16,8	16,7	16,3	17,1	16,6	17,0
VP2	26,1	26,2	26,2	26,2	25,4	26,3
VP3	57,2	57,1	57,5	56,8	58,1	56,7
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

## ES 2 981 519 T3

TABLA 14C: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 1 mes a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 15	Calle 16	Calle 17	Calle 18	Calle 19	Calle 20
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	16,5	16,5	16,3	16,4	16,4	17,7
VP2	26,3	26,8	26,1	26,9	26,5	27,2
VP3	57,2	56,7	57,6	56,7	57,1	55,1
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 15A: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 2 meses a  $-5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 3	Calle 4	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	15,3	16,2	16,3	16,3	16,6	16,9
VP2	26,6	26,5	26,4	26,4	26,5	26,4
VP3	58,1	57,3	57,3	57,4	56,9	56,7
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 15B: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 2 meses a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Carril 9	Carril 10	Carril 11	Carril 12	Carril 13	Carril 14
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	16,1	16,5	16,1	16,2	16,2	16,8
VP2	26,6	27,2	26,5	26,7	26,1	26,6
VP3	57,4	56,3	57,4	57,1	57,7	56,6
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 15C: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 2 meses a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 15	Calle 16	Calle 17	Calle 18	Calle 19	Calle 20
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	16,4	16,5	16,4	16,7	16,9	17,7
VP2	26,5	26,8	26,4	26,5	26,7	27,3
VP3	57,1	56,6	57,2	56,7	56,5	55,0
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 16A: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 3 meses a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 9	Calle 10

## ES 2 981 519 T3

	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	19,58	18,95	18,78	18,6	18,69	18,45
VP2	27,6	27,33	27,65	27,32	27,31	27,21
VP3	52,82	53,72	53,57	54,08	53,99	54,35
SUMA VP1+VP2+VP3	100	100	100	100	100	100

TABLA 16B: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 3 meses a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 12	Calle 13	Calle 14	Calle 15	Calle 16	Calle 17
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	18,6	18,49	18,91	19,14	19,08	19,07
VP2	27,06	26,6	27,69	27,04	27,81	27,57
VP3	54,34	54,92	53,4	53,82	53,12	53,36
SUMA VP1+VP2+VP3	100	100	100	100	100	100

TABLA 17: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 4 meses a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 9	Calle 10
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
	5,39					
VP1	15,75	17,96	18,03	18,42	17,99	17,66
VP2	27,73	27,83	28,56	28,27	29,06	28,2
VP3	51,12	54,21	53,42	53,31	52,94	54,14
SUMA VP1+VP2+VP3	94,6	100	100	100	100	100

TABLA 18A: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 6 meses a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 9	Calle 10
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	19,26	19,27	19,01	18,81	18,59	18,72
VP2	27,79	27,64	26,85	27,25	26,93	26,83
VP3	52,95	53,09	54,14	53,94	54,48	54,45
SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

TABLA 18B: Pureza y resumen con tiempo de almacenamiento = 6 meses a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Banda	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
	Calle 12	Calle 13	Calle 14	Calle 15	Calle 16	Calle 17
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	18,63	18,33	18,46	18,73	18,8	18,94
VP2	26,83	26,61	27,29	26,5	26,53	27,16
VP3	54,54	55,07	54,25	54,77	54,67	53,9

## ES 2 981 519 T3

SUMA VP1+VP2+VP3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
---------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Los resultados de la concentración de partículas subvisibles de material utilizando MFI se muestran en las Tablas 19-23. Este ensayo se realizó para observar la generación de partículas subvisibles durante el almacenamiento de material de AAV a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 4 meses y a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses.

5 TABLA 19: Comparación de partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  (número/ml)

Muestra	0 meses	4 meses $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	6 meses $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	6 meses $\leq -60^{\circ}\text{C}$
Muestra 1	515,89		478,03	606,05
Muestra 2	548,45	826,43	748,80	688,69
Muestra 3	550,95	1179,54	1570,22	1450,01
Muestra 4	578,50	593,53		668,66
Muestra 5	813,91	5086,30	4299,94	4675,59
Muestra 6	1014,25	437,65		

TABLA 20: Comparación de partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$  (número/ml)

Muestra	0 meses	4 meses $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	6 meses $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	6 meses $\leq -60^{\circ}\text{C}$
Muestra 1	100,17		117,63	157,77
Muestra 2	95,16	127,72	175,30	152,76
Muestra 3	107,69	363,13	250,43	185,32
Muestra 4	120,21	107,69		152,76
Muestra 5	127,72	833,94	558,47	548,45
Muestra 6	272,97	83,00		

TABLA 21: Concentración de partículas a 0 meses

Medición	$\geq 1\mu\text{m}$	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$	$\geq 70\mu\text{m}$
Muestra 1	29107,85	9408,77	1803,12	515,89	100,17	20,03	7,51
Muestra 2	34912,89	10653,43	1878,25	548,45	95,16	12,52	2,50
Muestra 3	35030,59	10250,23	1783,08	550,95	107,69	25,04	10,02
Muestra 4	30908,46	9303,59	1798,11	578,50	120,21	17,53	5,01
Muestra 5	48681,70	12366,39	2376,61	813,91	127,72	20,03	2,50
Muestra 6	39713,69	11710,25	2784,82	1014,25	272,97	67,62	35,06

TABLA 22: Concentración de Partículas después de 4 meses a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Medición	$\geq 1\mu\text{m}$	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$	$\geq 70\mu\text{m}$
Muestra 2 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	22999,78	11469,84	3551,14	826,43	127,72	22,54	2,50
Muestra 3 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	11504,90	5088,80	2033,52	1179,54	363,13	72,63	40,07
Muestra 4 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	28096,10	9498,93	1808,13	593,53	107,69	27,55	10,02
Muestra 5 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	19516,26	11943,16	7798,49	5086,30	833,94	75,13	22,54
Muestra 6 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	20710,38	6235,25	1466,38	437,65	83,00	22,64	7,55

TABLA 23: Concentración de partículas después de 6 meses a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Medición	$\geq 1\mu\text{m}$	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$	$\geq 70\mu\text{m}$
Muestra 1 $-20^{\circ}\text{C}$	24131,83	6790,05	1501,67	478,03	117,63	45,05	12,51
Muestra 1 $\leq -60^{\circ}\text{C}$	24144,26	6836,83	1510,11	606,05	157,77	35,06	22,54
Muestra 2 $-20^{\circ}\text{C}$	44356,72	16899,23	3591,21	748,80	175,30	42,57	12,52
Muestra 2 $\leq -60^{\circ}\text{C}$	32438,61	9433,82	2036,02	688,69	152,76	40,07	22,54
Muestra 3	51606,76	9498,93	3032,75	1570,22	250,43	75,13	55,10

## ES 2 981 519 T3

-20°C							
Muestra 3 ≤-60°C	43041,95	9493,92	2874,97	1450,01	185,32	35,06	17,53
Muestra 4 ≤-60°C	31191,45	8807,73	1930,84	668,66	152,76	32,56	10,02
Muestra 5 -20°C	82750,63	17525,31	7695,81	4299,94	558,47	50,09	25,04
Muestra 5 ≤-60°C	77216,06	19578,87	8812,74	4675,59	548,45	50,09	22,54

Los resultados de las mediciones de osmolalidad se muestran en la Tabla 24.

TABLA 24: Mediciones de osmolalidad

5

Nombre y formulación	mOsmol/kg
Tampón 1 <sup>7</sup> : tampón de Chatham + PS80 al 0,005%	990
Tampón 2 <sup>7</sup> : His 20 mM, NaCl 70 nM, Sacarosa al 5%, PS80 al 0,005%	309
Tampón 3 <sup>7</sup> : His 20 mM, NaCl 60 nM, manitol 110 mM, Trehalosa dihidratada 35 mM, PS80 al 0,005%	296
Tampón 4 <sup>7</sup> : His 10 mM, NaCl 100 mM, Glicina 50 mM, Trehalosa dihidratada al 5%, PS80 al 0,005%	386
Tampón 5 <sup>7</sup> : sol. amortiguadora de Na3Cit 15 mM, Glicina 15 mM, 20 g de Manitol, 10 g de Trehalosa dihidratada, PS80 al 0,005%	212
Tampón 6 <sup>7</sup> : TRIS 80 mM, Dextrano T10 y T40, Sacarosa al 6,9%, PS80 al 0,005%	417

En conclusión, no hubo diferencias significativas entre las seis formulaciones para ELISA de titulación de AAV8 después de 4 meses a 5±3°C y después de 6 meses a -20±2°C y ≤-60°C. Las Formulaciones 2-5 cumplen en cuanto a la apariencia, mientras que se observaron unas pocas partículas formadas para la Formulación 1 y un ligero color amarillo para la Formulación 6. Todas las formulaciones, excepto la Formulación 6 y el control, mostraron estabilidad durante el tiempo de almacenamiento para todas las temperaturas probadas mediante SDS PAGE (método densiométrico). Basándose en la apariencia, los datos del ensayo de partículas subvisibles (MFI) y los valores de osmolalidad, se seleccionaron las Formulaciones 2, 3 y 4 para su posterior desarrollo.

10

15

### Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra las pruebas adicionales y el desarrollo adicional de tres formulaciones.

20

Las formulaciones 2, 3 y 4 (Tampones 2, 3 y 4, Muestras 2, 3 y 4) se fabricaron como se describe esencialmente en el Ejemplo 1. En resumen, un solo lote se diluyó con tampón de PBS/NaCl/Sorbitol hasta 90 ml en general. La solución se enriqueció con PS80 super refinado Croda al 0,005% y se dividió en alícuotas en 3 partes. El tampón se cambió a uno de los tres tampones diferentes o tampón de control a través de casetes de diálisis Slide-A-Lyzer y esta etapa se repitió un total de 3 veces con 100 veces el volumen de la muestra. Las 3 soluciones diferentes se cargaron en viales de vidrio Schott Tipo I de 2 ml con una capa de SiO<sub>2</sub> y se almacenaron a las temperaturas descritas a continuación.

25

En este ejemplo, "Tampón 1" se refiere a Formulación/Tampón/Muestra 2 del Ejemplo 1, "Tampón 2" se refiere a Formulación/Tampón/Muestra 4 del Ejemplo 1, "Tampón 3" se refiere a Formulación/Tampón/Muestra 3 del Ejemplo 1, y "Tampón 4" se refiere a un control de tampón de PBS/NaCl/Sorbitol. Para mayor claridad, las Tablas 25-28 describen los Tampones 1-3 y el control de tampón de PBS/NaCl/Sorbitol de este ejemplo.

30

TABLA 25: Tampón 1 (Formulación 2)

35

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	20	3,103
NaCl	70	4,09
Sacarosa	5%	50,00
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,5

## ES 2 981 519 T3

TABLA 26: Tampón 2 (Formulación 4)

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	100	5,844
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 27: Tampón 3 (Formulación 3)

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	20	3,103
NaCl	60	3,506
Manitol	110	20,039
Dihidrato de trehalosa	35	13,24
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 28: Control de tampón de PBS/NaCl/Sorbitol

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
Cloruro de sodio	350	20,45
Cloruro de potasio	2,68	0,2
Dihidrato de hidrogenofosfato disódico	8,09	1,44
Fosfato monopotásico	1,47	0,2
D-Sorbitol	5%	50,00
Tween 80 súper refinado Croda (PS80)	0,005%	0,05
HCl al 25%		Ajuste de pH
NaOH 1 M		
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,4 ± 0,3

Se realizaron estudios de estabilidad a medio y largo plazo a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  (punto de calibración:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) y a  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta durante 5 meses (0, 1, 2, 3 y 5 meses) y a  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta durante 4 meses (0, 1, 2 y 4 meses). Las formulaciones se almacenaron en viales de vidrio Schott Tipo I de 2 ml con una capa de  $\text{SiO}_2$ . Cada vial se cargó con 0,3 ml de una formulación. Se realizaron las pruebas analíticas enumeradas en la Tabla 29 y los puntos temporales de la prueba para cada ensayo a las temperaturas de almacenamiento indicadas se muestran en las Tablas 30 y 31. Un "-" en la Tabla 30 o 31 significa que no se tomaron muestras.

TABLA 29: Ensayos analíticos

Atributo de calidad	Detección mediante método/principio analítico
General	Polisorbato 80
	Apariencia
	Valores de pH
Actividad	Biopotencia in vitro
	Biopotencia in vivo
	FIX-qPCR
Título de partículas totales (vacías + llenas)	ELISA partículas rAAV8 totales
Pureza de AAV	SDS-PAGE (tinción fluorescencia, Gel BisTris al 4-12% con Tinción Flamingo)
Degradación química	
Degradación física (cápsidas dañadas o fragmentos)	WAX [HPLC de Intercambio Aniónico Débil] SEC [HPLC de Exclusión por Tamaño]

TABLA 30: Esbozo del estudio con almacenamiento a  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  (punto de calibración:  $-80^{\circ}\text{C}$ )

Prueba	Volumen de la Muestra	Punto temporal de la prueba [meses]					Número total de muestras
		0	1	2	3	5	
SDS-PAGE (tinción fluorescencia, gel BisTris al 4-12% con Tinción Flamingo)	0,3 ml	x	x	x	x	x	36

## ES 2 981 519 T3

WAX [HPLC de Intercambio Aniónico Débil]	0,3 ml	x	x	x	x	x	36
SEC [HPLC de Exclusión por Tamaño]	0,3 ml	x	x	x	x	x	36
Biopotencia in vitro	0,3 ml	x	x	-	x	x	36
Biopotencia in vivo	0,3 ml	x	x	-		x	20
FIX-qPCR	0,3 ml	x	x	x	x	x	36
ELISA de partículas de rAAV8 totales	2 x 0,3 ml	x	x	x	x	x	72
Apariencia	1 ml	x	x	-	-	-	136
Valor de pH		x	x	-	-	-	12
Polisorbato 80	0,3 ml	-	-	-	-	x	3

TABLA 31: Esbozo del estudio con almacenamiento a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Prueba	Volumen de la muestra	Punto temporal de la prueba [meses]				Número total de muestras
		0	1	2	4	
SDS-PAGE (tinción fluorescencia, gel BisTris al 4-12% con Tinción Flamingo)	0,3 ml	x	x	x	x	16
WAX [HPLC de Intercambio Aniónico Débil]	0,3 ml	x	x	x	x	16
SEC [HPLC de Exclusión por Tamaño]	0,3 ml	x	x	x	x	16
Biopotencia in vitro	0,3 ml	x	x	x	x	16
Biopotencia in vivo	0,3 ml	x	x	-	x	12
FIX-qPCR	0,3 ml	x	x	x	x	16
ELISA de partículas de rAAV8 totales	2 x 0,3 ml	x	x	x	x	32
Apariencia	1 ml	x	x	x	x	56
Valor de pH		x	x	-	-	8

- 5 Los resultados del ELISA se muestran en la Tabla 32. El ELISA de titulación de AAV8 mostró una gran cantidad de pérdida de material para el Tampón 4 (control) durante el almacenamiento a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Compara  $5,61 \times 10^{12}$  [cp/ml] a los 0 meses a  $2,71 \times 10^{12}$  después de 4 meses. No se observaron pérdidas adicionales para el mismo material almacenado a  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . Las Tampones y 1 y 2 no mostraron ninguna pérdida de material. El Tampón 3 mostró una menor cantidad de material de partida que no disminuye durante el tiempo de almacenamiento.
- 10

TABLA 32: ELISA de titulación de AAV8

ELISA de titulación de AAV8 [cp/ml] a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	2 meses a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	4 meses a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	
TAMPÓN 1	9,39E+12;	7,46E+12;	9,33E+12;	8,56E+12	
TAMPÓN 2	1,01E+13	7,46E+12	9,17E+12	9,90E+12	
TAMPÓN 3	8,05E+12	6,69E+12	7,55E+12	8,03E+12	
TAMPÓN 4	5,61E+12	4,80E+12	3,82E+12	2,71E+12	
ELISA de titulación de AAV8 [cp/ml] a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	2 meses a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	3 meses a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	5 meses a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$
TAMPÓN 1	9,39E+12	7,59E+12	8,73E+12	8,67E+12	9,83E+12
ELISA de titulación de AAV8 [cp/ml] a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	2 meses a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	4 meses a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	
TAMPÓN 2	1,01E+13	7,81E+12	8,78E+12	9,17E+12	1,00E+13
TAMPÓN 3	8,05E+12	6,60E+12	7,55E+12	7,52E+12	8,17E+12
TAMPÓN 4	5,61E+12	5,35E+12	5,68E+12	5,17E+12	6,79E+12
ELISA de titulación de AAV8 [cp/ml] a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	0 meses	1 mes a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	2 meses a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	3 meses a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	5 meses a $\leq -60^{\circ}\text{C}$
TAMPÓN 1	9,39E+12	7,35E+12	9,13E+12	8,58E+12	9,62E+12
TAMPÓN 2	1,01E+13	7,35E+12	9,46E+12	8,82E+12	9,98E+12
TAMPÓN 3	8,05E+12	6,14E+12	7,77E+12	7,22E+12	8,59E+12
TAMPÓN 4	5,61E+12	4,91E+12	6,45E+12	5,26E+12	6,00E+12

- 15 Los resultados de la qPCR se muestran en la Tabla 33. Todos los datos generados con este ensayo confirman el ELISA y el ensayo de biopotencia *in vitro*. El tampón 4 muestra una gran cantidad de variación

## ES 2 981 519 T3

de prueba.

TABLA 33: FIX-qPCR [gv/ml]

FIX-qPCR [gv/ml] a +5±3°C	0 meses	1 mes a +5±3°C	2 meses a +5±3°C	4 meses a +5±3°C	
TAMPÓN 1	6,11E+12	4,34E+12	1,74E+12	4,65E+12	
TAMPÓN 2	4,34E+12	4,601+12	5,16E+12	4,14E+12	
TAMPÓN 3	3,66E+12	3,53E+12	3,86E+12	3,49E+12	
TAMPÓN 4	1,62E+12	1,63E+12	1,92E+12	4,98E+12	
FIX-qPCR [gv/ml] a -20±2°C	0 meses	1 mes a -20±2°C	2 meses a -20±2°C	3 meses a -20±2°C	5 meses a -20±2°C
TAMPÓN 1	6,11E+12	3,42E+12	4,42E+12	4,10E+12	4,07E+12
TAMPÓN 2	4,34E+12	3,57E+12	4,12E+12	4,01E+12	4,20E+12
TAMPÓN 3	3,66E+12	2,23E+12	3,44E+12	3,51E+12	3,79E+12
TAMPÓN 4	1,62E+12	4,33E+12	2,70E+12	3,29E+12	2,06E+12
FIX-qPCR [gv/ml] a ≤ -60°C	0 meses	1 mes a ≤ -60°C	2 meses a ≤ -60°C	3 meses a ≤ -60°C	5 meses a ≤ -60°C
TAMPÓN 1	6,11E+12	4,59E+12	4,67E+12	4,06E+12	4,35E+12
TAMPÓN 2	4,34E+12	3,78E+12	4,77E+12	2,78E+12	4,37E+12
TAMPÓN 3	3,66E+12	2,57E+12	3,68E+12	3,48E+12	3,37E+12
TAMPÓN 4	1,62E+12	1,47E+12	1,97E+12	1,60E+12	1,86E+12

5

Los resultados de las mediciones de % de agregados se muestran en la Tabla 34. Se observaron valores de agregados decrecientes después del almacenamiento durante 4 meses a 5±3°C. El Tampón 4 mostró un aumento de 1,55% a 3,39% después de 3 meses y sin agregados después de 4 meses. El Tampón 3 alcanzó un máximo de 6,64% después de 2 meses a ≤-60°C que cayó a 3,25% después de 3 meses y 3,94% después de 5 meses.

10

TABLA 34: Agregados [%]

Agregados [%] a +5±3°C	0 meses	1 mes a +5±3°C	2 meses a +5±3°C	4 meses a +5±3°C	
TAMPÓN 1	2,39	2,34	2,26	1,40	
TAMPÓN 2	2,46	2,13	2,55	1,36	
TAMPÓN 3	2,65	2,49	2,79	1,39	
TAMPÓN 4	1,55	3,39	3,39	0,00	
Agregados [%] a -20±2°C	0 meses	1 mes a -20±2°C	2 meses a -20±2°C	3 meses a -20±2°C	5 meses a -20±2°C
TAMPÓN 1	2,39	2,35	2,49	2,46	2,81
TAMPÓN 2	2,46	2,30	2,48	2,42	2,47
TAMPÓN 3	2,65	2,62	2,91	2,79	2,85
TAMPÓN 4	1,55	3,06	3,24	3,73	3,66
Agregados [%] a ≤ -60°C	0 meses	1 mes a ≤ -60°C	2 meses a ≤ -60°C	3 meses a ≤ -60°C	5 meses a ≤ -60°C
TAMPÓN 1	2,39	2,24	2,26	2,12	2,56
TAMPÓN 2	2,46	2,20	2,50	2,57	2,39
TAMPÓN 3	2,65	3,39	6,64	3,25	3,94
TAMPÓN 4	1,55	2,28	2,01		2,90

15

Los resultados del ensayo de intercambio aniónico débil (WAX) que mide las cápsides completas no mostraron diferencias significativas para todos los puntos temporales de prueba y temperaturas de almacenamiento (Tabla 35).

20

TABLA 35: Cápsides completas [%]

Cápsides completas [%] a +5±3°C	0 meses	1 mes a +5±3°C	2 meses a +5±3°C	4 meses a +5±3°C	
TAMPÓN 1	61	62	67	62	
TAMPÓN 2	62	64	65	61	
TAMPÓN 3	63	62	64	63	
TAMPÓN 4	62	62	66	58	
Cápsides completas [%] a -20±2°C	0 meses	1 mes a -20±2°C	2 meses a -20±2°C	3 meses a -20±2°C	5 meses a -20±2°C

ES 2 981 519 T3

Cápsides completas [%] a +5±3°C	0 meses	1 mes a +5±3°C	2 meses a +5±3°C	4 meses a +5±3°C	
TAMPÓN 1	61	64	68	63	62
TAMPÓN 2	62	63	66	61	61
TAMPÓN 3	63	62	66	63	61
TAMPÓN 4	62	62	64	63	60
Cápsides completas [%] a ≤ -60°C	0 meses	1 mes a ≤ -60°C	2 meses a ≤ -60°C	3 meses a ≤ -60°C	5 meses a ≤ -60°C
TAMPÓN 1	61	64	64	61	60
TAMPÓN 2	62	62	65	63	63
TAMPÓN 3	63	63	65	62	61
TAMPÓN 4	62	63	66	62	61

5 Los resultados del ensayo de biopotencia *in vitro* se muestran en la Tabla 36. Se muestran valores fluctuantes similares para el Tampón 1, Tampón 2 y Tampón 3 en el rango de variación de la prueba. El Tampón 4 muestra una gran disminución después del almacenamiento a 5±3°C durante 4 meses. Se detectaron resultados comparables para todos los demás tampones, puntos temporales de la prueba y temperaturas.

TABLA 36: Biopotencia *in vitro* [BPU]

Biopotencia <i>in vitro</i> [BPU] a +5±3°C	0 meses	1 mes a +5±3°C	2 meses a +5±3°C	4 meses a +5±3°C	
TAMPÓN 1	1,05	0,87	1,05	1,22	
TAMPÓN 2	0,85	1,02			
TAMPÓN 3	0,78	0,90	1,14	1,20	
TAMPÓN 4		0,65	0,57	0,13	
Biopotencia <i>in vitro</i> [BPU] a -20±2°C	0 meses	1 mes a -20±2°C	2 meses a -20±2°C	3 meses a -20±2°C	5 meses a -20±2°C
TAMPÓN 1	1,05	0,83	1,23	1,09	1,24
TAMPÓN 2	0,85	0,84	1,11	0,97	1,35
TAMPÓN 3	0,78	0,68	0,94	1,13	1,25
TAMPÓN 4	0,67	1,93	1,76	0,79	1,18
Biopotencia <i>in vitro</i> [BPU] a ≤ -60°C	0 meses	1 mes a ≤ -60°C	2 meses a ≤ -60°C	3 meses a ≤ -60°C	5 meses a ≤ -60°C
TAMPÓN 1	1,05	1,15	1,10	1,01	1,34
Biopotencia <i>in vitro</i> [BPU] a +5±3°C	0 meses	1 mes a +5±3	2 meses a +5±3°C	4 meses a +5±3°C	
TAMPÓN 2	0,85	1,09	0,80	0,96	1,21
TAMPÓN 3	0,78	0,83	0,96	0,94	1,12
TAMPÓN 4	0,67	0,80	0,98	0,68	1,08

10

15 Los resultados del ensayo de biopotencia *in vivo* se muestran en la Tabla 37. Los resultados para los Tampones 1-3 muestran resultados fluctuantes en el rango de variación de la prueba. El tampón 4 disminuye de 3,70 [UI/ml] a los 0 meses a 1,33 [UI/ml] después de 4 meses a 5±3°C y aumenta de 3,79 [UI/ml] a los 0 meses a 6,73 [UI/ml] después de 4 meses a ≤-60°C. Los resultados del Día 7 fueron similares a los resultados del Día 14. Los resultados después de 1 mes de almacenamiento a ≤-60°C se toman como un valor de referencia que representa el mes 0 para todas las temperaturas de almacenamiento.

TABLA 37: Biopotencia *in vivo* [UI/ml] Resultados del día 14

Biopotencia <i>in vivo</i> [UI/ml] a +5±3°C	0 meses día 14	1 mes a +5±3°C, día 14	2 meses a +5±3°C, día 14	3 meses a +5±3°C, día 14	4 meses a +5±3°C, día 14	
TAMPÓN 1	3,48±1,28	5,91±1,33	4,82±0,63		4,76±0,55	
TAMPÓN 2	4,99±0,74	5,49±0,64	5,27±0,84		5,36±1,80	
TAMPÓN 3	4,43±1,15	6,42±0,89	4,64±1,42		5,58±0,60	
TAMPÓN 4	3,79±0,70	3,43±0,61	2,77±0,44		1,33:0,26	
Biopotencia <i>in vivo</i> [UI/ml] a -20±2°C	0 meses día 14	1 mes a -20±2°C, día 14	2 meses a -20±2°C, día 14	3 meses a -20±2°C, día 14	4 meses a -20±2°C, día 14	5 meses a -20±2°C, día 14
TAMPÓN 1	3,48±1,28			5,09±2,25	4,97±1,30	5,28±0,55
TAMPÓN 2	4,99±0,74			5,85±0,74	4,88±1,44	5,04±0,70
TAMPÓN 3	4,43±1,15			4,34±1,62	5,16±0,79	5,03±1,00

## ES 2 981 519 T3

TAMPÓN 4	3,79±0,70			3,42±1,46	4,20±1,74	4,39±0,76
Biopotencia in vivo [UI/ml] a ≤ -60°C	0 meses día 14	1 mes a ≤ -60°C, día 14	2 meses a ≤ -60°C, día 14	3 meses a ≤ -60°C, día 14	4 meses a ≤ -60°C, día 14	5 meses a ≤ -60°C, día 14
TAMPÓN 1	3,48±1,28	3,48±1,28				5,99±1,58
TAMPÓN 2	4,99±0,74	4,99±0,74				5,68±1,02
TAMPÓN 3	4,43±1,15	4,43±1,15				4,63±1,33
TAMPÓN 4	3,79±0,70	3,79±0,70				6,73±0,90

TABLA 38: Biopotencia in vivo [UI/ml] Resultados del día 7

Biopotencia in vivo [UI/ml] a +5±3°C	0 meses día 7	1 mes a +5±3°C, día 7	2 meses a +5±3°C, día 7	3 meses a +5±3°C, día 7	4 meses a +5±3°C, día 7	
TAMPÓN 1	2,35±0,79	3,86±0,93	3,15±0,29		2,70±0,32	
TAMPÓN 2	3,41±0,55	3,31±0,68	3,81±0,74		3,46±0,23	
TAMPÓN 3	3,29±0,25	3,58±0,59	3,09±0,76		3,12±0,36	
TAMPÓN 4	2,30±0,48	2,00±0,40	1,68±0,30		0,80±0,04	
Biopotencia in vivo [UI/ml] a -20±2°C	0 meses día 7	1 mes a -20±2°C, día 7	2 meses a -20±2°C, día 7	meses a -20±2°C, día 7	4 meses a 20±2°C, día 7	5 meses a -20±2°C, día 7
TAMPÓN 1	2,35±0,79			3,20±1,40	2,91±0,81	3,29±0,56
TAMPÓN 3	3,41±0,55			3,60±0,55	3,01±0,80	3,01±0,64
TAMPÓN 2	3,29±0,25			3,04±1,11	3,12±0,56	3,18±0,69
TAMPÓN 4	2,30±0,48			1,84±0,80	0,80±0,04	2,46±0,45
Biopotencia in vivo [UI/ml] a ≤ -60°C	0 meses día 7	1 mes a ≤ -60°C, día 7	2 meses a ≤ -60°C, día 7	3 meses a ≤ -60°C, día 7	4 meses a ≤ -60°C, día 7	5 meses a ≤ -60°C, día 7
TAMPÓN 1	2,35±0,79	2,35±0,79				4,02±1,11
TAMPÓN 2	3,41±0,55	3,41±0,55				3,58±1,07
TAMPÓN 3	3,29±0,25	3,29±0,97				2,67±0,74
TAMPÓN 4	2,30±0,48	2,30±0,48				3,53±0,46

- 5 Los resultados del ensayo densitométrico de SDS PAGE se muestran en las Tablas 39-44. No se observaron bandas adicionales durante el almacenamiento a 5±3°C durante hasta 4 meses y durante el almacenamiento a -20±2°C y ≤-60°C durante hasta 5 meses.

TABLA 39: Pureza y resumen después de 0 meses de almacenamiento

10

Proteína vectora	HT6AR00G (Ref) 10 µg/ml	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
	Calle 3	Valor medio L5-L7	Valor medio L9-L11	Valor medio L13-L15	Valor medio L17-L19
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	11,4	17,5	17,5	17,2	15,6
VP2	10,9	19,9	20,9	20,4	18,8
VP3	77,7	62,6	61,6	62,4	65,6
SUMA VP1+VP2+VP3 (Pureza)	100	100	100	100	100

TABLA 40: Pureza y resumen después de 1 mes de almacenamiento

Proteína vectora	Referencia	+5±3°C 1 mes						-20±2°C 1 mes						-60±2°C 1 mes													
		Tampón 1		Tampón 2		Tampón 3		Tampón 4		Tampón 1		Tampón 2		Tampón 3		Tampón 4		Tampón 1		Tampón 2		Tampón 3		Tampón 4			
		Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda	Calle	% de Banda		
VP1	HT6AR00G 10 µg/ml	3	10,96	5	15,63	6	15,95	7	15,82	8	14,06	10	14,91	11	15,34	12	15,72	13	14,22	15	15,31	16	15,27	17	14,99	18	14,35
VP2			7,49		18,16		18,18		18,56		16,12		17,05		18,33		18,14		17,65		19,18		19,48		18,33		17,36
VP3			31,54		66,21		65,88		65,62		69,82		68,04		66,32		66,14		68,13		65,51		65,25		66,69		68,29
SUMA VP1+VP2+VP3 {Pureza}			100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100

TABLA 41: Pureza y resumen después de 2 meses de almacenamiento

Proteína vectora	Referencia	+5±3°C 2 meses				-20±2°C 2 meses				-60±2°C 2 meses			
		Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4	Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4	Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4
VP1	HI6AR00G	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 10	Calle 11	Calle 12	Calle 13	Calle 15	Calle 16	Calle 17	Calle 18
	10 µg/ml	3											
	% de Banda	12,14	12,92	12,1	8,7	12,29	14,09	11,8	10,82	12,28	12,61	12,25	% de Banda
VP2		6,33	19,24	17,78	14,62	18,84	18,26	16,97	15,28	18,77	19,45	17,87	16,08
VP3		7,46	67,84	70,12	76,68	68,87	67,65	71,24	73,9	68,95	67,95	69,88	72,96
SUMA		86,21	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
VP1+VP2+VP3 (Pureza)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

## ES 2 981 519 T3

TABLA 42: Pureza y resumen después de 3 meses de almacenamiento

Proteína vectora	Referencia	-20±2°C 3 meses				-60±2°C 3 meses			
	HT6A R00G 10µg/ml	Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4	Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4
	Calle 3	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 10	Calle 11	Calle 12	Calle 13
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	7,1	16,73	16,75	16,63	14,98	15,93	16	16,05	13,3
VP2	6,56	20,94	21,9	21,02	17,77	21,07	21,89	19,95	16,14
VP3	86,34	62,32	61,35	62,36	67,25	63	62,11	64,01	70,55
SUMA VP1+VP2+VP3 (Pureza)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

TABLA 43: Pureza y resumen después de 3 meses de almacenamiento

Proteína vectora	Referencia	+5±3°C 4 meses			
	HT6AR00G 10µg/ml	Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4
	Calle 3	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	12,13	16,16	17,45	16,44	11,35
VP2	14,66	24,2	22,36	21,25	10,1
VP3	73,2	59,65	60,19	62,3	78,55
SUMA VP1+VP2+VP3 (Pureza)	100	100	100	100	100

TABLA 44: Pureza y resumen después de 5 meses de almacenamiento

	Referencia	-20±2°C 5 meses				-60±2°C 5 meses			
		Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4	Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	Tampón 4
	HT6AR00G 10 µg/ml								
	Calle 3	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 10	Calle 11	Calle 12	Calle 13
	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda	% de Banda
VP1	11,51	17,45	17,52	17,2	14,68	16,65	16,91	16,83	15,24
VP2	16,44	22,43	23,27	22,5	19,7	22,46	22,69	22,38	20,38
VP3	72,06	60,12	59,2	60,3	65,62	60,89	60,4	60,79	64,37
SUMMA VP1+VP2+VP3 (Pureza)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

## ES 2 981 519 T3

Los resultados de la prueba de apariencia se muestran en las Tablas 45-48, en donde la clasificación de la inspección de partículas a simple vista fue la siguiente: Nivel A = sin partículas visibles; Nivel B = partículas pequeñas individuales, apenas visibles; Nivel C = partículas pequeñas individuales, fácilmente visibles; Nivel D muchas partículas pequeñas, fácilmente visibles; y Nivel E = partículas visibles mayores o iguales a 1 mm. La apariencia de todas las muestras después de 1 mes a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  (punto de calibración:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) exhibió soluciones claras e incoloras sin partículas visibles (indicada a continuación y en toda la memoria descriptiva como "cumple").

10 TABLA 45: Apariencia durante 48 horas a  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$

Apariencia a $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$	Sustancia de partida	1,5 horas	3 horas	4,5 horas	6 horas	24 horas	48 horas
Concentración de partículas de AAV8: $8,8\text{E}+12$ [cp/ml]							
TAMPÓN 1	A	A	A	A	A	A	A
TAMPÓN 2	A	A	A	A	A	A	A
TAMPÓN 3	A	A	A	A	A	A	A
TAMPÓN 4	A	A	A	A-B	A-B	A	A-B
Concentración de partículas de AAV8: $17,6\text{E}+12$ [cp/ml]							
TAMPÓN 1	A	A	A	A	A	A	A
TAMPÓN 2	A	A	A	A	A	A	A
TAMPÓN 3	A	A	A	A	A	A	A
TAMPÓN 4	A	A	B	A-B	A-B	A-B	A-B

TABLA 46: Apariencia durante 4 meses a  $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Apariencia a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	Sustancia de partida poco tiempo después de la filtración en condiciones estériles	Sustancia de partida después de 6 días a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	1 mes	2 meses	4 meses	4 meses
Concentración de partículas de AAV8: $8,8\text{E}+12$ [cp/ml]						
TAMPÓN 1	A	Cumple los criterios	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 2	A		A	A	A	Cumple
TAMPÓN 3	A		A	A	A	Cumple
TAMPÓN 4	A	Cumple los criterios clara, incolora, con partículas visibles	A-B	A-B (2 fibras)	A-B (2 fibras)	Cumple
Concentración de partículas de AAV8: $17,6\text{E}+12$ [cp/ml]						
TAMPÓN 1	A	Cumple los criterios	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 2	A		A	A	A	Cumple
TAMPÓN 3	A		A	A	A	
TAMPÓN 4	A	Clara, incolora, con partículas visibles	A-B	A-B (4 fibras)	A-B (4 fibras, > 5 partículas)	No cumple, Partículas de color blanco > 10

TABLA 47. Apariencia durante 6 meses a -20±2°C

Apariencia a -20±2°C	Sustancia de partida poco después de la filtración en condiciones estériles	Sustancia de partida después de la congelación a -20±2°C	Sustancia de partida después de la congelación a -20±2°C	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	6 meses	6 meses
<b>Concentración de partículas de AAV8: 8,8E+12 [cp/ml]</b>									
TAMPÓN 1	A	A	Cumple	A	A	A	Cumple	A	Cumple
TAMPÓN 2	A	A-B	Cumple	A	A	A	Cumple	A	Cumple
TAMPÓN 3	A	A	Cumple	A	A	A-B	Cumple	A-B	Cumple
TAMPÓN 4	A	B (1 partícula)	clara, incolora, con partículas visibles	A-B	A-B (3 fibras)	B (> 5 partículas)	No cumple, Partículas de color blanco > 5	C (> 6 fibras)	Solución clara, incolora con partículas visibles > 10
<b>Concentración de partículas de AAV8: 17,6E+12 [cp/ml]</b>									
TAMPÓN 1	A	A-B	Cumple	A	A	A-B	Cumple	A-B	Cumple
TAMPÓN 2	A	A-B	Cumple	A	A	A	Cumple	A	Cumple
TAMPÓN 3	A	A-B	Cumple	A	A	A-B	Cumple	A-B	Cumple
TAMPÓN 4	A	B	Clara, incolora, con partículas visibles	A-B	A-B (2 fibras)	C (3 fibras, >5 partículas)	No cumple, Partículas de color blanco >5	C (3 fibras, > 10 partículas)	Solución clara, incolora con partículas visibles > 10

TABLA 48: Apariencia durante 6 meses a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$

Apariencia a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	Sustancia de partida poco después de la filtración en condiciones estériles	Sustancia de partida después de la congelación a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses	6 meses
Concentración partículas de AAV8: $8,8\text{E}+12$ [cp/ml]							
TAMPÓN 1	A	A	A	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 2	A	A	A	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 3	A	A	A	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 4	A	A-B	A-B	A-B (3 fibras)	A-B (4 fibras)	A-B	Cumple
Concentración partículas de AAV8: $17,6\text{E}+12$ [cp/ml]							
TAMPÓN 1	A	A	A	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 2	A	A	A	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 3	A	A	A	A	A	A	Cumple
TAMPÓN 4	A	A-B	A-B	A-B (3 fibras)	A-B (4 fibras)	B-C ( $> 5$ fibras)	Solución clara, incolora con partículas visibles $> 10$

- 5 Los valores de pH para los tampones/formulaciones a los 0 meses y después de 1 mes de almacenamiento a las temperaturas indicadas se muestran en la Tabla 49.

Tabla 49: Valores de pH después de 1 mes

Valores de pH a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$	Valor de pH objetivo	0 meses	1 mes a $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$
TAMPÓN 1	7,5	7,45	7,46
TAMPÓN 2	7,0	6,95	6,94
TAMPÓN 3	7,0	7,00	6,98
TAMPÓN 4	7,4	7,34	7,31
Valores de pH a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$	Valor de pH objetivo	0 meses	1 mes a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$
TAMPÓN 1	7,5	7,45	7,44
TAMPÓN 2	7,0	6,95	6,96
TAMPÓN 3	7,0	7,00	6,99
TAMPÓN 4	7,4	7,34	7,33
Valores de pH a $\leq -60^{\circ}\text{C}$	Valor de pH objetivo	0 meses	1 mes a $\leq -60^{\circ}\text{C}$
TAMPÓN 1	7,5	7,45	7,43
TAMPÓN 2	7,0	6,95	6,95
TAMPÓN 3	7,0	7,00	6,98
TAMPÓN 4	7,4	7,34	7,33

10

Las mediciones de Polisorbato 80 (PS80) se realizaron después del almacenamiento durante 5 meses a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . Los resultados (mostrados en la Tabla 50) confirman que la cantidad de PS80 no se redujo después del almacenamiento durante 5 meses a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

- 15 TABLA 50: Polisorbato 80 (método HPLC)

Muestras	$\mu\text{g/ml}$	Recuperación [%]
Concentración objetivo	50	100%
Muestra 1 (Tampón 1 - Formulaci3n 2)	62,6	125%
Muestra 2 (Tamp3n 2 - Formulaci3n 4)	65,7	131%
Muestra 3 (Tamp3n 3 - Formulaci3n 3)	47,8	96%

- 20 Basándose en los datos de este estudio, no se observaron diferencias significativas en el perfil de estabilidad de AAV8 cuando se formuló en cualquiera de los tres tampones/formulaciones probados. Por lo tanto, los tres pueden considerarse adecuados para el almacenamiento de productos de terapia génica de AAV8.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra una investigación adicional de dos formulaciones para su adsorción a las superficies internas de diferentes viales y tubos.

- 5 Las Tampones 1 (Formulación 2) y 2 (Formulación 4) descritos en el Ejemplo 2 se probaron para determinar la absorción a las superficies internas de diferentes viales y tubos. El Tampón 1 ( $1717,37 \times 10^{11}$  cp/ml) y el Tampón 2 ( $1431,94 \times 10^{11}$  cp/ml) se diluyeron a una concentración objetivo de  $1,1 \times 10^{13}$  cp/ml y se filtraron en condiciones estériles con un filtro PALL EKV. Las muestras se cargaron en viales de vidrio de 2 ml y se congelaron, para referencia futura. Los materiales se llenaron en viales y tubos como se describe en la Tabla 51.

TABLA 51

Recipiente de la muestra	Volumen de carga
Vial de vidrio de SiO <sub>2</sub> de 2 ml artículo número 3000375	0,3 ml
Vial de virido de SiO <sub>2</sub> de 10 ml artículo número 3000727	5,6 ml
Tubos Nunc® Cryo (PP) de 1,8 ml	0,5 ml
Tubos de cierre seguro Eppendorf® (PP) de 0,5 ml	0,2 ml
Tubos de cierre seguro Eppendorf® (PP) de 1,5 ml	0,5 ml
Tubos Protein LoBind Eppendorf® (PP) de 0,5 ml	0,2 ml
Tubos Protein LoBind Eppendorf® (PP) de 1,5 ml	0,5 ml

- 15 Las muestras se almacenaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 8 horas y después se probaron mediante ELISA de titulación de PDTS/AAV8. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 52.

TABLA 52

Recipiente de almacenamiento	Tampón 1 [cp/ml]	Recuperación [%]	Tampón 2 [cp/ml]	Recuperación [%]
Vial de SiO <sub>2</sub> de 2 ml, sustancia de partida	1,61E+13	100	1,04E+13	100
Después de 8 horas a $+25 \pm 2^\circ\text{C}$				
Vial de SiO <sub>2</sub> de 2 ml	1,53E+13	95	1,05E+13	101
Vial de SiO <sub>2</sub> de 10 ml	1,61E+13	100	1,03E+13	99
Nunc de 1,8 ml	1,56E+13	97	1,03E+13	99
Tubo de cierre seguro de 0,5 ml	1,60E+13	99	1,01E+13	97
Tubo de cierre seguro de 1,5 ml	1,69E+13	105	1,06E+13	102
Tubo LowBind de 0,5 ml	1,57E+13	97	9,85E+12	95
Tubo LowBind de 1,5 ml	1,62E+13	100	1,05E+13	101

- 20 Estos resultados demuestran que más de 90% del material de terapia génica de partida es recuperable de los viales de 2 ml de SiO<sub>2</sub>. No se observó adsorción y no se observaron diferencias significativas entre los dos tampones de prueba.

25 Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la estabilidad de varios subtipos de AAV en la Formulación 4.

- 30 Se produjeron los subtipos de AAV AAV 2, AAV 5, AAV 8 y AAV 9 (University of Massachusetts at Worcester Medical School Vector Core Facility) y se almacenaron en la Formulación 4 (como se describe en los Ejemplos 1-3), y después se probó su apariencia para confirmar que no se generan partículas visibles y por ITR-qPCR para cuantificar el genoma del vector para la dosificación en un ensayo de biopotencia *in vitro*. Cada uno de estos subtipos de AAV comprendía un inserto eGFP que codificaba la Proteína de Fluorescencia Verde (CB6-PI-eGFP). Las pruebas se realizaron en el punto de tiempo 0 y nuevamente 6
- 35 semanas después del almacenamiento a  $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

- 40 Se descongelaron muestras de dos mililitros proporcionadas en un tampón basado en PBS (1x PBS + Pluoronic F + 68 al 0,001%) con una concentración de  $> 5\text{E} + 12$  gv/ml de partículas de AAV a temperatura ambiente y se diluyeron en 4 ml (aproximadamente  $> 2,5\text{E} + 12$  gv/ml) con la Formulación 4. El Polisorbato 80 a aproximadamente 0,0025% de la Formulación 4 evitó la pérdida excesiva de material mediante la adsorción (p. ej., sobre las superficies internas del equipo). El tampón total de cada una de las muestras se cambió a la Formulación 4 utilizando los casetes de diálisis Slide-A-Lyzer® 10K, y esta etapa se realizó tres veces con un volumen de 100 veces, con diálisis durante un mínimo de 4 horas para cada etapa. Después de que el tampón se cambiara a la Formulación 4, se tomaron las muestras para el punto de tiempo de prueba inicial
- 45 de 0 semanas y después se almacenaron a  $+5 \pm 3^\circ\text{C}$  durante 6 semanas.

No se observaron partículas visibles para los diferentes subtipos de AAV almacenados en la Formulación 4, incluso después del almacenamiento durante 6 semanas (Tabla 53). Por lo tanto, es posible que los excipientes observados a tiempo 0 se resolvieran a las 6 semanas.

5

TABLA 53: Apariencia durante el almacenamiento en la Formulación 4 a +5±3°C

Subtipo	Puntos temporales de la prueba	
	0 semanas	6 semanas
AAV2	Solución incolora sin partículas, turbia	
AAV5	Solución incolora sin partículas, muy ligeramente turbia	Solución incolora clara sin partículas
AAV8	Solución incolora sin partículas, ligeramente turbia	Solución incolora clara sin partículas
AAV9	Solución incolora clara sin partículas	

Si bien la recuperación de AAV2 fue baja, lo que podría deberse a la variabilidad del ensayo ITR-qPCR (el ensayo ITR-qPCR tiene variaciones de prueba de ±0,5 log), los otros subtipos de AAV son estables durante las 6 semanas probadas. El uso de la Formulación 4 dio como resultado una sorprendente estabilidad del subtipo AAV8.

10

TABLA 54: ITR-qPCR [gv/ml] durante el almacenamiento en la Formulación 4 a +5±3°C

15

Subtipo	ITR-qPCR [gv/ml], 0 semanas	ITP-qPCR [gv/ml], 6 semanas	Recovery [%] Después de 6 semanas
AAV2	6,45E+10	2,65E+10	41
AAV5	1,64E+12	1,44E+12	88
AAV8	1,85E+10	2,11E+10	114
AAV9	6,38E+11	5,24E+11	82

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la viabilidad de liofilizar formulaciones de AAV, en particular la liofilización de AAV en la Formulación 4.

20

La Formulación 4 de AAV se liofilizó y se almacenó durante hasta 10 meses a +5±3°C. En resumen, el material de terapia génica que contenía AAV8 se produjo y liofilizó antes de almacenar los viales que contenían el material liofilizado a +5±3°C (controlado con el Sistema Eurotherm ligado al ZIZ). En cada punto temporal de la prueba (1, 2, 3, 6 y 10) se reconstituyó un vial con 5,5 ml de agua purificada y el líquido se dividió en alícuotas de acuerdo con la Tabla 55. La liofilización se realizó dos veces con el tampón "Formulación 4" solamente y después en esos experimentos, la liofilización se realizó con material de terapia génica activa en la Formulación 4. Los viales con material de terapia génica activa se colocaron en la parte delantera, central o trasera del estante. Los huecos se cerraron con los mismos viales de vidrio de SiO2 cargados con la Formulación 4 sin el AAV.

25

30

TABLA 55: Esbozo del estudio con almacenamiento a +5±3°C

Prueba	Volumen de muestra	Punto temporal de la prueba [meses]					Número total de muestras	Criterios de aceptación
		1	2	3	6	10		
SDS-PAGE (tinción fluorescencia, gel BisTris al 4-12 % con Tinción Flamingo)	0,2 ml	x	x	x	x	x	5	Resultado del informe
WAX [HPLC de Intercambio Aniónico]	0,2 ml	x	x	x	x	x	5	
SEC [HPLC de Exclusión por Tamaño]	0,2 ml	x	x	x	x	x	5	
Biopotencia in vitro	0,5 ml	x	x	x	x	x	5	
Apariencia	2 ml	x	x	x	x	x	5	
Valor de pH		x	x	x	x	x		
Biopotencia in vivo	0,5 ml	x	x		x	x	5	
FIX-qPCR	0,2 ml	x	x	x	x	x	5	
ELISA para partículas de rAAV8 totales	2 x 0,2 ml	x	x	x	x	x	10	

## ES 2 981 519 T3

Se tomaron mediciones de diferentes parámetros antes y después de la liofilización. Para cada medición, se informó de un promedio de tres mediciones (muestra delantera, central y trasera) en la Tabla 56. No se encontraron diferencias significativas para los parámetros probados, excepto para la humedad residual. La humedad residual fue de 0,7% para la muestra delantera, donde el secado ocurre más rápido que en la parte trasera donde se detectó 3,6%. El vial en el centro tenía 3,7% de humedad residual.

TABLA 56A: Diferentes parámetros para el material de terapia génica después de la liofilización

Estabilidad de producto de terapia génica liofilizado	ELISA de titulación de AAV8 [cp/ml]	FIX-qPCR [bv/ml]	Biopotencia in vitro [BPU]	Biopotencia in vivo, 14 días [U/ml]	Apariencia	pH	Humedad residual	Agregados [%]	WAX, cápsulas completas [%]
Sustancia de partida antes de Lio	1,30E+13	4,99E+12	1,27	2,64	Solución incolora clara sin partículas			3,1	55
DELANTERA	1,21E+13	2,73E+12	1,24	2,91	Solución incolora clara sin partículas	7,02	0,7	4,2	50
CENTRAL	1,29E+13	4,02E+12	1,31	2,24	Solución incolora clara con 1 partícula visible (fiber with 2-3 mm)	7,02	3,7	3,8	57
TRASERA	1,16E+13	3,99E+12	1,45	2,34	Solución incolora clara sin partículas	7,02	3,6	4,2	56

## ES 2 981 519 T3

TABLA 56B: Diferentes parámetros para sustancia de terapia génica después de la liofilización, recuperación [%]

Recuperación [%]	ELISA de titulación de AAV8	FIX-qPCR	Biopotencia in vitro	Biopotencia in vivo, 14 días
Sustancia de partida antes de la Lio	100	100	100	100
DELANTERA	93	55	98	110
CENTRAL	99	81	103	85
TRASERA	89	80	114	89

Tabla A.57 Diferentes parámetros para material de terapia génica después del almacenamiento en forma de forjas liofilizadas hasta durante 10 meses a +5,±3°C

Formulación 4	Apariencia	Valor de pH	ELISA de titulación de AAV6 [cp/ml]	Recupero ración [%]	FIX-qPCR [vg/ml]	Recupero ración [%]	Biopotencia in vitro [RFU]	Recupero ración [%]	Agregado [%]	WAX, cápsulas completas [%]	BP in vivo, 14 días recuperación [%]	BP in vivo, 14 días recuperación [%]
Lugar en el estante durante la liofilización	Cumple		1,30E+13	100	4,99E+12	100	127	100	3,1	55	2,84	100
Después de lio.	Frontal: Solución incolora clara sin partículas. Central: solución incolora clara con 1 partícula visible (fibra con 2-3 mm). Trasera: Solución incolora clara sin partículas.	7,02	1,22E+13	94	3,59E+12	72	1,33	105	4,1	54	2,50	95
Frontal izquierda	Solución incolora clara sin partículas	7,03	1,16E+13	89	1,64E+12	33	0,89	70	3,9	55	1,76	67
Frontal	Derecha: Solución incolora clara con muchas partículas visibles	7,05	1,14E+13	88	3,71E+12	74	0,95	75	4,1	50	2,14	81
Central	Solución incolora clara sin partículas	7,03	1,15E+13	89	3,07E+12	62	0,89	70	4,0	59	2,02	77
Frontal derecha	Solución incolora clara sin partículas	7,09	1,20E+13	92	3,97E+12	80	0,81	64	4,6	55	1,72	65
Trasera derecha	Solución incolora clara sin partículas	7,07	1,07E+13	83	4,23E+12	85	0,89	70	3,9	52		...

En conclusión, se obtuvo una recuperación de 85% en el punto temporal de 10 meses. La biopotencia *in vitro* (recuperación de 70% después de 10 meses), así como la biopotencia *in vivo* (recuperación de 65% después de 6 meses) no mostraron pérdidas directamente después de la liofilización, pero después de 1 mes de almacenamiento hubo una ligera disminución. Sin embargo, no se observó una disminución adicional de la actividad en el punto de tiempo de 10 meses. Los porcentajes de cápsidas completas, así como los resultados para los agregados, fueron estables.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra pruebas adicionales y un mayor desarrollo de las formulaciones liofilizadas.

Se examinaron cuatro formulaciones diferentes con diferentes concentraciones de NaCl con dos velocidades diferentes de liofilización (Tablas 58-61). En resumen, los programas de liofilización difirieron en su rampa de temperatura de -55°C a + 2°C durante el secado primario. En un ciclo, la temperatura aumentó durante un período de 1,5 horas (Programa 1), mientras que en el otro ciclo la temperatura aumentó durante 12 horas (Programa 2).

TABLA 58: Formulación 4

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	100	5,844
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 59: Formulación 7

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	80	4,675
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 60: Formulación 8

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	70	4,091
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 61: Formulación 9

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	60	3,506

## ES 2 981 519 T3

Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

5 El material de terapia génica se descongeló y se agrupó, y se cargaron 29,2 ml del material combinado en casetes de diálisis Slide-A-Lyzer® 10K. El tampón se cambió a la Formulación 4, 7, 8 o 9 como se divulgó anteriormente. Todas las muestras se sometieron a diálisis tres veces en un volumen de 100 veces durante un mínimo de tres horas. Después de la diálisis, se cargaron 5,5 ml de cada uno de los materiales en viales de SiO<sub>2</sub> de 10 ml. Antes de la liofilización, se colocaron tapones de liofilización en los viales de vidrio sin cerrarlos. Los productos liofilizados se almacenaron a +5±3°C durante hasta 12 meses.

10 Cuanto más bajas eran las concentraciones de NaCl, más baja era la humedad residual (Tabla 62).

TABLA 62: Comparación de humedad residual [%] directamente después de la liofilización

Humedad residual Concentración de NaCl/ programa	Frontal		Central			Trasera	
	Tampón 30/2 frontal	Sustancia activa 30/2 frontal	Tampón 30/2 central	Sustancia activa 30/2 central	Tampón 30/2a central	Tampón 30/2 trasera	Sustancia activa 30/2 trasera
100 mM	2,4	3,2	2,1	2,8	3,7	2,7	2,5
80 mM	2,1	1,7	1,6	1,7	2,7	1,8	2,1
70 mM	1,6	1,8	1,5	1,8	2,2	1,8	1,9
60 mM	1,2	1,2	1,3	0,9	1,4	1,2	1,3

15 Los productos liofilizados se almacenaron a +5±3°C durante hasta doce meses y se probaron para determinar su actividad, el título total de partículas (vacías + completas), la pureza, la degradación y el pH (Tablas 63 y 64). En cada punto temporal de la prueba (0, 1, 3, 6 y 12 meses) se reconstituyó un vial con 5,5 de agua purificada y el líquido se dividió en partes alícuotas según la Tabla 63. Las muestras se congelaron a ≤-60°C (punto de calibración: -80°C) y se probaron. Después de la liofilización, no se detectaron diferencias significativas de valores y se encontró que todos los datos estaban dentro de la variación del ensayo.

20

TABLA 63: Esbozo del estudio para muestras almacenadas a +5±3°C

Prueba	Volumen de muestra	Punto temporal de la prueba [meses]					Número total de muestras	Criterios de aceptación
		0	1	3	6	12		
SDS-PAGE (tinción fluorescencia, gel BisTris al 4-12% con Tinción Flamingo)	0,2 ml	x	x	x	x	x	40	Resultado del informe
WAX [HPLC de Intercambio Aniónico Débil]	0,2 ml	x	x	x	x	x	40	
SEC [HPLC de Exclusión por Tamaño]	0,2 ml	x	x	x	x	x	40	
Apariencia	2 ml	x	x	x	x	x	40	
Valor de pH		x	x	x	x	x		
Biopotencia in vitro	0,5 ml	x	x	x	x	x	40	
Biopotencia in vivo	0,5 ml	x	x	-	x	x	Mínimo de 8 (36)	
FIX-qPCR	0,2 ml	x	x	x	x	x	40	
ELISA para partículas de rAAV8 totales	2 x 0,2 ml	x	x	x	x	x	80	
Humedad residual	1 vial	x	x	x	x	x	12	
Tiempo de reconstitución	1 vial	x	x	x	x	x	40	

TABLA 64: Programa 1, Resultados

Concentración parámetro	NaCl/ Material de partida (100 mM)	ELISA partículas AAV8 [pv/ml]	FIX-qPCR [gv/ml]	Biopot., in vitro dosificación FIX- qPCR [BPU]	Biopot., in vitro dosificación Titulación ELISA-AAV8 [BPU]	% cápsidas completas [%]	Agreg. [%]	pH	Apariencia
		1,39E+13				61	2,3	7,00	Solución incolora clara sin partículas
100 mM		1,17E+13	4,80E+12	0,75	0,68	63	3,5	7,00	Solución incolora clara sin partículas
80 mM		1,08E+13	5,06E+12	0,70	0,75	57	4,1	7,02	Solución incolora clara sin partículas
70 mM		1,20E+13	4,17E+12	0,77	0,74	54	4,1	7,00	Solución incolora clara sin partículas
60 mM		1,3211+13	4,73E+12	0,67	0,68	55	3,9	7,04	Solución incolora clara sin partículas

En resumen, el Programa 1 era el programa más agresivo, pero proporcionaba las tortas liofilizadas más compactas y homogéneas. Cuanto menor era la concentración de NaCl, menores eran los valores para la humedad residual. La "solución clara e incolora sin partículas visibles" para el material de partida, así como para cada concentración de NaCl después de la diálisis, liofilización y reconstitución cumplió en cuando a la apariencia. Las mediciones de pH, ELISA de partículas AAV8, FIX-qPCR y los resultados del ensayo de biopotencia *in vitro* mostraron valores similares para cada concentración de NaCl. El ensayo WAX (porcentaje de cápsides completas) mostró variaciones en la prueba entre 54% y 63% (Tabla 69). Los agregados mostraron un aumento de 2,3% para el material de partida no tratado a 3,5% y 4,1% para el material de terapia génica sometido a diálisis y liofilizado. Las tortas liofilizadas para cada concentración de NaCl son de color blanco, compactas y homogéneas.

Ejemplo 7

Este ejemplo muestra formulaciones adicionales.

Las Formulaciones 10 y 11 se fabricaron como se describe esencialmente en el Ejemplo 1.

TABLA 65: Formulación 10

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	30	1,753
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 66: Formulación 11

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	0	0
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

Ejemplo 8

Este ejemplo muestra formulaciones adicionales.

Las formulaciones 12-15 se fabrican como se describe esencialmente en el Ejemplo 1.

TABLA 67: Formulación 12

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	50	2,922
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 68: Formulación 13

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	40	2,338
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50

Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

TABLA 69: Formulación 14

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración g/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	20	1,169
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

5 TABLA 70: Formulación 15

Excipiente	Concentración [mM]	Concentración/kg de tampón
L-histidina	10	1,552
NaCl	10	0,584
Glicina	50	3,754
Dihidrato de trehalosa	5%	50
Tween 80 súper refinado Croda	0,005%	0,05
Agua purificada		añadir hasta 1 kg
Valor de pH		7,0 ± 0,1

10 Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. Se pretende que el uso de cualquiera y todos los ejemplos, o la expresión ilustrativa (p. ej., "tal como") proporcionada en el presente documento, simplemente ilumine mejor la divulgación.

15 No se debe interpretar en la memoria descriptiva que ninguna expresión indique que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la divulgación.

20 Las realizaciones preferidas de esta divulgación se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los autores de la invención para llevar a cabo la divulgación. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden ser evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los autores de la invención esperan que os expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los autores de la invención pretenden que la divulgación se ponga en práctica de manera diferente a la descrita específicamente en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende virus adeno-asociado (AAV) y una formulación que comprende:
- 5 (i) L-histidina de 5 mM a 25 mM;
- (ii) cloruro de sodio de 50 mM a 150 mM;
- 10 (iii) polisorbato 20 o polisorbato 80 de 0,001% (p/v) a 0,01% (p/v) o una combinación de los mismos; y
- (iv) azúcar, alcohol de azúcar de 1% a 10% (p/v), o una combinación de los mismos.
2. Una composición farmacéutica que comprende virus adeno-asociado (AAV) y una formulación que comprende:
- 15 (i) L-histidina de 5 mM a 25 mM;
- (ii) cloruro de sodio menos de 100 mM;
- 20 (iii) polisorbato 20 o polisorbato 80 de 0,001% (p/v) a 0,01% (p/v) o una combinación de los mismos; y
- (iv) azúcar, alcohol de azúcar de 1% a 10% (p/v), o una combinación de los mismos.
- 25 3. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición farmacéutica tiene un pH de 6,9 a 7,7, opcionalmente, 7,0 o 7,5.
4. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende L-histidina de 10 mM a 20 mM.
- 30 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, o 4, que comprende cloruro de sodio de 50 mM a 120 mM.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que comprende cloruro de sodio de 0 mM a 100 mM, de 0 mM a 60 mM, de 30 mM a 100 mM, de 30 mM a 80 mM, de 30 mM a 60 mM, de 60 mM a 100 mM, o de 60 mM a 80 mM.
- 35 7. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polisorbato es polisorbato 80.
- 40 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende polisorbato 80 de 0,0025% a 0,0075% (p/v).
9. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el azúcar es sacarosa, trehalosa, o una combinación de los mismos.
- 45 10. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el azúcar es sacarosa, trehalosa, o una combinación de las mismas de 1% (p/v) a 5% (p/v).
- 50 11. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el azúcar es trehalosa, opcionalmente dihidrato de trehalosa.
12. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente glicina, opcionalmente a una concentración de 35 mM a 65 mM.
- 55 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la formulación comprende:
- (i) L-histidina 10 mM,
- 60 (ii) cloruro de sodio 100 mM,
- (iii) polisorbato 80 al 0,005% (p/v),
- (iv) trehalosa al 5% (p/v), y
- 65 (v) glicina 50 mM.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la formulación comprende:
- 5 (i) L-histidina 10 mM,
  - (ii) cloruro de sodio menos de 100 mM,
  - (iii) polisorbato 80 al 0,005% (p/v),
  - 10 (iv) trehalosa al 5% (p/v), y
  - (v) glicina 50 mM.
- 15 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 o 14, en donde la trehalosa es dihidrato de trehalosa.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, que comprende cloruro de sodio 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, o 0 mM.
- 20 17. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, o AAV10.
18. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es líquida o liofilizada.
- 25 19. La composición farmacéutica como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición está presente en un recipiente de dosificación unitaria, opcionalmente en donde el recipiente de dosificación unitaria es un vial, opcionalmente en donde el vial es un vial de vidrio sellado.
- 30 20. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende virus adeno-asociado (AAV), que comprende combinar L-histidina, cloruro de sodio, el polisorbato, y el azúcar, alcohol de azúcar, o combinaciones de los mismos de la composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-19, obteniéndose de ese modo una composición farmacéutica que comprende AAV.
- 35 21. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende virus adeno-asociado (AAV), que comprende combinar L-histidina de 5 mM a 25 mM, cloruro de sodio de 0 mM a 150 mM, polisorbato 80 de 0,001% (p/v) to 0,01% (p/v), sacarosa, trehalosa, o una combinación de las mismas de 1% (p/v) a 10% (p/v) y AAV, obteniéndose de ese modo una composición farmacéutica que comprende AAV.
- 40 22. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno o enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica en una cantidad eficaz para tratar el trastorno o enfermedad.
- 45 23. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 22, en donde el trastorno o enfermedad son tratables mediante terapia génica.
24. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 22 o 23, en donde el trastorno o enfermedad son un trastorno de sangrado.
- 50 25. El método de la reivindicación 21, en donde la preparación de la composición farmacéutica comprende combinar cloruro de sodio de 50 mM a 150 mM, cloruro de sodio de 30 mM a menos de 100 mM, cloruro de sodio de 0 mM a menos de 100 mM, cloruro de sodio 30 mM, cloruro de sodio 60 mM, o cloruro de sodio 0 mM.