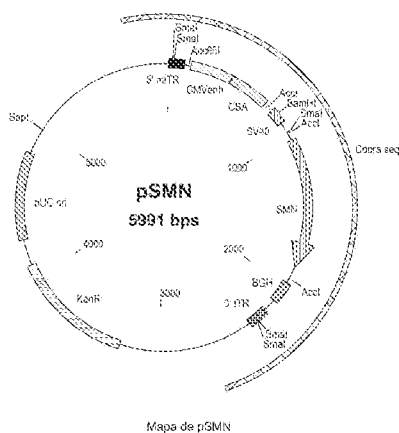




Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MEIOS E MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE VETORES VIRAIS E USOS DOS MESMOS"**.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[001] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida em formato ASCII através de EFS-Web e está incorporada aqui por referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 31 de outubro de 2018, é denominada AVEX-003001 WO_ST25.txt e tem 14.639 bytes de tamanho.

PEDIDOS RELACIONADOS

[002] Este pedido reivindica prioridade para o pedido de patente provisório U.S. número 62/583.035, depositado em 8 de novembro de 2017, cujos conteúdos estão aqui incorporados por referência na sua totalidade.

CAMPO DA DESCRIÇÃO

[003] A descrição se refere a métodos de preparação e purificação de partículas virais e composições e usos que compreendem as mesmas.

ANTECEDENTES

[004] O vírus adenoassociado (AAV) é um membro da família parvoviridae. O genoma de AAV é composto por uma molécula de DNA linear de fita simples que contém aproximadamente 4,7 kilobases (kb) e consiste em duas fases de leitura aberta principais que codificam as proteínas Rep não estrutural (replicação) e Cap estrutural (capsídeo). Flanqueando as regiões codificadoras de AAV estão duas sequências de repetição terminal invertidas cis atuantes (ITR), com aproximadamente 145 nucleotídeos de extensão, com sequências palindrômicas interrompidas que podem se dobrar em estruturas em grampo que funcionam como iniciadores durante o início da replicação do DNA. Em adição ao seu papel na replicação do DNA, as sequências

de ITR mostraram ser necessárias para a integração viral, resgate a partir do genoma do hospedeiro e encapsidação do ácido nucleico viral em vírions maduros (Muzyczka, (1992) Curr. Topo. Micro Immunol. 158:97-129).

[005] Existem vários sorotipos de AAV e oferecem tropismo por tecido variado. Os sorotipos conhecidos incluem, por exemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 e AAV11. AAV9 está descrito na Pat. U.S. No. 7.198.951 e em Gao et al, J. Virol, 78: 6381-6388 (2004), que estão aqui incorporadas por referência na sua totalidade. Os avanços na administração de AAV6 e AAV8 tornaram possível a transdução por esses sorotipos do músculo esquelético e cardíaco após injeções intravenosa sistêmica ou intraperitoneal simples. Veja Pacak et al., Circ. Res., 99 (4): 3-9 (2006) e Wang et al. Nature Biotech. 23(3): 321-8 (2005). O uso de AAV para atingir tipos celulares no sistema nervoso central, entretanto, exigiu injeção intraparenquimatosa cirúrgica. Veja Kaplitt et al, " Safety and tolerability of gene therapy with an adenoassociated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial." *Lancet*, 369:2097-2105; Marks et al., "Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomized, controlled trial." *Lancet Neurol* 9:1164-1172; and Worgall et al., "Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adenoassociated virus expressing CLN2 cDNA." *Hum Gene Ther*, 19(5):463-74.

[006] A sequência de nucleotídeos do genoma do sorotipo 2 de AAV (AAV2) é apresentada em Srivastava et al., J Virol, 45: 555-564 (1983), como corrigida por Ruffing et al, J Gen Virol, 75: 3385-3392 (1994). As sequências que atuam em cis dirigem a replicação do DNA viral (rep), a encapsidação / empacotamento e a integração do cromossoma da célula hospedeira estão contidas dentro das ITRs. Três

promotores de AAV (denominados p5, p19 e p40 quanto as suas localizações relativas no mapa) dirigem a expressão de duas fases de leitura abertas internas de AAV que codificam os genes rep e cap. Os dois promotores de rep (p5 e p19), acoplados com a junção diferencial do íntron único de AAV (nos nucleotídeos 2107 e 2227), resultam na produção de quatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 e rep 40) a partir do gene rep. As proteínas Rep possuem múltiplas propriedades enzimáticas que são responsáveis por replicar o genoma viral. O gene cap é expresso a partir do promotor p40 e codifica as três proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3. Junção alternativa e sítios de iniciação de tradução sem consenso são responsáveis pela produção das três proteínas do capsídeo relacionadas. Um único sítio de poliadenilação de consenso está localizado na posição 95 do mapa do genoma de AAV. O ciclo de vida e a genética de AAV são revistos em Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[007] Os vetores derivados de AAV são particularmente atraentes para o fornecimento de material genético por que (i) são capazes de infectar (transduzir) uma grande variedade de tipos de células que não se dividem e que se dividem, incluindo fibras musculares e neurônios; (ii) são desprovidos dos genes estruturais do vírus, eliminando desse modo as respostas naturais das células hospedeiras à infecção por vírus, por exemplo, respostas mediadas por interferon; (iii) vírus do tipo selvagem nunca foram associados a qualquer patologia em humanos; (iv) em contraste com os AAVs de tipo selvagem, que são capazes de se integrarem no genoma da célula hospedeira, os vetores de AAV com deficiência de replicação geralmente persistem como epissomas, limitando assim o risco de mutagênese por inserção ou ativação de oncogenes; e (v) em contraste com outros sistemas de vetores, os vetores de AAV não desencadeiam uma resposta imune significativa (ver ii), garantindo assim a expressão em longo prazo dos transgenes

terapêuticos (desde que seus produtos gênicos não sejam rejeitados).

[008] Vetores adenoassociados (scAAV) autocomplementares são vetores virais manipulados a partir dos vírus adenoassociados de ocorrência natural (AAV) para utilização em terapia gênica. ScAAV é denominado "autocomplementar" porque a região codificadora foi projetada para formar um modelo de DNA de fita dupla intramolecular. Uma etapa determinante da velocidade para o ciclo de vida do genoma de AAV padronizado envolve a síntese da segunda fita, uma vez que o genoma típico de AAV é um modelo de DNA de cadeia simples. No entanto, este não é o caso dos genomas scAAV. Depois da infecção, em vez de esperar pela síntese mediada pela célula da segunda cadeia, as duas metades complementares de scAAV se associarão para formar uma unidade de DNA de fita dupla (dsDNA) que está pronta para a replicação e transcrição imediatas.

[009] Permanece a necessidade de desenvolver um método escalonável para fabricar e purificar um produto farmacêutico de AAV com, por exemplo, poucos capsídeos vazios, pouca proteína da célula hospedeira e/ou pouco DNA contaminante, enquanto retém alta potência.

SUMÁRIO

[0010] A presente descrição fornece um método para preparar preparações de partículas virais purificadas, incluindo preparações de partículas de AAV.

[0011] Em algumas modalidades, a presente descrição fornece uma composição farmacêutica que compreende (a) entre $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas de vetor viral de AAV9/mL (vg/mL), (b) menos do que cerca de 7% de capsídeos virais vazios, (c) menos de cerca de 100 ng/mL de proteína da célula hospedeira por 1×10^{13} vg/mL, e (d) menos do que cerca de 5×10^6 pg/mL, DNA residual da célula hospedeira por 1×10^{13} vg/mL, e em que pelo menos cerca de 80% de $1 - 8 \times 10^{13}$ dos genomas

do vetor viral AAV/mL são funcionais. Em uma modalidade, o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN). Em uma modalidade, o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína 2 de ligação a metil-CpG (MECP2). Em uma modalidade, o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica um RNA curto em forma de grampo (shRNA) que atinge a superóxido dismutase 1 (SOD1). Em uma modalidade, o vetor viral de AAV9 compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada.

[0012] A presente descrição fornece uma formulação farmacêutica. Em algumas modalidades, a formulação farmacêutica aquosa compreende (a) um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN), (b) um tampão Tris, (c) cloreto de magnésio, (d) cloreto de sódio e (e) um poloxâmero (por exemplo, poloxâmero 188), em que a composição farmacêutica não compreende um conservante. Em uma modalidade da formulação, o vetor viral de AAV9 compreende ainda uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada. Em uma modalidade da formulação, a concentração de tampão Tris é de cerca de 10- 30 mM, por exemplo, cerca de 20 mM. Em uma modalidade, o pH da formulação é de cerca de 7,7 a cerca de 8,3, por exemplo, cerca de pH 8,0 (por exemplo, conforme medido por USP <791> (incorporado por referência na sua totalidade)). Em uma

modalidade da formulação, a concentração de cloreto de magnésio é de cerca de 0,5-1,5 mM, por exemplo, cerca de 1 mM. Em uma modalidade da formulação, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 100-300 mM, por exemplo, cerca de 200 mM. Em uma modalidade, a formulação compreende cerca de 0,005% p/v de poloxâmico 188.

[0013] Outro aspecto da descrição é direcionado a um método de tratamento de atrofia muscular espinal (SMA) do tipo I em um paciente necessitado, que compreende administrar um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN (por exemplo, uma composição ou formulação como aqui descrita) ao paciente por via intratecal ou intravenosa, em que o paciente tem (a) nove meses de idade ou menos, (b) tem um peso corporal de pelo menos cerca de 2,6 kg, (c) tem mutações ou deleções nulas bialélicas de *SMN1*, e (d) tem pelo menos uma cópia funcional de *SMN2*. Em uma modalidade, o vetor viral de AAV9 compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada. Em uma modalidade, o paciente tem um peso corporal não superior a cerca de 8,5 kg. Em uma modalidade, o paciente não possui uma substituição c.859G>C no éxon 7 de pelo menos uma cópia do gene *SMN2*. Em uma modalidade, o tratamento é administrado ao paciente antes dos 6 meses de idade. Em uma modalidade, o tratamento é administrado ao paciente antes do início de um ou mais sintomas de SMA selecionados entre hipotonia, atraso nas capacidades motoras, controle deficiente da cabeça, postura projetada do ombro e hipermobilidade das articulações. Em uma modalidade, o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 iguais ou inferiores a 1:100, conforme determinado por um imunoenensaio de ligação ELISA, antes da administração.

[0014] É também aqui descrito um método para tratar um paciente pediátrico com atrofia muscular espinhal (SMA) Tipo I, com ou sem início da doença, que compreende administrar ao paciente uma composição ou formulação que compreende um vetor de vírus adenoassociado (AAV) como aqui descrito.

[0015] A presente descrição também é dirigida a um método de tratamento da Síndrome de Rett em um paciente necessitado, que compreende a administração de um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína 2 de ligação a metil-CpG (MECP2) ao paciente por uma via intratecal ou intravenosa.

[0016] A presente descrição também é dirigida a um método de tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ALS) em um paciente necessitado, que compreende a administração de um vetor viral AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica um RNA curto em forma de grampo (shRNA) que atinge a superóxido dismutase 1 (SOD1) ao paciente por via intratecal ou intravenosa.

[0017] Outro aspecto da descrição é direcionado para um método de tratamento de um paciente que sofre de SMA tipo 1, que compreende as etapas de (a) determinar o peso do paciente, (b) obter um kit que contém frascos de uma composição farmacêutica de vetor viral de AAV9, e (c) administrar o vetor viral de AAV9 dos frascos ao paciente, em que a concentração de vetor viral em cada frasco de cerca de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL, em que o vetor viral de AAV 9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN; e em que o kit compreende o seguinte número de frascos:

Peso do paciente (kg)	frasco 5,5 ± 0,4 mL	frasco 8,3 ± 0,4 mL	Total Frascos Por Kit
2,6 – 3,0	0	2	2
3,1 – 3,5	2	1	3
3,6 – 4,0	1	2	3
4,1 – 4,5	0	3	3
4,6 – 5,0	2	2	4

Peso do paciente (kg)	frasco 5,5 ± 0,4 mL	frasco 8,3 ± 0,4 mL	Total Frascos Por Kit
5,1 – 5,5	1	3	4
5,6 – 6,0	0	4	4
6,1 – 6,5	2	3	5
6,6 – 7,0	1	4	5
7,1 – 7,5	0	5	5
7,6 – 8,0	2	4	6
8,1 – 8,5	1	5	6

[0018] Em uma modalidade, o kit compreende um vetor viral de AAV9 que compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada. Em uma modalidade, o vetor viral de AAV é administrado por infusão em uma dose de cerca de $1,0 \times 10^{14}$ a $2,5 \times 10^{14}$ vg/kg.

[0019] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um kit para tratar um paciente que sofre de atrofia muscular espinhal (SMA) tipo I, que compreende frascos que contêm a composição. O vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN) ou a formulação que compreende (a) um vetor viral de AAV que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN), (b) um tampão Tris, (c) cloreto de magnésio, (d) cloreto de sódio e (e) um poloxâmero (por exemplo, poloxâmero 188).

[0020] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um kit que compreende frascos que contêm cerca de 5,5 mL ou cerca de 8,3 mL de um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN) e formulado em uma concentração de cerca de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL em Tris

20 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 200 mM, Poloxâmero 188 0,005% p/v em pH 7,7-8,3, por exemplo, cerca de 8,0.

[0021] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um método de tratamento de SMA tipo I, que compreende administrar um volume da composição de vetor viral de AAV que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN) ou a formulação que compreende (a) um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN), (b) um tampão Tris, (c) cloreto de magnésio, (d) cloreto de sódio e (e) um poloxâmero (por exemplo, poloxâmero 188) por infusão intravenosa a um paciente necessitado.

[0022] Outro aspecto desta descrição é direcionado a métodos de fabricação de um vetor viral de AAV. Em uma modalidade, um método de fabricação de um vetor viral de AAV compreende as etapas de (a) cultivar células aderentes; (b) transfectar as células aderentes com plasmídeos para possibilitar a produção do vetor viral de AAV; (c) lisar as células aderentes para isolar o vetor viral de AAV; (d) acidificar e clarificar o lisado celular de (c); (e) purificar o produto de (d) usando a cromatografia de troca de cátion (CEX); (f) filtrar o produto de (e) utilizando filtração de fluxo tangencial (TFF); (g) ultracentrifugação do produto de (f) em um tampão de cloreto de cério (CsCl); e (h) coletar os vetores virais de AAV do produto de (g).

[0023] Outro aspecto desta descrição é direcionado para um método de purificação de um vetor viral de AAV a partir de um lisado de cultura celular que compreende as etapas (a) acidificar e clarificar o lisado celular, (b) purificar o produto de (a) utilizando cromatografia de troca de cátion (CEX), (c) filtração do produto de (b) através de uma filtração de fluxo tangencial, (d) ultracentrifugação o produto de (c) usando um tampão cloreto de cério 2 - 4 M (CsCl), (e) coletando os

vetores virais de AAV do produto de (d), (f) filtrando o produto de (e) através de filtração de fluxo tangencial. Em uma modalidade, o método é realizado em escala industrial. Em uma modalidade, o método produz um rendimento maior do que 5×10^{15} vg ou maior do que 8×10^{15} vg ou maior do que 1×10^{16} vg por lote fabricado.

[0024] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um método de tratamento de um paciente com SMA Tipo 1 pela administração de um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN como preparada de acordo com qualquer um dos métodos aqui divulgados.

[0025] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um método de tratamento de um paciente que tem a Síndrome de Rett pela administração de um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2 como preparado de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos.

[0026] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um método de tratamento de um paciente com ALS pela administração de um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica um shRNA que atinge SOD1, como preparado de acordo com qualquer um dos métodos aqui descritos.

[0027] Outro aspecto desta descrição é direcionado para um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN, fabricada de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos. Outro aspecto desta descrição é direcionado a uma composição farmacêutica que compreende um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN, fabricada de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos.

[0028] Outro aspecto desta descrição é direcionado a uma composição farmacêutica aquosa que compreende um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína

SMN, um tampão Tris, uma solução de cloreto de magnésio e uma solução de cloreto de sódio, em que a composição farmacêutica não compreende um conservante e em que a composição é fabricada de acordo com qualquer um dos métodos aqui descritos.

[0029] Outro aspecto desta descrição é direcionado a um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2, fabricada de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos.

[0030] Outro aspecto desta descrição é direcionado a uma composição farmacêutica que compreende um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2, fabricada de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos.

[0031] Outro aspecto desta divulgação é direcionado a um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica um shRNA que atinge SOD1, fabricada de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos.

[0032] Outro aspecto desta descrição é direcionado para o método de tratamento de SMA Tipo 1 em um paciente necessitado, pela administração intravenosa de uma composição farmacêutica que compreende (a) um vetor viral de AAV9 autocomplementar que compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoces de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada, (b) Tris 20 mM em pH 8,0; MgCl₂ 1 mM, (d) NaCl 200 mM e (e) Poloxâmero 188 0,005%, em que o paciente tem um peso corporal de 2,6 kg a 8,5 kg. Em uma modalidade, a composição não compreende um conservante.

[0033] Em uma modalidade, o paciente (a) tem nove meses de idade ou menos, (b) tem um peso corporal de pelo menos cerca de 2,6 kg, (e) tem mutações ou deleções nulas bialélicas de *SMN1* e (d) tem

pelo menos uma cópia funcional de *SMN2*.

[0034] Outro aspecto desta descrição é direcionado para uma composição adequada ou fabricada para administração intravenosa de uma composição farmacêutica que compreende (a) um vetor viral de AAV9 autocomplementar que compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada, (b) Tris 20 mM em pH 8,0; MgCl₂ 1 mM, (d) NaCl 200 mM e (e) Poloxâmero 188 0,005%.

[0035] Em algumas modalidades, é descrita aqui uma composição ou formulação, em que a composição ou formulação compreende pelo menos um dos seguintes: (a) menos de cerca de 0,09 ng de benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg, (b) menos do que cerca de 30 µg/g (ppm) de césio, (c) cerca de 20 a 80 ppm de Poloxâmero 188, (d) menos do que cerca de 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, (e) menos do que cerca de $6,8 \times 10^5$ pg de DNA plasmídico residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, (f) menos que cerca de $1,1 \times 10^5$ pg de hcDNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg e (g) menos que cerca de 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[0036] Em algumas modalidades, a presente descrição fornece um processo a montante para produzir um intermediário (por exemplo, intermediário congelado) derivado de um banco de células de trabalho, em que o processo a montante compreende as etapas de (a) cultivar as células, (b) transfectar as células cultivadas com plasmídeos (por exemplo, três plasmídeos), (c) coletar das partículas virais expandidas das células após um período de cultura, (d) purificar as partículas virais por filtração para remover quaisquer células intactas ou resíduos celulares, (e) submeter o eluente da etapa (d) a filtração de fluxo tangencial e (g) opcionalmente congelar a preparação intermediária

resultante de partículas virais purificadas. Em algumas modalidades, o processo a montante é combinado com etapas de processamento adicionais, em particular, g., etapas de purificação e formulação adicionais para produzir um produto farmacêutico final.

[0037] Em uma modalidade, o banco de células de trabalho compreende células HEK293. Em outras modalidades, é utilizado outro tipo de célula ou derivado que esteja disponível na técnica e é adequado para utilização nos métodos aqui descritos. Em uma modalidade, a etapa de transfecção utiliza polietilenoimina. Em uma modalidade, a etapa de transfecção compreende uma transfecção de vetor triplo que usa um plasmídeo de transgene, por exemplo, pSMN, um plasmídeo pAAV e um plasmídeo pHELP.

[0038] Em uma modalidade, o processo compreende adicionalmente lisar as células transfectadas com tampão de lise e tensoativo.

[0039] Em uma modalidade, a etapa de coleta inclui o tratamento do produto com uma endonuclease, tal como a benzonase, por exemplo, em uma concentração entre 50 a 200 U/ml, por exemplo, em uma concentração entre 75 a 150 U/ml, para reduzir o DNA residual da célula hospedeira.

[0040] Em uma modalidade, a etapa de purificação inclui a filtração em profundidade e subsequente filtração através de um filtro que remova contaminantes de molécula grande e resíduos celulares, por exemplo, um filtro de 0,45 micra, mas que permite que os genomas vetoriais passem através dele. Qualquer filtro de profundidade adequado pode ser usado.

[0041] Em uma modalidade, a filtração de fluxo tangencial ("TFF") atinge entre 5 a 15 X, por exemplo, 6 a 10 X a concentração do eluente da etapa (d) e pelo menos 4 diavolumes, por exemplo, 6 diavolumes diafiltração ou 10 diavolumes ou 12 diavolumes ou 15 diavolumes de

diafiltração. Qualquer filtro de TFF adequado pode ser usado. Em uma modalidade, a membrana de TFF é uma membrana de celulose. Em uma modalidade, a membrana de TFF tem um ponto de corte de 300 kDa.

[0042] Em segundo lugar, a presente descrição fornece um processo a jusante para processar o intermediário (por exemplo, o intermediário congelado) em uma substância do fármaco filtrada. As etapas do processo a jusante incluem uma etapa de acidificação e clarificação (usando filtração), seguida pela cromatografia de troca de cátion, filtração de fluxo tangencial, ultracentrifugação com CsCl e uma etapa adicional de filtração de fluxo tangencial para produzir uma substância medicamentosa filtrada onde as partículas de AAV purificadas estão suspensas em um veículo farmacologicamente aceitável.

[0043] Em uma modalidade, a etapa de acidificação e clarificação inclui filtração em profundidade e subsequente filtração através de um filtro que remove contaminantes de molécula grande e resíduos celulares, por exemplo, um filtro de 0,45 micra. Em algumas modalidades, o ajuste do pH é controlado. Como parte desta etapa, em uma modalidade, é adicionado um detergente, por exemplo Tween. Em algumas modalidades, a taxa de adição de Tween e a faixa de concentração de Tween são controlados.

[0044] Em uma modalidade, a cromatografia de troca de cátion compreende uma resina de cromatografia baseada em membrana utilizando um compósito de resina de sulfonila com um tamanho de poro de 0,2 micra.

[0045] Em uma modalidade, a etapa de ultracentrifugação com Cloreto de Césio (CsCl) utiliza entre CsCl 2 a 4 M, por exemplo, cerca de 3 M CsCl.

[0046] Em outra modalidade, a etapa de ultracentrifugação com

CsCl é realizado a cerca de 40 a 50 kRPM durante cerca de 20 a 25 horas. Em outra modalidade, a etapa de ultracentrifugação com CsCl é realizada em cerca de 45 kRPM durante cerca de 22 horas.

[0047] Em uma modalidade, a filtração de fluxo tangencial ("TFF") atinge entre 5 a 15 X, por exemplo, 6 a 10 X a concentração do eluente da etapa (d) e pelo menos 4 diavolumes, por exemplo, 6 diavolumes de diafiltração ou 10 diavolumes ou 12 diavolumes ou 15 diavolumes de diafiltração. Em uma modalidade, a membrana de TFF tem um ponto de corte de 300 kDa.

[0048] Em uma modalidade, o eluente está abaixo do nível de detecção de cério (Cs). Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é inferior a 50 por milhão (ppm). Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é de cerca de 50 a 70 ppm. Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é de cerca de 70 a 90 partes por milhão (ppm). Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é de cerca de 90 a 110 partes por milhão (ppm). Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é de cerca de 110 a 130 partes por milhão (ppm). Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é de cerca de 130 a 150 partes por milhão (ppm). Em outra modalidade, o nível de detecção de Cs é inferior a 150 partes por milhão (ppm).

[0049] Esses métodos de purificação podem ser usados para preparar preparações virais com alto rendimento, incluindo preparações de AAV (por exemplo, AAV9-SMN), que compreendem menos do que 5×10^6 pg/ml de DNA residual da célula hospedeira (hcDNA) por 1×10^{13} genomas de vetor ("vg")/ml, por exemplo, menos do que $1,2 \times 10^6$ pg/ml de hcDNA por 1×10^{13} vg/mL. Assim, um paciente com 5 kg que receba $7,5 \times 10^{15}$ vg obteria não mais do que $1,2 \times 10^6$ pg/mL $\times 7,5 \times 10^{15}$ vg / (1×10^{13} vg/mL) = $8,4 \times 10^7$ pg de hcDNA = 84.000 ng de hcDNA por 5 kg por dose. Em uma modalidade, a preparação compreende menos do que $5,0 \times 10^5$ pg de DNA residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg,

menos do que $2,0 \times 10^5$ pg de DNA residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que $1,1 \times 10^5$ pg de DNA residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que $1,0 \times 10^5$ pg de DNA residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que $0,9 \times 10^5$ pg de DNA residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que $0,8 \times 10^5$ pg de DNA residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou qualquer concentração intermediária.

[0050] Em uma modalidade, o AAV é um AAV9 com defeito na replicação, por exemplo, scAAV9, com ITRs derivadas de AAV2. Em outra modalidade, o vetor de AAV transporta um transgene de SMN. Em uma modalidade, o DNA de codificação de SMN é apresentado no GenBank com o Número de Acesso NM_000344.2. As substituições de nucleotídeos conservativas de DNA de SMN são também contempladas (por exemplo, uma mudança de guanina para adenina na posição 625, como estabelecido no Número de Acesso do GenBank NM_000344.2).

[0051] Outro aspecto da descrição é direcionado a uma composição farmacêutica que compreende partículas de AAV em uma formulação adequada para (a) injeção intravenosa ("IV") ou (b) administração intratecal ("IT").

[0052] Em outra modalidade, a composição farmacêutica tem menos de 10% de capsídeos vazios, menos de 8% de capsídeos vazios, menos de 7% de capsídeos vazios, menos de 5% de capsídeos vazios, menos de 3% de capsídeos vazios ou menos de 1% de capsídeos vazios. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica tem menos de cerca de 5% de capsídeos vazios. Em uma modalidade, o número de capsídeos vazios está abaixo do limite de detecção. Em algumas modalidades, é vantajoso para a composição farmacêutica ter baixas quantidades de capsídeos vazios, porque esses capsídeos vazios podem gerar uma resposta adversa (por exemplo, resposta imune, resposta inflamatória, resposta hepática e/ou resposta cardíaca)

sem benefício terapêutico.

[0053] Em outra modalidade, a proteína residual da célula hospedeira ("rHCP") na dita composição farmacêutica é menor ou igual a 100 ng/ml rHCP por 1×10^{13} vg/ml, por exemplo, menos do que ou igual a 40 ng/ml rHCP por 1×10^{13} vg/ml ou 1 a 50 ng/ml de rHCP por 1×10^{13} vg/ml. Em uma modalidade, uma composição farmacêutica aqui descrita compreende menos do que 10 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou menos do que 5 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou menos do que 3 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou qualquer concentração intermediária.

[0054] Em outra modalidade, o DNA residual da célula hospedeira ("hcDNA") na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a 5×10^6 pg/ml de hcDNA por 1×10^{13} vg/ml, menor do que ou igual a $1,2 \times 10^6$ pg/ml de hcDNA por 1×10^{13} vg/ml ou 1×10^5 pg/ml de hcDNA por 1×10^{13} vg/ml a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml. Em uma modalidade, o DNA residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que $5,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que $2,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que $1,0 \times 10^5$ pg de hcDNA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que $0,9 \times 10^5$ pg de hcDNA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que $0,8 \times 10^5$ pg de hcDNA por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou qualquer concentração intermediária.

[0055] Em uma modalidade, o plasmídeo de DNA residual na dita composição farmacêutica é menor do que $1,7 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou 1×10^5 pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg a $1,7 \times 10^6$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg. Em uma modalidade, o plasmídeo de DNA residual na dita composição farmacêutica é menor do que $10,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que $8,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou menor do que $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[0056] Em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui descrita compreende menos do que 0,5 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do

que 0,3 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que 0,22 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou menos do que 0,2 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou qualquer concentração intermediária de albumina do soro bovino (BSA). Em uma modalidade, a benzonase na dita composição farmacêutica é menor do que 0,2 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que 0,1 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que 0,09 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que 0,08 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg ou qualquer concentração intermediária. Em uma modalidade, o Poloxâmero 188 na dita composição farmacêutica é de cerca de 10 a 150 ppm, cerca de 15 a 100 ppm ou cerca de 20 a 80 ppm. Em uma modalidade, o césio na dita composição farmacêutica é menor do que 50 µg/g (ppm), menor do que 30 µg/g (ppm) ou menor do que 20 µg/g (ppm) ou qualquer concentração intermediária.

[0057] Em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui descrita compreende impurezas totais, por exemplo, como determinado por SDS-PAGE, de menos do que 10%, menos do que 8%, menos do que 7%, menos do que 6%, menos do que 5%, menos do que 4%, menos do que 3%, menos do que 2% ou qualquer percentual intermediário. Em uma modalidade, a pureza total, por exemplo, como determinado por SDS-PAGE, é maior do que 90%, maior do que 92%, maior do que 93%, maior do que 94%, maior do que 95%, maior do que 96%, maior do que 97%, maior do que 98% ou qualquer percentual intermediário. Em uma modalidade da composição farmacêutica nenhuma impureza única não denominada, por exemplo, como medida por SDS-PAGE, é maior do que 5%, maior do que 4%, maior do que 3% ou maior do que 2% ou qualquer percentual intermediário. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende um percentual de capsídeos cheios em relação aos capsídeos totais (por exemplo, pico 1 + pico 2 como medidos pela ultracentrifugação analítica) maior do que 85%, maior do que 86%, maior do que 87%, maior do que 88%, maior do que 89%, maior do que 90%, maior do que 91%, maior do que 91,9%,

maior do que 92%, maior do que 93% ou qualquer percentual intermediário. Em uma modalidade da composição farmacêutica, o percentual de capsídeos cheios medido no pico 1 por ultracentrifugação analítica é de 20 a 80%, 25 a 75%, 30 a 75%, 35 a 75% ou 37,4 a 70,3%. Em uma modalidade da composição farmacêutica, o percentual de capsídeos cheios medido no pico 2 por ultracentrifugação analítica é de 20 a 80%, 20 a 70%, 22 a 65%, 24 a 62% ou 24,9 a 60,1%.

[0058] Em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui descrita compreende um título genômico de 1,0 a $5,0 \times 10^{13}$ vg/mL, 1,2 a $3,0 \times 10^{13}$ vg/mL ou 1,7 a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL.

[0059] Em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui descrita exibe uma carga biológica de menos do que 5 CFU/mL, menos do que 4 CFU/mL, menos do que 3 CFU/mL, menos do que 2 CFU/mL ou menos do que 1 CFU/mL ou qualquer contração intermediária. Em uma modalidade, a quantidade de endotoxina de acordo com USP, por exemplo, USP <85> (incorporada aqui por referência em sua totalidade) é menor do que 1,0 EU/mL, menor do que 0,8 EU/mL ou menor do que 0,75 EU/mL.

[0060] Em uma modalidade, a osmolaridade de uma composição farmacêutica aqui descrita de acordo com USP, por exemplo, USP <785> (incorporada aqui por referência em sua totalidade) é de 350 a 450 mOsm/kg, 370 a 440 mOsm/kg ou 390 a 430 mOsm/kg. Em uma modalidade, a composição farmacêutica contém menos do que 1200 partículas que são maiores do que 25 µm por recipiente, menos do que 1000 partículas que são maiores do que 25 µm por recipiente, menos do que 500 partículas que são maiores do que 25 µm por recipiente ou qualquer valor intermediário. Em uma modalidade, a composição farmacêutica contém menos do que 10000 partículas que são maiores do que 10 µm por recipiente, menos do que 8000 partículas que são maiores do que 10 µm por recipiente ou menos do que 600 partículas

que são maiores do que 10 µm por recipiente.

[0061] Em uma modalidade, a composição farmacêutica tem um título genômico de 0,5 a 5,0 x 10¹³ vg/mL, 1,0 a 4,0 x 10¹³ vg/mL, 1,5 a 3,0 x 10¹³ vg/mL ou 1,7 a 2,3 x 10¹³ vg/mL.

[0062] Em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui descrita compreende um ou mais do seguinte: menos do que cerca de 0,09 ng de benzonase por 1,0 x 10¹³ vg, menos do que cerca de 30 µg/g (ppm) de césio, cerca de 20 a 80 ppm de Poloxâmero 188, menos do que cerca de 0,22 ng de BSA por 1,0 x 10¹³ vg, menos do que cerca de 6,8 x 10⁵ pg de plasmídeo de DNA residual por 1,0 x 10¹³ vg, menos do que cerca de 1,1 x 10⁵ pg de hcDNA residual por 1,0 x 10¹³ vg, menos do que cerca de 4 ng de rHCP por 1,0 x 10¹³ vg, pH 7,7 a 8,3, cerca de 390 a 430 mOsm/kg, menos do que cerca de 600 partículas que têm ≥ 25 µm de tamanho por recipiente, menos do que cerca de 6000 partículas que têm ≥ 10 µm de tamanho por recipiente, cerca de 1,7 x 10¹³ – 2,3 x 10¹³ vg/mL de título genômico, título infeccioso de cerca de 3,9 x 10⁸ a 8,4 x 10¹⁰ IU por 1,0 x 10¹³ vg, proteína total de cerca de 100-300 µg por 1,0 x 10¹³ vg, sobrevida média de ≥ 24 dias de camundongos Δ7SMA com cerca de 7,5 x 10¹³ vg/kg dose de vetor viral, cerca de 70 a 130% de potência relativa com base em um ensaio baseado em célula *in vitro* e/ou menos do que cerca de 5% de capsídeo vazio. Em várias modalidades, as composições farmacêuticas aqui descritas compreendem qualquer uma das partículas virais discutidas aqui (por exemplo, partículas virais AAV SMN, AAV MECP2 ou AAV SOD1), retêm uma potência entre ± 20%, entre ± 15%, entre ± 10% ou entre ± 5% de um padrão de referência. Em algumas modalidades, a potência é medida usando um ensaio celular *in vitro* ou um modelo animal *in vivo* adequados. Por exemplo, a potência ou o % de partículas virais AAV SMN funcionais podem ser determinados usando um modelo animal de SMA, por exemplo, o camundongo SMAΔ7 ou um ensaio quantitativo

baseado em célula usando uma linhagem celular adequada, por exemplo, células progenitoras neurais primárias (NPCs) isoladas do córtex de camundongos SMAΔ7. Em uma modalidade, a potência é avaliada contra um padrão de referência usando os métodos de Foust et al., Nat. Biotechnol., 28(3), pp. 271-274 (2010). Qualquer padrão de referência adequado pode ser usado. A potência ou % de AAV MeCP2 funcional podem ser ensaiados utilizando um ensaio celular *in vitro* ou modelo animal *in vivo* adequados, por exemplo, um camundongo knockout para *Mecp2* como em Guy et al, "Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome". Science, 315 (5815): 1143-7. A potência ou % de AAV SOD1 funcional podem ser ensaiados utilizando um ensaio celular *in vitro* ou modelo animal *in vivo* adequados, por exemplo, um camundongo *SOD1* mutante como em "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." Science, 264(5166):1772-5. Em uma modalidade, a composição farmacêutica tem uma potência *in vivo* como determinada pela sobrevida média em um camundongo SMAΔ7 tratado com uma dose de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg por mais do que 15 dias, mais do que 20 dias, mais do que 22 dias ou mais do que 24 dias. Em uma modalidade, a composição farmacêutica tem uma potência relativa *in vivo* como testada pelo ensaio baseado em célula de 50 a 150%, 60 a 140% ou 70 a 130% em relação a um padrão de referência e/ou controle adequado.

[0063] Em uma modalidade, uma formulação intravenosa ("IV") tem um pH entre 7,5 e 8,5, um título genômico de cerca de 1 a 8×10^{13} genomas de vetor viral/mL (vg/mL) ou entre 2×10^{13} vg/ml - 6×10^{13} vg/ml e, opcionalmente, uma osmolaridade de 384 a 448 mOsm/kg. Em uma modalidade, uma formulação IV compreende $MgCl_2$, NaCl, Pluronic F68, em tampão Tris em pH 8,0

[0064] Em uma modalidade, para administração de IV, o vetor AAV-9 que transporta o transgene SMN é administrado sob condições

estéreis em um ambiente apropriado (por exemplo, suíte intervencionista, sala de cirurgia, sala de procedimentos dedicados) uma vez através de um cateter venoso inserido em uma veia periférica do membro (braço ou perna) na dose indicada e é infundida lentamente ao longo de aproximadamente 30-60 minutos.

[0065] Em outra modalidade, a presente descrição fornece composições e métodos de distribuição de um polinucleotídeo ao sistema nervoso central de um paciente necessitado compreendendo a administração intratecal ("IT") de rAAV9 e um agente de contraste não iônico de baixa osmolaridade ao paciente, em que o rAAV9 compreende um genoma autocomplementar que inclui o polinucleotídeo. O polinucleotídeo é liberado, por exemplo, no cérebro, na espinal medula, em uma célula da glia, um astrócito e/ou um neurônio motor inferior. O agente de contraste não iônico e de baixa osmolaridade é, por exemplo, iobitridol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopentol, iopromide, ioversol ou ioxilan. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo é um polinucleotídeo de sobrevida do neurônio motor (SMN). Em uma modalidade, o agente de contraste é iohexol, por exemplo, iohexol 180 (comercializado como Omnipaque 180, que contém 388 mg de iohexol equivalente a 180 mg de iodo orgânico por mL).

[0066] Em uma modalidade, para administração IT, o vetor scAAV9 que transporta o transgene SMN é diluído com solução salina normal e pré-misturado com um meio de contraste hiperbárico apropriado, aprovado e rotulado para utilização pediátrica para monitorização radiográfica da injeção através da injeção intratecal lombar (tal como Omnipaque 180). O volume total da composição aquosa que compreende o vetor AAV-9 que transporta o transgene de SMN mais o meio de contraste e/ ou solução salina não excederá 5 mL. O agente de contraste e o vetor scAAV-9 que transporta o transgene SMN podem ser coformulados, coembalados ou embalados e liberados ao centro do

paciente separadamente.

[0067] Os pacientes recebem o vetor scAAV-9 que transporta o transgene SMN através da injeção intratecal sob condições estéreis em uma sala de pacientes PICU ou outro ambiente apropriado (por exemplo, suíte intervencionista, sala de cirurgia, sala de procedimentos dedicados) com acesso imediato para cuidados críticos agudos. Os locais podem usar uma agulha atraumática inserida com o bisel paralelo às fibras da dura-máter; isso tem demonstrado reduzir consideravelmente os danos à dura-máter e, conseqüentemente, diminuir o risco de vazamento de líquido cefalorraquidiano após a punção lombar (Ebinger et al., "Headache and Backache After Lumbar Puncture in Children and Adolescents: A Prospective Study." *Pediatrics*, 113(6):1588-1592; Kiechl-Kohlendorfer et al., "Cerebrospinal Fluid Leakage After Lumbar Puncture in Neonates: Incidence and Sonographic Appearance." *American Journal of Roentgenology*, 181(1):231-234), incluindo em crianças.

[0068] A sedação/anestesia é recomendada para todos os pacientes que recebem injeções IT. O método e os medicamentos ficarão a critério do anestesiolologista local, mas devem incorporar um grau suficiente de sedação ou ansiólise para garantir a analgesia e a falta de movimento para o procedimento e o posicionamento de Trendelenburg pós-procedimento. Os pacientes serão colocados na posição de Trendelenburg, cabeça inclinada a 30°C por 15 minutos depois da administração da terapia IT para intensificar a distribuição às regiões cervical e do cérebro.

[0069] Os pacientes são colocados em decúbito lateral e um cateter com estilete é inserido por uma punção lombar no espaço interespinal L3-L4 ou L4-L5 no espaço subaracnóideo. A canulação subaracnóidea é confirmada com o fluxo de líquido cefalorraquidiano (CSF) claro do cateter. O líquido cefalorraquidiano será removido e

descartado de acordo com as diretrizes institucionais. O vetor ScAAV-9 transportando o transgene SMN na solução de contraste pré-misturada é injetado diretamente no espaço subaracnóideo.

[0070] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um método de tratamento de uma doença neurológica em um paciente necessitado que compreende a administração intravenosa ou intratecal da composição farmacêutica aqui descrita, em que o parvovírus compreende um genoma de rAAV9 autocomplementar, em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN e em que a doença é SMA.

[0071] Em outra modalidade, a presente descrição fornece um método de tratamento de uma doença neurológica em um paciente necessitado que compreende a administração intratecal de uma composição farmacêutica aqui descrita com um agente de contraste, em que o parvovírus compreende um genoma de rAAV9 autocomplementar, em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN, em que a doença é SMA e em que o agente de contraste é o omnipaque 180.

[0072] Em outra modalidade, a presente descrição fornece um método para tratar SMA de tipo II, III ou IV em um paciente necessitado, que compreende a liberação intratecal da composição farmacêutica aqui descrita com um agente de contraste, em que o parvovírus compreende um genoma de rAAV9 autocomplementar, em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN e em que o agente de contraste é o omnipaque 180.

[0073] Em outra modalidade, a presente descrição fornece um método de tratamento de SMA tipo I em um paciente necessitado, compreendendo a distribuição intravenosa da composição farmacêutica aqui descrita, em que o parvovírus compreende um genoma de rAAV9 autocomplementar e em que o transgene manipulado compreende um

polinucleotídeo de SMN. Em algumas modalidades, o paciente tem 0 a 9 meses de idade. Em algumas modalidades, o paciente tem 0 a 6 meses de idade. Em outras modalidades, o paciente pediátrico tem até cerca de 8 kg de peso. Em algumas modalidades, o paciente pediátrico tem cerca de 8,5 kg ou menos. Em algumas modalidades, o paciente pediátrico tem cerca de 2,6 kg ou mais.

[0074] Em outra modalidade, a presente descrição fornece um kit para o tratamento de SMA do tipo 1 em um paciente necessitado, que compreende a administração intravenosa da composição farmacêutica descrita contida aqui em frascos. Em algumas modalidades, o peso do paciente é medido e a dose é calculada com base no peso do paciente.

[0075] A menos que definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado como normalmente entendido por um especialista na técnica ao qual esta descrição pertence.

[0076] Como usado aqui, as formas no singular de uma palavra também incluem a forma no plural da palavra, a menos que o contexto indique claramente o contrário; como exemplos, as expressões "um", "uma" e "o" são entendidos como singulares ou plurais e o termo "ou" é entendido como inclusivo. Por exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos.

[0077] Ao longo do pedido, a palavra "compreendendo", ou variações tais como "compreende", serão entendidas como implicando a inclusão de um elemento declarado, número inteiro ou etapa ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas. Ao longo do pedido, a palavra "consistindo em", ou variações como "consiste em", serão entendidas como implicando a inclusão de um elemento declarado, número inteiro ou etapa ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas e a

exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas. Ao longo do pedido, a palavra "consistindo essencialmente em" ou variações como "consiste essencialmente em", serão entendidas como implicando a inclusão de um elemento declarado, números inteiros ou etapas ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas, e qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas que não afetam materialmente as características básicas e novas da descrição e/ou reivindicação.

[0078] Cerca de pode ser entendido como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, ou 0,01% do Valor declarado. Quando usado em referência a um valor percentual, "cerca" pode ser entendido como dentro de $\pm 1\%$ (por exemplo, "cerca de 5%" pode ser entendido como dentro de 4% - 6%) ou $\pm 0,5\%$ (por exemplo, "cerca de 5%" pode ser entendido como dentro de 4,5% - 5,5%). A menos que fique claro a partir do contexto, todos os valores em numéricos aqui fornecidos são modificados pelo pela expressão "cerca".

[0079] Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou teste da presente descrição, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência na sua totalidade. As referências aqui citadas não são admitidas serem da técnica anterior à descrição reivindicada. Em caso de conflito, o presente Pedido, incluindo definições, controlará. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitantes. Outras características e vantagens da descrição ficarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0080] Vários objetivos e vantagens e uma compreensão mais

completa da presente descrição são aparentes e mais facilmente apreciadas com referência a seguinte Descrição Detalhada e às reivindicações em anexo quando tomadas em conjunto com as Figuras que as acompanham, em que:

[0081] FIGURA 1. Mapas de plasmídeo de pSMN, pHELP e pAAV.

[0082] FIGURA 1A mostra o mapa do plasmídeo pSMN. pSMN é um plasmídeo que codifica a informação de um genoma de DNA de AAV autocomplementar recombinante que expressa o cDNA da sobrevivência do neurônio motor humano (SMN) sob o controle de um promotor híbrido de beta-actina de galinha com um elemento intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV). O cDNA de SMN codifica uma proteína funcional de extensão completa. O cassete de expressão contém uma sequência de íntrons modificada derivada do vírus símio 40 (SV40) e um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH). O cassete de expressão (CMV-CB-SV40-SMN-BGHpA) é flanqueado por repetições terminais invertidas derivadas de AAV2 (ITRs). A ITR esquerda é modificada para empacotar preferencialmente genomas autocomplementares de AAV. Juntas, as regiões intermediárias e que incluem as ITRs são empacotadas em capsídeos de AAV9 recombinantes durante a fabricação do produto medicamentoso encontrado. Os componentes-chave de pSMN que não se destinam a ser embalados em genomas de AAV recombinantes incluem uma fase de leitura aberta que codifica a resistência à canamicina (KanR) e uma origem de replicação (ori) derivada de pUC. As regiões ori e KanR são úteis para a fabricação de plasmídeos.

[0083] FIGURA 1B mostra o mapa do plasmídeo do plasmídeo pHELP. O plasmídeo pHELP contém os componentes Adenovirais Trans-atuantes necessários para a produção de vírus adenoassociados recombinantes. O plasmídeo pHELP contém as regiões do genoma do

adenovírus que fornecem fatores que são importantes para a replicação do AAV, ou seja, RNA de E2A, E4 e VA. As funções do adenovírus E1 envolvidas na replicação de rAVV são fornecidas pela transfecção de células hospedeiras 293. O plasmídeo pHELP não contém, no entanto, outros genes de replicação de adenovírus ou estruturais. As sequências de adenovírus presentes neste plasmídeo representam apenas ~28% (9.280 / 35.938) do genoma de adenovírus e não contêm os elementos *cis* para replicação, tais como as repetições terminais invertidas. Portanto, não se espera que nenhum adenovírus infeccioso seja gerado a partir desse sistema de produção.

[0084] FIGURA 1C mostra o mapa do plasmídeo de AAV. O genoma de AAV do tipo selvagem contém dois elementos estruturais não-codificadores chamados repetições terminais invertidas que flanqueiam as fases de leitura abertas *rep* e *cap*. *Rep* e *cap* codificam a replicação viral e as proteínas do capsídeo, respectivamente. Na produção de vetores virais adenoassociados recombinantes; as ITRs virais são os únicos elementos usados em *cis*, enquanto as fases de leitura abertas virais são fornecidas em *trans*. O uso da transfecção transitória do método com células HEK293 aderentes para fazer AAV aborda os papéis *cis/ trans* para os diferentes elementos genéticos, dividindo-os para separar plasmídeos. O plasmídeo pAAV2/9 contém fases de leitura abertas para o gene *rep* de AAV2 e o gene *cap* de AAV9.

[0085] FIGURA 2 mostra um fluxograma do processo para a seleção de células HEK293 quanto a aderência excepcional e banco celular pré-master (MCB).

[0086] FIGURA 3 mostra um resumo dos detalhes do processamento de células para a seleção de células HEK293 quanto a aderência excepcional e banco celular pré-master (MCB).

[0087] FIGURA 4 descreve o fluxograma do processo a montante da substância medicamentosa.

[0088] FIGURA 5 descreve o fluxograma do processo a jusante da substância medicamentosa.

[0089] FIGURA 6 mostra a inativação de XMuLV por Tween 20 adicionado em até 120 min.

[0090] FIGURA 7 mostra a inativação de PRV por Tween 20 adicionado em até 120 min.

[0091] FIGURA 8 descreve o fluxo do processo de expansão de células HEK 293 durante experimentos de densidade de semeadura celular.

[0092] FIGURAS 9A-E mostram perfis de crescimento e metabolitos. Células HEK 293 foram semeadas em duplicata a 12.000 e 8.000 células/cm² em biorreatores (pH 7,23, 37,0°C, 55% de oxigênio dissolvido (DO)). As células foram transfectadas com os plasmídeos de DNA/PEI aos quatro dias (12.000 células/cm²) e cinco dias (8.000 células/cm²) pós-semeadura. Biorreatores foram coletados oito dias (12.000 células/cm²) e nove dias (8.000 células/cm²) pós-semeadura. Leituras de pH e metabolitos foram lidas diariamente em um Nova BioFlex.

[0093] FIGURA 10 mostra a produção do genoma viral como uma função da densidade de semeadura celular (8000 ou 12000 células/cm²) e quatro diferentes extensões do tempo de transfecção (20 min, 1 h ou 2 horas).

[0094] FIGURA 11 mostra títulos virais de intermediários amostrados em diferentes etapas de filtração ao longo do processo de fabricação.

[0095] FIGURAS 12 A-B mostram a recuperação do vetor viral e a depuração da proteína da célula hospedeira (HCP) na etapa de TFF1.

[0096] FIGURA 13 descreve o fluxo do processo de expansão de células HEK 293 durante os experimentos de densidade de semeadura celular.

[0097] FIGURAS 14 A-E mostram que as células HEK 293 foram semeadas em duplicata a 8.000 células/cm², 9.350 células/cm², 10.700 células/cm², 12.050 células/cm² em biorreatores (pH 7,23, 37,0°C, 55% DO). As células foram transfectadas com plasmídeos de DNA/PEI (1:1 m/m) cinco dias após a semeadura. A análise do pH e do metabolito foi realizada utilizando NOVA BioProfile 400.

[0098] FIGURAS 15 A-B mostra a produção de substância farmacêutica a partir de quatro densidades iniciais de semeadura em biorreatores. Comparação do título do vírus e do genoma do vetor coletado por unidade de área de superfície.

[0099] FIGURA 16 mostra os Processos de Fabricação de Fase 1 (Processo A) e Fase 3 (Processo B).

[00100] FIGURAS 17 A-B fornece uma tabela que ilustra a comparabilidade e os resultados da consistência de fabricação - Produtos do Processo A (Fase 1) e do Processo B (Fase 3). Produtos do Processo B são mostrados ter benefícios adicionais em relação ao Processo A.

[00101] FIGURA 18 mostra a comparabilidade entre o Processo A e o Processo B utilizando a comparação pareada do Processo A (Fase 1 Lote NCHAAV9SMN0613) e do Processo B (Fase 3 Lote 600156). Produtos do Processo B são mostrados ter benefícios adicionais em relação ao Processo A.

[00102] FIGURA 19 mostra a avaliação da consistência de fabricação por comparação pareada dos lotes 600156 e 600307 do Processo B (Fase 3).

[00103] FIGURA 20 mostra o perfil de estabilidade para NCH lote NCHAAV9SMN0613 armazenado em condições de armazenamento em tempo real $\leq 60^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.

[00104] FIGURA 21 mostra coeficientes de sedimentação ($\text{sec} \times 10^{-13}$) o material da Fase 1 (NCHAAV9SMN0613) mostrando capsídeos

vazios (7%) com coeficiente de sedimentação de aproximadamente 60×10^{-13} e os capsídeos cheios com faixa de coeficiente de sedimentação de aproximadamente 80 a 150×10^{-13} seg.

[00105] FIGURA 22 mostra os coeficientes de sedimentação ($\text{sec} \times 10^{-13}$) para o material da Fase 3 (600156) que mostra capsídeos vazios (2%) com coeficiente de sedimentação de aproximadamente 60×10^{-13} e os capsídeos cheios com uma faixa de coeficiente de sedimentação de aproximadamente 80 a 150×10^{-13} s.

[00106] FIGURA 23 mostra os coeficientes de sedimentação ($\text{s} \times 10^{-13}$) para o material da Fase 3 (600307) mostrando capsídeos vazios (4%) com coeficiente de sedimentação de aproximadamente 60×10^{-13} e os capsídeos cheios com uma faixa de coeficiente de sedimentação de aproximadamente 80 a 150×10^{-13} s.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00107] A fim de promover o desenvolvimento da terapia com gene de AAV além dos modelos em animais e em estudos clínicos e/ou para usos terapêuticos, foi desenvolvido um processo escalonável capaz de produzir material viral adequado para uso humana.

[00108] Em algumas modalidades, por "vetor" é entendido qualquer elemento genético, tal como um plasmídeo, fago, transposon, cosmídeo, cromossoma, vírus, vírion etc., que é capaz de replicação quando associado aos elementos de controle apropriados e que pode transferir as sequências de gene entre as células. Assim, a expressão inclui veículos de clonagem e expressão, assim como vetores virais.

[00109] Em algumas modalidades, por um "vetor de AAV" é entendido um vetor derivado de um sorotipo de vírus adenoassociado, incluindo sem limitação, AAV-1 AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6., AAV-7, AA-8 e AAV-9. Os vetores de AAV podem ter um ou mais dos genes de tipo selvagem de AAV eliminados no todo ou em parte, por exemplo, os genes rep e/ou cap, mas retêm sequências de ITR

flanqueadoras funcionais. Sequências ITR funcionais são necessárias para o resgate, replicação e empacotamento do vírion de AAV. Assim, um vetor de AAV é aqui definido para incluir pelo menos as sequências que em cis fornecem replicação e empacotamento (por exemplo, ITRs funcionais) dos vírus. As ITRs não precisam ter as sequências de nucleotídeos do tipo selvagem e podem ser alteradas, por exemplo, pela inserção, eliminação ou substituição de nucleotídeos, desde que as sequências proporcionem o resgate, replicação e empacotamento funcionais. Em uma modalidade, o vetor é um vetor de AAV-9, com ITR derivadas de AAV-2. Também por um "vetor de AAV" é entendido o invólucro de proteína ou capsídeo, que fornece um veículo eficiente para liberar o vetor de ácido nucleico no núcleo das células-alvo.

[00110] Em algumas modalidades, por "scAAV" é entendido um vírus adenoassociado autocomplementar (scAAV), que é um vetor viral manipulado a partir do vírus adenoassociado que ocorre naturalmente (AAV) para utilização em terapia com gene. scAAV é denominado "autocomplementar" porque a região codificadora foi projetada para formar um molde de DNA de fita dupla intramolecular.

[00111] Em algumas modalidades, a expressão "impurezas relacionadas ao vetor" se refere a todos os tipos de partículas de AAV que diferentes das partículas de AAV recombinantes genuínas. As impurezas relacionadas a vetores incluem capsídeos de AAV vazios (também chamados de "vazios" ou "partículas vazias") e partículas de AAV que contêm sequências de polinucleotídeos diferentes do genoma do vetor pretendido (também referidas como "impurezas de ácido nucléico encapsidadas por AAV" ou "impurezas de DNA encapsidadas por AAV").

[00112] Em algumas modalidades, "vírus recombinante" significa um vírus que foi geneticamente alterado, por exemplo, pela adição ou inserção de um construto de ácido nucleico heterólogo na partícula.

"Recombinante" pode abreviado "r", por exemplo, rAAV pode se referir a AAV recombinante. A expressão "AAV" como aqui usada pretende abranger "AAV recombinante" ou "rAAV".

[00113] Em algumas modalidades, por "vírion de AAV" é entendido uma partícula de vírus completa, tal como uma partícula de vírus AAV de tipo selvagem (wt) (que compreende um genoma de ácido nucleico de AAV de fita simples linear associado a um revestimento de proteína de capsídeo de AAV). Com relação a isso, moléculas de ácido nucleico de AAV de fita simples de qualquer sentido complementar, por exemplo, fitas "senso" ou "antissenso", podem ser envelopadas em qualquer um vírion de AAV e ambas as fitas são igualmente infecciosas.

[00114] Em algumas modalidades, as expressões "vírion de AAV recombinante", "vírion de rAAV", "partícula de vetor de AAV", "capsídeos cheios" e "partículas cheias" são aqui definidas como um vírus infeccioso, de replicação deficiente, que incluem um invólucro de proteína de AAV, encapsulando uma sequência de nucleotídeos heteróloga de interesse que é flanqueada em ambos os lados por ITRs de AAV. Um vírion de rAAV é produzido em uma célula hospedeira adequada que possui sequências que especificam um vetor AAV, funções auxiliares de AAV e funções acessórias aí introduzidas. Deste modo, a célula hospedeira é tornada capaz de codificar polipeptídeos de AAV que fornecem o empacotamento do vetor AAV (contendo uma sequência de nucleotídeos recombinante de interesse) em partículas de vírion recombinantes infecciosas para subsequente liberação de genes.

[00115] Em algumas modalidades, as expressões "capsídeo vazio" e "partícula vazia" se referem a um vírion de AAV que inclui um invólucro de proteína de AAV, mas que não possui, no todo ou em parte, o construto de polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos heteróloga de interesse flanqueada em ambos os lados por ITRs do AAV.

[00116] A expressão "célula hospedeira" denota, por exemplo, microrganismos, células de levedura, células de inseto e células de mamíferos, que podem ser, ou foram, usadas como recipientes de um construto auxiliar de AAV, um plasmídeo vetor de AAV, um vetor de função acessória ou outro DNA de transferência. A expressão inclui a progênie da célula original que foi transfectada. Assim, uma "célula hospedeira", como usada aqui, se refere geralmente a uma célula que foi transfectada com uma sequência de DNA exógena. Entende-se que a progênie de uma única célula parental pode não ser necessariamente completamente idêntica em morfologia ou em DNA genômico ou total como o original progenitor, devido a mutação natural, acidental ou deliberada.

[00117] Em outra modalidade, a expressão "funções auxiliares de AAV" se refere a sequências codificadoras derivadas de AAV que podem ser expressas para fornecer produtos de gene de AAV que, por sua vez, funcionam em trans para replicação produtiva de AAV. Assim: as funções auxiliares de AAV incluem ambas fases de leitura aberta principais de AAV (ORFs), *rep* e *cap*. Os produtos de expressão de Rep demonstraram possuir muitas funções, incluindo, entre outras: reconhecimento, ligação e corte da origem de replicação do DNA de AAV; atividade de helicase de DNA; e modulação da transcrição de promotores de AAV (ou outros heterólogos). Os produtos de expressão de Cap fornecem funções de empacotamento necessárias. As funções auxiliares de AAV como usadas aqui complementam as funções de AAV em trans que estão faltando nos vetores de AAV.

[00118] Em uma modalidade, a expressão "construto auxiliar de AAV" se refere geralmente a uma molécula de ácido nucleico que inclui sequências de nucleotídeos que fornecem funções de AAV deletadas de um vetor de AAV que é para ser utilizado para produzir um vetor de transdução para liberar uma sequência de nucleotídeos de interesse.

Os construtos auxiliares de AAV são normalmente utilizados para fornecer a expressão transitória de genes rep e/ou cap de AAV para complementar as funções de AAV ausentes que são necessárias para a replicação de AAV; entretanto, os construtos auxiliares carecem de ITRs de AAV e não podem replicar nem empacotar elas mesmas. Os construtos auxiliares de AAV podem estar na forma de um plasmídeo, fago, transposon, cosmídeo, vírus ou vírion. Foi descrito um número de construtos auxiliares de AAV, tais como os plasmídeos pAAV/Ad e p1M29+45 comumente utilizados que codificam ambos os produtos de expressão Rep e Cap. Veja, por exemplo, Samulski et al. (1989) J. Virol. 63: 3822-3828; e McCariy et al. (1991) J. Virol. 65 :2936-2945. Foram descritos vários outros vetores que codificam produtos de expressão Rep e/ou Cap. Ver, por exemplo, Pat. 5.139.941 e 6.376.237

[00119] Em outra modalidade, a expressão "transfecção" é utilizada para se referir a incorporação de DNA estranho por uma célula e uma célula foi "transfectada" quando o DNA exógeno foi introduzido dentro da membrana celular. Várias técnicas de transfecção são geralmente conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Graham et al. (1973) Virology, 52: 456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier e Chu et al. (1981) Gene 13: 197. Tais técnicas podem ser utilizadas para introduzir uma ou mais porções de DNA exógeno em células hospedeiras adequadas.

[00120] Como usada aqui, a expressão "linhagem celular" se refere a uma população de células capazes de crescimento e divisão contínuos ou prolongados in vitro. É ainda conhecido na técnica que alterações espontâneas ou induzidas podem ocorrer no cariótipo durante o armazenamento ou transferência de tais populações clonais. Portanto, as células derivadas da linhagem celular referida podem não ser precisamente idênticas às células ou culturas ancestrais, e a

linhagem celular referida inclui tais variantes. Em algumas modalidades, as expressões "células HEK293", "células 293" ou os seus equivalentes gramaticais são aqui utilizados indistintamente e referem-se à linhagem celular hospedeira/acondicionadora utilizada nos métodos aqui divulgados.

[00121] Em algumas modalidades, a expressão "eluente" pode ser entendida, no contexto, se referir ao tampão utilizado para eluir uma substância. Em algumas modalidades, a expressão "eluente" pode ser entendida, no contexto, para se referir à substância eluída, por exemplo, o produto ou substância desejado de uma etapa de purificação anterior, por exemplo, para ensaio ou purificação adicional.

[00122] Em algumas modalidades, os métodos aqui descritos são realizados utilizando boas práticas de fabricação (GMP) e em escala industrial. GMPs são práticas regulatórias, por exemplo, aquelas aplicadas pela Federal Drug Agency (FDA), para garantir a qualidade farmacêutica. As regulamentações de GMP estabelecem controles para processos de fabricação. Exemplos de regulamentações de GMP atuais são publicados pelo FDA. Em algumas modalidades, os métodos descritos aqui empregam procedimentos de GMP para produzir vetores virais de AAV em escala industrial. Até o momento, a produção em escala industrial de vetores virais de AAV para terapia gênica tem sido um desafio devido a questões de escalabilidade. Assim, em algumas modalidades, os métodos aqui descritos forneceram uma vantagem ao produzir vetores virais de AAV, por exemplo, em células aderentes, em escala industrial e em níveis de pureza suficientes para administrar a um humano. A expressão "escala industrial" se refere a métodos de produção de vetor viral em células maiores que a escala laboratorial, por exemplo, escala comercial, por exemplo, onde o rendimento é maior que 5×10^{15} vg, ou mais do que 8×10^{15} vg ou mais do que 1×10^{16} vg por lote de fabricação.

PROCESSO A MONTANTE

[00123] Em algumas modalidades, um processo a montante é usado para produzir um intermediário derivado de um banco de células de trabalho, em que o processo a montante compreende as etapas de (a) cultivar as células, por exemplo, células aderentes, (b) transfectar as células cultivadas, por exemplo, as células aderentes, com três plasmídeos, (c) coletar as partículas virais expandidas das células após um período de cultura, por exemplo, por lise celular total, (d) purificar as partículas virais por filtração para remover quaisquer células intactas ou resíduos celulares, (e) submeter o eluente da etapa (d) a filtração de fluxo tangencial, e (f) opcionalmente congelar a preparação intermediária resultante de partículas virais purificadas. Em algumas modalidades, a preparação intermediária pode ser congelada. Em outras modalidades, a preparação intermediária não precisa ser congelada antes do processamento a jusante. Em algumas modalidades, o AAV preparado com o processo a montante aqui divulgado um AAV que codifica um shRNA que atinge SOD1, um AAV que compreende um polinucleotídeo que codifica MECP2, ou um AAV que compreende um polinucleotídeo que codifica SMN, como aqui descrito. Em algumas modalidades, o processo a montante é conduzido sob GMP e em escala industrial.

1. Transfecção e Cultura da Linhagem Celular

[00124] Em um aspecto, são aqui divulgados genomas de rAAV. Os genomas de rAAV compreendem uma ou mais ITRs de AAV que flanqueiam um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo (incluindo, mas não se limitando a, um polipeptídeo de SMN) ou que codifica siRNA, shRNA, antissenso e/ou miRNA é direcionado para proteínas mutadas ou sequências de controle dos seus genes. O polinucleotídeo está operativamente ligado a DNAs de controle transcricional, especificamente DNA promotor, DNA intensificador e DNA da

sequência de sinal de poliadenilação que são funcionais em células alvo para formar um cassete de genes. O cassete de gene também pode incluir sequências de íntron para facilitar o processamento de um transcrito de RNA quando expresso em células de mamífero.

[00125] Em algumas modalidades, o genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) codifica um fator trófico ou protetor para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, incluindo, mas não limitados a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e lesões do sistema nervoso incluindo traumatismo espinhal e traumatismo/lesão cerebral, acidente vascular cerebral e câncer cerebral. Exemplos não limitantes de fatores de crescimento conhecidos do sistema nervoso incluem fator de crescimento de nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5), neurotrofina-6 (NT-6), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator neurotrófico derivado da linhagem de células da glia (GDNF), a família do fator de crescimento de fibroblastos (por exemplo, FGF 1-15), fator inibidor de leucemia (LIF), certos membros da família do fator de crescimento semelhante à insulina (por exemplo, IGF-1), as neurturinas, persefina, as proteínas da morfogênese óssea (BMPs), as imunofilinas, fatores de crescimento da família do fator crescimento transformante (TGF), as neuregulinas, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), família do fator de crescimento endotelial vascular (por exemplo, VEGF 165), folistatina, Hif1, e outros. Também são geralmente contemplados os fatores de transcrição em dedo de zinco que regulam cada um dos fatores tróficos ou protetores aqui contemplados. Em outras modalidades, métodos para modular a função neuroimune são contemplados, incluindo, mas não limitados a inibição da ativação da microglia e astrogliia através de, por exemplo, inibição de NFkB ou NFkB para neuroproteção (ação dupla de NFkB e vias associadas em diferentes tipos de células) por siRNA,

shRNA, antissenso ou miRNA. Ainda em outras modalidades, o genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) codifica um inibidor apoptótico (por exemplo, bcl2, bclxL). O uso de rAAV (por exemplo, rAAV9) que codifica um fator trófico ou uma proteína moduladora de lesão da medula espinhal ou um supressor de um inibidor do crescimento do axônio (por exemplo, um supressor de Nogo [Oertle et al., The Journal of Neuroscience, 23(13):5393-5406 (2003)] também é contemplado para o tratamento de lesão da medula espinhal.

[00126] Para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos tais como a doença de Parkinson, o genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) codifica, em várias modalidades, dopa descarboxilase de ácido aromático (AADC), tirosina hidroxilase, GTP-ciclo-hidrolase 1 (gtpchl), inibidores apoptóticos (por exemplo, bcl2, bc1xL), fator neurotrófico derivado da linhagem celular da glia (GDNF), neurotransmissor inibitório ácido amino butírico (GABA) ou enzimas envolvidas na biossíntese de dopamina. Em modalidades adicionais, o genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) pode codificar, por exemplo, modificadores de Parkina e/ou sinucleína.

[00127] Para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos tais como a doença de Alzheimer, em algumas modalidades, são contemplados métodos para aumentar a produção de acetilcolina. Em algumas modalidades, são contemplados métodos para aumentar o nível de uma colina acetiltransferase (ChAT) ou inibir a atividade de uma acetilcolinesterase (AChE).

[00128] O genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) codifica, em algumas modalidades, siRNA, shRNA, antissenso e/ou miRNA para uso em métodos para diminuir a expressão da proteína Huntington mutante (htt) para o tratamento de um distúrbio neurodegenerativo tal como a doença de Huntington.

[00129] O genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) codifica em várias

modalidades siRNA, shRNA, antissenso e/ou miRNA para uso no tratamento de distúrbios neurodegenerativos, tais como ALS. O tratamento resulta em uma diminuição na expressão de marcadores moleculares da doença, como o TNF- α óxido nítrico, peroxinitrito e/ou óxido nítrico sintase (NOS).

[00130] Em algumas modalidades, os vetores codificam RNAs curtos em forma de grampo (shRNAs) direcionados para proteínas mutadas, tais como superóxido dismutase (SOD, por exemplo, SOD-1) para ALS, ou fatores neurotróficos tais como GDNF ou IGF1 para ALS ou doença de Parkinson.

[00131] Em uma modalidade, os métodos e materiais aqui descritos podem ser utilizados para o tratamento de ALS. ALS é uma doença neurodegenerativa que resulta na perda progressiva de neurônios motores no cérebro e na medula espinhal, com sintomas que incluem a perda da capacidade de falar, comer, mover-se e, eventualmente, respirar. A doença normalmente resulta em morte dentro de 3 a 5 anos após o diagnóstico. Embora a causa de 90-95% das causas de ALS seja desconhecida, um subgrupo de ALS é causado por mutações genéticas no gene da superóxido dismutase 1 (SOD1), onde uma mutação causa um ganho de função tóxica dominante. Estudos em camundongo mostram que a eliminação de SOD1 não resulta na doença e, portanto, pensa-se que as terapias que reduzem os níveis de SOD1 mutante aliviam os sintomas da doença.

[00132] Em algumas modalidades, o vetor de AAV codifica um shRNA direcionado para SOD1 em ALS. Um AAV exemplificador, por exemplo, scAAV9, construto que codifica shRNA para SOD1 é fornecido no WO2015031392 e US2016272976, cujos conteúdos estão aqui incorporados em sua totalidade. Em algumas modalidades, um construto de AAV que codifica shRNA para SOD1 pode ser preparado utilizando os métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, estes

construtos de AAV podem ser utilizadas para tratar ALS. Em algumas modalidades, o SOD1 AAV apresenta menos de 10%, por exemplo, menos de 7%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de capsídeos vazios. Em algumas modalidades, o SOD1 AAV exibe baixas quantidades de proteína da célula hospedeira residual, DNA da célula hospedeira, DNA plasmídico e/ou endotoxina, por exemplo, níveis aqui discutidos para a preparação e purificação de vetores AAV. Como aqui utilizado, "AVXS-301" é um exemplo não limitante de um vetor de scAAV9, isto é, que compreende um polinucleotídeo (por exemplo pSOD1sh) que codifica um shRNA anti-SOD1 humana, uma ITR de AAV2 modificada, um promotor H1 humano, e uma ITR de AAV2 não modificada. As ITRs modificadas e não modificadas podem estar em qualquer orientação (isto é, 5' ou 3') em relação ao cassete de expressão de shRNA anti-SOD1 humana.

[00133] Como aqui utilizado, o plasmídeo do vetor "pSOD1sh" compreende um polinucleotídeo que codifica um RNA curto em forma de grampo (shRNA) que visa a expressão do gene da superóxido dismutase 1 (SOD1), isto é, um cassete de shRNA anti-SOD1, em que o cassete é flanqueado pelas sequências de repetição terminal invertidas (ITR) de vírus adenoassociados, por exemplo, "esquerda" e "direita" do polinucleotídeo que codifica pSOD1sh. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica pSOD1sh é transcrito em um RNA curto em forma de grampo que atinge especificamente o mRNA de SOD1 humana. Em algumas modalidades, as sequências de ITR que circundam o polinucleotídeo que codifica pSOD1sh são sequências de ITR de AAV nativas, variantes ou modificadas. Em algumas modalidades, pelo menos uma sequência de ITR é uma sequência ITR de AAV2 nativa, variante ou modificada. Em algumas modalidades, as ITR flanqueiam o polinucleotídeo que codifica pSOD1sh. Em algumas modalidades, as duas sequências ITR são sequências de ITR de AAV2

nativas, variantes ou modificadas. Em algumas modalidades, a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 modificada que permite a produção de genomas autocomplementares e a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 nativa. Em algumas modalidades, a ITR "direita" é uma sequência de ITR de AAV2 modificada que permite a produção de genomas autocomplementares e a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 nativa. Em algumas modalidades, o vetor pSOD1sh compreende ainda um segmento de promotor de RNA de H1 humano, por exemplo, como descrito por Myslinksi. Myslinksi et al. "An unusually compact external promoter for RNA Polymerase III transcription of the human H1RNA gene". *Nucleic Acids Research*, 29 (12): 2502-2509. Em algumas modalidades, o vetor de pSOD1sh compreende ainda uma sequência stuffer única feita a partir de segmentos de arcabouços de plasmídeos aleatórios para aumentar o tamanho do cassete de expressão. Em algumas modalidades, o vetor pSOD1sh compreende um polinucleotídeo que codifica o shRNA anti-SOD1 humana, uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de H1 humano e uma ITR de AAV2 não modificada.

[00134] Em uma modalidade, os métodos e materiais aqui descritos podem ser utilizados para o tratamento de distúrbios do desenvolvimento neurológico, tais como a síndrome de Rett. A síndrome de Rett é um distúrbio neurológico raro reconhecido pela primeira vez na infância, que resulta de mutações no gene MECP2 no cromossomo X em 90 a 95% dos casos. Ruthie et al., " Rett Syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2". "*Nature Genetics*, 23:185-188. Meninos que têm apenas uma cópia do cromossomo X geralmente morrem logo após o nascimento, enquanto que as meninas que têm duas cópias do cromossomo X geralmente têm uma cópia funcional do gene. Eles começam a desenvolver sintomas entre 6 e 18 meses, com sintomas marcantes como torcer a mão ou

apertar, aplaudir, esfregar, lavar ou movimentar a mão para a boca. A doença é progressiva, com incapacidade significativa que pode incluir comportamento semelhante ao autismo, irregularidades respiratórias, dificuldades de alimentação e deglutição, retardo de crescimento e convulsões. Existem 200 mutações conhecidas do gene de MECP2, e dependendo do nível de inativação de X e compensação de dosagem, a gravidade da doença varia muito de paciente para paciente. Estudos em camundongos mostram que a mutação de MECP2 não causa a morte de neurônios, sugerindo que não é um distúrbio neurodegenerativo. Guy et al "Reversal of Neurological Defects um a Mouse Model of Rett Syndrome". *Science*, 315 (5815) 1143-1147.

[00135] Para as modalidades relacionadas com a Síndrome de Rett, o genoma de rAAV (por exemplo, rAAV9) pode codificar, por exemplo, a proteína 2 de ligação a metil citosina (MeCP2). Um AAV exemplificador, por exemplo, scAAV9, um construto que compreende um polinucleotídeo que codifica a MeCP2, é fornecido na Patente US No. 9.415.121, cujo conteúdo está aqui incorporado na sua totalidade. Em algumas modalidades, um construto de AAV que compreende um polinucleotídeo que codifica MeCP2 pode ser preparado utilizando os métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, estes construtos de AAV podem ser usados para tratar a Síndrome de Rett. Em algumas modalidades, MeCP2 AAV exibe menos de 10%, por exemplo, menos de 7%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de capsídeos vazios. Em algumas modalidades, o MeCP2 AAV exibe baixas quantidades de proteína residual da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira, DNA do plasmídeo e/ou endotoxina, por exemplo, níveis aqui discutidos para a preparação e purificação de vetores de AAV.

[00136] Como usado aqui, "AVXS-201" é um exemplo não limitante de um vetor de scAAV9, isto é, que compreende um polinucleotídeo (por exemplo, pMECP2) que compreende um cassete de expressão de

DNAc de MECP2, uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de Mecn2 de murino, um íntron de SV40 modificado, um sinal de poliadenilação mínimo e uma ITR de AAV2 não modificada. As ITRs modificadas e não modificadas podem estar em qualquer orientação (isto é, 5' ou 3') em relação ao cassete de expressão de DNAc de MECP2.

[00137] Como usado aqui, o plasmídeo do vetor "pMECP2" compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2, uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de Mecn2 de murino, um íntron de SV40 modificado, um sinal de poliadenilação mínimo e uma ITR de AAV2 não modificada. Em algumas modalidades, pMECP2 é um construto de vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2, isto é, um cassete de expressão de DNAc de MECP2, em que o cassete é flanqueado por sequências de repetição terminal invertidas (ITR) de vírus adenoassociados, por exemplo, "esquerda" e "direita" do polinucleotídeo que codifica o gene de MECP2. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica MECP2 é uma sequência MECP2 humana, por exemplo, uma sequência MECP2 humana que ocorre naturalmente ou isoformas, variantes ou mutantes da mesma. Em algumas modalidades, as sequências de ITR são sequências de ITR de AAV nativas, variantes ou modificadas. Em algumas modalidades, pelo menos uma sequência ITR é uma sequência ITR de AAV2 nativa, variante ou modificada. Em algumas modalidades, as duas sequências ITR são sequências ITR de AAV2 nativas, variantes ou modificadas. Em algumas modalidades, a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 modificada que permite a produção de genomas autocomplementares e a ITR "direita" é uma sequência de ITR de AAV2 nativa. Em algumas modalidades, a ITR "direita" é uma sequência de ITR de AAV2 modificada que permite a produção de genomas autocomplementares, e a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 nativa. Em algumas modalidades, o vetor

pMECP2 compreende ainda um segmento, mas não todo o promotor *Mecp2* de camundongo. Em algumas modalidades, o vetor pMECP2 compreende ainda um íntron do Vírus 40 de Símio (SV40). Em algumas modalidades, o vetor pMECP2 compreende ainda um sinal de poliadenilação mínimo, por exemplo, conforme definido por Levitt et al., "Definition of an synthetic poly(A) site." *Genes & Development*, 3: 10.19-1025.

[00138] Em algumas modalidades, os genomas de rAAV aqui descritos não possuem DNA de rep e cap de AAV. O DNA de AAV nos genomas de rAAV (por exemplo, ITRs) pode ser de qualquer sorotipo de AAV para o qual pode ser um vírus recombinante pode ser derivado incluindo, mas não limitado aos sorotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AA-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 e AAV-11. As sequências de nucleotídeos dos genomas dos sorotipos de AAV são conhecidas na técnica. Por exemplo, o genoma completo de AAV-1 é fornecido no GenBank N° de Acesso NC_002077; o genoma completo de AAV-2 é fornecido em GenBank No. de Acesso NC 001401 e Srivastava et al., *Virol.*, 45: 555-564 (1983); o genoma completo de AAV-3 é fornecido no GenBank No. de Acesso NC_1829; o genoma completo de AAV-4 é fornecido no GenBank No. de Acesso NC 001829; o genoma do AAV-5 é fornecido no GenBank No. de Acesso AF085716; o genoma completo do AAV-6 é fornecido no GenBank N° de Acesso NC_00 1862; pelo menos porções dos genomas de AAV-7 e AAV-8 são fornecidas GenBank nos NOs. de Acesso AX753246 e AX753249, respectivamente; o genoma de AAV-9 é fornecido em Gao et al., *J. Virol*, 78: 6381-6388 (2004); o genoma de AAV-10 é fornecido em *Mol. Ther.*, 13 (1): 67-76 (2006); e o genoma de AAV-11 é fornecido em *Virology*, 330 (2): 375-383 (2004).

[00139] Como usado aqui, o plasmídeo do vetor "pSMN" compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN, isto é,

um cassete de expressão de cDNA de SMN, em que o cassete é flanqueado por sequências de repetição terminal invertidas (ITR) de vírus adenoassociados, por exemplo, "esquerda" e "direita" do polinucleotídeo que codifica o gene SMN. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica SMN é uma sequência de SMN humana, por exemplo, uma sequência de SMN humana que ocorre naturalmente ou suas isoformas, variantes ou mutantes. Em algumas modalidades, as sequências de ITR são sequências de ITR de AAV nativas, variantes ou modificadas. Em algumas modalidades, pelo menos uma sequência de ITR é uma sequência de ITR de AAV2 nativa, variante ou modificada. Em algumas modalidades, as duas sequências de ITR são sequências de ITR de AAV2 nativas, variantes ou modificadas. Em algumas modalidades, a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 modificada, que permite a produção de genomas autocomplementares e a ITR "direita" é uma sequência de ITR de AAV2 nativa. Em algumas modalidades, a ITR "direita" é uma sequência ITR de AAV2 modificada que permite a produção de genomas autocomplementares, e a ITR "esquerda" é uma sequência de ITR de AAV2 nativa. Em algumas modalidades, o plasmídeo pSMN compreende ainda um intensificador de CMV/ promotor de beta-actina de galinha ("CB"). Em algumas modalidades, o plasmídeo pSMN compreende ainda um íntron do Vírus 40 de Símio (SV40). Em algumas modalidades, o plasmídeo pSMN compreende ainda um sinal de terminação de poliadenilação (poli A) do hormônio do crescimento bovino (BGH). Sequências exemplificadoras que podem ser usadas para um ou mais dos componentes discutidos acima são mostradas na Tabela 1 abaixo. Em algumas modalidades, todas as sequências mostradas na Tabela 1 abaixo são usadas. Em algumas modalidades, "AVXS-101" é um exemplo não limitante de um constructo de vetor que usa todas as sequências na Tabela 1 e está dentro do escopo da expressão pSMN.

[00140] Em algumas modalidades, um vetor pSMN pode compreender um cassete de expressão de cDNA de SMN, uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada. As ITR modificadas e não modificadas podem estar em qualquer orientação (isto é, 5' ou 3') em relação ao cassete de expressão de cDNA de SMN.

[00141] Em algumas modalidades, por exemplo, durante os processos de fabricação aqui descritos, a sequência do construto do vetor é encapsidada, por exemplo, em vírions de AAV9. Nestas modalidades, a encapsidação é em um capsídeo de AAV9 recombinante, não replicante, capaz de liberar um transgene de função estável, por exemplo, um transgene *SMN* humano totalmente funcional, transgene de MECP2 ou anti-shRNA de SOD1. Em algumas modalidades, o capsídeo é composto por 60 proteínas virais (VP1, VP2, VP3), por exemplo, em uma proporção de 1:1:10 produzidas por junção alternativo, tal que VP2 e VP3 são duas formas truncadas de VP1, todas com sequências C-terminais comuns. Em algumas modalidades, o produto do processo de fabricação, e.g., um produto farmacêutico, pode compreender um capsídeo de AAV9 recombinante não replicante para liberar um transgene de *SMN* humano estável, totalmente funcional, um transgene de MECP2 ou um anti-shRNA de SOD1. Em algumas modalidades, o capsídeo é composto por 60 proteínas virais (VP1, VP2, VP3), por exemplo, em uma proporção de 1:1:10 produzidas por junção alternativa, tal que VP2 e VP3 são duas formas truncadas de VP1, todas com sequências C-terminais comuns.

[00142] Em algumas modalidades, a quantidade de vetores virais funcionais é determinada pelo % de vg/mL funcional, como medido usando um ensaio celular *in vitro* adequado ou modelo animal *in vivo*.

Por exemplo, o % de AAV SMN funcional pode ser ensaiado pela potência relativa que usa um modelo animal de SMA, por exemplo, um camundongo SMA Δ 7 ou um ensaio quantitativo baseado em células que usa uma linhagem celular adequada, por exemplo, células progenitoras neurais primárias (NPCs) isoladas do córtex de camundongos SMA Δ 7. O % de AAV MeCP2 funcional pode ser ensaiado utilizando um ensaio celular *in vitro* adequado ou modelo animal *in vivo*, por exemplo, um camundongo knockout para *Mecp2*. O % de AAV SOD1 funcional pode ser ensaiado utilizando um ensaio celular *in vitro* adequado ou modelo animal *in vivo*, por exemplo, um camundongo mutante *SOD1*.

[00143] A sequência de DNA de um construto de vetor exemplificador, por exemplo, AVXS-101 está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Componente Resumido da Sequência de DNA do Construto de Vetor AVXS-101 (todas as posições de início e parada de nt estão em relação a SEQ ID NO:1).

	Posição Inicial	Posição de Parada	Tamanho (nt)	Descrição	Descrição não limitante de benefícios em potencial
ITR de AAV2 Mutada "Esquerda"	1	106	106	Modificação para a ITR "esquerda" pela deleção do sítio de resolução terminal para permitir a formação de grampo do genoma	Sem estar limitado pela teoria, esta ITR mutada pode permitir uma segunda geração de vetor autocomplementar para maximizar a potência do vetor permitindo menores doses sistêmicas
Intensificador de CMV / Promotor de CB	153	432	280	Porção do intensificador imediato/ precoce de CMV	Sem estar limitado pela teoria, isso pode permitir o alto nível de expressão constitutiva de SMN
	439	704	266	promotor nuclear CB	
Íntron de SV40	774	870	97	Íntron de SV40 (para intensificar o acúmulo do nível estável de	Sem estar limitado pela teoria, isso pode permitir o alto nível de

	Posição Inicial	Posição de Parada	Tamanho (nt)	Descrição	Descrição não limitante de benefícios em potencial
				mRNA para tradução)	expressão de gene
cDNA de SMN Humano	1003	1887	885	Modificado a partir do Genbank Acesso #NM_017411	Sem estar limitado pela teoria, isso pode permitir a expressão de uma proteína SMN de extensão completa
Sinal de Terminação de Poli A de BGH	1973	2204	232	Sinal Poli A de BGH	Sem estar limitado pela teoria, isso pode fornecer um Poly A do mRNA de SMN (sinal de terminação da transcrição) para expressão de gene eficiente, de alto nível
ITR de AAV2 "Direita"	2217	2359	143	ITR de AAV2 não modificada	Sem estar limitado pela teoria, esta ITR de AAV2 em <i>cis</i> pode fornecer ambas, a replicação do DNA viral e o empacotamento do genoma do vetor de AAV

[00144] Em outro aspecto, a sequência de DNA do construto de vetor AVXS-101 é fornecida na SEQ ID NO: 1:

```

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 50
ggcgaccttt ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg 100
gagtgaatt cacgcgtgga tctgaattca attcacgcgt ggtacctctg 150
gtcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgccaacga 200
ccccgcccc ttgacgtcaa taatgacgta tgtcccata gtaacgcaa 250
tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc 300
cactggcag tacatcaagt giatcatatg ccaagtacgc ccctattga 350
cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct 400
tatgggactt tcctacttgg cagtacatct actcgaggcc acgttctgct 450

```

tcactctccc catctccccc ccctcccccac ccccaatttt gtatttattt 500
atttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcggggggggg ggggggggcg 550
cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga 600
gaggtgcggc ggcagccaat cagagcgggc cgctccgaaa gtttcctttt 650
atggcgaggc ggcggcgggc gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg 700
ggcgggagcg ggatcagcca ccgcggtggc ggccctagagt cgacgaggaa 750
ctgaaaaacc agaaagttaa ctggtaagtt tagtcttttt gtcttttatt 800
tcaggtcccg gatccggtgg tggtgcaaat caaagaactg ctccctcagt 850
gatgtgcct ttacttctag gccgtacgg aagtgttact tctgctctaa 900
aagctgcgga attgtacccg cggccgatcc accggtccgg aattcccggg 950
atatcgtga cccacgcgtc cgggccccac gctgcgcacc cgcggggttg 1000
ctatggcgat gagcagcggc ggcagtgggt gcggcgctcc ggagcaggag 1050
gattccgtgc tgttccggcg cggcacaggc cagagcgatg attctgacat 1100
ttgggatgat acagcactga taaaagcata tgataaagct gtggcttcat 1150
ttaagcatgc tctaaagaat ggtgacattt gtgaaacttc gggtaaacca 1200
aaaaccacac ctaaaagaaa acctgctaag aagaataaaa gccaaaagaa 1250
gaatactgca gcttccttac aacagtggaa agttggggac aaatgttctg 1300
ccatttggtc agaagacggg tgcatttacc cagctacat tgcttcaatt 1350
gattttaaga gagaaacctg tgtgtgggt tacactggat atggaaatag 1400
agaggagcaa aatctgtccg atctacttt cccaatctgt gaagtagcta 1450
ataatataga acagaatgct caagagaatg aaaatgaaag ccaagtttca 1500
acagatgaaa gtgagaactc caggtctcct ggaaataaat cagataacat 1550
caagcccaaa tctgctccat ggaactcttt tctccctcca ccacccccca 1600
tgccagggcc aagactggga ccaggaaagc caggtctaaa attcaatggc 1650
ccaccaccgc caccgccacc accaccacc cacttactat catgctggct 1700
gcctccattt ccttctggac caccaataat tccccacca cctcccatat 1750
gtccagattc tcttgatgat gctgatgctt tgggaagtat gttaatttca 1800
tggtagatga gtggctatca tactggctat tatatgggtt ttagacaaaa 1850
tcaaaaagaa ggaagggtgct cacattcctt aaattaagga gaaatgctgg 1900
catagagcag cactaaatga caccactaaa gaaacgatca gacagatcta 1950

gaaagcttat cgataccgtc gactagagct cgctgatcag cctcgactgt 2000
gccttctagt tgccagccat ctgtgtttg cccctcccc gtgccttct 2050
tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa 2100
attgcatgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggg 2150
ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgtg 2200
gggagagatc gatctgagga acccctagt atggagtgg ccactccctc 2250
tctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgccccgac 2300
gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag 2350
ggagtggcc 2359 (SEQ ID NO: 1).

[00145] Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos da proteína SMN codificada pelo plasmídeo pSMN compreende:

MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDDSDIWDDTALIKAYDKA
VASFKHALKNGDICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQW
KVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETCVVVYTYGYNREEQNLS
LLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPKS
APWNSFLPPPPMPGPRLLGPGKPLKFNGPPPPPPPPHLLSCWL
PPFSGPPIPPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGYMGMF
RQNQKEGRCSHSLN (SEQ ID NO: 2).

[00146] Em algumas modalidades, as proteínas VP1, VP2, VP3 do capsídeo de AAV são derivadas do mesmo transcrito. Estes têm sítios de partida alternativos, mas compartilham uma terminação carboxi. Abaixo, as sequências de aminoácidos específicos de VP1 são mostradas em preto e estão em negrito. Sequências de aminoácidos comuns a VP1 e VP2 estão sublinhadas e em *italico*. Aminoácidos comuns a todas as três proteínas do capsídeo estão em negrito e em *italico*.

1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD
NARGLVLPGY KYLGPGNGLD
61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF
QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ

121 **AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP** GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG
KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE
 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS **LT**MASGGGAP VADNNEGADG
VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI
 241 **TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP**
WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR
 301 **LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS**
TVQVFTDSDY QLPYVLGSAH
 361 **EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF**
PSQMLRTGNN FQFSYEFENV
 421 **PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYYLSKT INSGGQNQQT**
LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP
 481 **GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP**
GPAMASHKEG EDRFFPLSGS
 541 **LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYGQV**
ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG
 601 **ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM**
KHPPPQILIK NTPVPADPPT
 661 **AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ**
YTSNYYKSNN VEFVNTEGV
 721 ***YSEPRPIGTR YLTRNL*** (SEQ ID NO: 3).

[00147] Em uma modalidade, as proteínas do capsídeo de AAV são derivadas de um transcrito que codifica a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 3.

[00148] Em outro aspecto, são aqui descritos plasmídeos de DNA que compreendem genomas de rAAV. Os plasmídeos de DNA são transferidos para células que permitem a infecção por um vírus auxiliar de AAV (por exemplo, adenovírus, adenovírus com E1 deletado ou herpesvírus) para montagem do genoma de rAAV em partículas virais infecciosas com proteínas do capsídeo de AAV9. As técnicas para

produzir partículas de rAAV, nas quais um genoma de AAV a ser envelopado, genes rep e cap e funções de vírus auxiliares são fornecidas a uma célula, são padronizadas na técnica. Em algumas modalidades, a produção de rAAV envolve os seguintes componentes presentes dentro de uma única célula (denotada aqui como uma célula de empacotamento): um genoma de rAAV, genes rep e cap de AAV separados do genoma rAAV (isto é, fora do) e funções do vírus auxiliar. A produção de rAAV pseudotipado está descrita, por exemplo, no documento WO 01/83692 que está aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em várias modalidades, as proteínas do capsídeo de AAV podem ser modificadas para intensificar a distribuição do vetor recombinante. Modificações para as proteínas do capsídeo são geralmente conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, US 2005/0053922 e US 2009/0202490, cujas descrições estão incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

[00149] Os princípios gerais da produção de rAAV estão revisados em, por exemplo, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; and Muzyczka, 1992, *CUM Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129). Várias abordagens estão descritas em Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hennonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988); e Lebkowski et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); Patente US No. 5.173.414; WO 95/13365 e Patente US No. 5.658.776 correspondente; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; Patente US No. 5.786.211; Patente US No. 5.871.982; e

Patente US No. 6.258.595. Os documentos acima estão aqui incorporados por referência em sua totalidade, com ênfase particular naquelas seções dos documentos que se referem a produção de AAV.

[00150] Um método exemplificador de gerar uma célula de empacotamento é criar uma linhagem celular que expresse estavelmente todos os componentes necessários para a produção de partículas de AAV. Por exemplo, um plasmídeo (ou múltiplos plasmídeos) que compreende um genoma de rAAV sem os genes rep e cap de AAV, genes rep e cap de AAV separados do genoma de rAAV e um marcador selecionável, tal como um gene de resistência a neomicina, estão integrados no genoma de rAAV. Genomas de AAV foram introduzidos em plasmídeos bacterianos por procedimentos tais como cauda de CG (Samulski et al, 1982, Proc. Natl. Acad. S6 USA, 79: 2077-2081), adição de ligantes sintéticos que contêm sítios de clivagem de endonucleases de restrição (Laughlin et al., 1983, Gene, 23: 65-73) ou por ligação direta, de extremidades cegas (Senapathy & Carter, 1984, J Biol. Chem. 259: 4661-4666). A linhagem celular de empacotamento é então infectada com um vírus auxiliar tal como adenovírus. As vantagens deste método são que as células são selecionáveis e são adequadas para produção de rAAV em grande escala. Outros exemplos de métodos adequados utilizam adenovírus ou baculovírus em vez de plasmídeos para introduzir genomas de rAAV e/ou genes rep e cap em células de empacotamento.

[00151] A descrição aqui apresentada fornece, em várias modalidades, células de empacotamento que produzem rAAV infeccioso. Células de empacotamento podem ser células não aderentes cultivadas em suspensão ou células aderentes. Em uma modalidade, pode ser utilizada qualquer linhagem celular de empacotamento adequada, tal como células HeLa, células HEK 293 e células PerC.6 (uma linhagem cognata 293). Em uma modalidade, a

linhagem celular é de células HEK 293.

[00152] Para aumentar o rendimento de produção do vetor viral, as células aderentes podem ser cultivadas e selecionadas para melhor aderência aos frascos de cultura. Em algumas modalidades, melhora a eficiência da transfecção e contagem de células durante as etapas subsequentes de semeadura do biorreator. Durante a subcultura, as células podem ser destacadas da superfície da cultura celular por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, as células podem ser levantadas por raspagem ou por incubação em uma solução que compreende proteases. Em uma modalidade exemplificadora, as células HEK293 podem ser lavadas com PBS e dissociadas com tripsina durante ~ 2 minutos em temperatura ambiente. A dissociação pode ser parada adicionando meio de crescimento contendo soro, e os aglomerados de células podem ser dissociados por pipetagem repetida da suspensão. A suspensão celular pode então ser peletizada e o pélete isolado pode ser re-suspenso em um meio de crescimento completo adequado. As células podem então ser semeadas em novas câmaras de cultura celular e deixadas aderir. As células que não aderem à superfície após um período de tempo podem ser removidas por aspiração cuidadosa com meio de cultura de células, antes do meio de cultura de células ter sido completamente substituído por meio de crescimento. Em algumas modalidades, o período de tempo em que a célula é deixada aderir pode ser de cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas ou cerca de 7 horas. Quando as células tiverem se expandido, o processo pode ser repetido para aumentar a fração de células que aderem fortemente aos frascos de cultura. Em algumas modalidades, o processo é repetido pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, ou qualquer número de vezes adequado. Em uma modalidade exemplificadora, as células HEK293 são semeadas em frasco de 75

cm², deixadas a aderir durante 4 horas na incubadora a 37°C antes que as células fracamente aderentes serem removidas por aspiração e substituir o meio de cultura celular. Em uma modalidade exemplificadora, o processo de seleção de células fortemente aderentes é repetido em três passagens de cultura celular.

[00153] Em outras modalidades, o rAAV9 (isto é, partículas de rAAV9 encapsidadas infecciosas) compreende um genoma de rAAV aqui descrito. Em um aspecto, o genoma do rAAV é um genoma autocomplementar.

[00154] Em outro aspecto, são fornecidos rAAV tais como rAAV9, denominado "rAAV SMN". Em algumas modalidades, o genoma de rAAV SMN tem na sequência a primeira ITR de AAV2, o promotor de β -actina de galinha com um intensificador de citomegalovírus, um íntron de SV40, um polinucleotídeo que codifica SMN, uma sequência de sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino e uma segunda ITR de AAV2. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica SMN é um gene de SMN humano, por exemplo, descrito ou derivado do GenBank Número de Acesso MN_000344.2, GenBank Número de Acesso MN_017411 ou qualquer outra isoforma de SMN humana adequada. Uma sequência exemplificadora de SMN compreende uma sequência de

```

1  CCACAAATGT GGGAGGGCGA TAACCACTCG TAGAAAGCGT
   GAGAAGTTAC TACAAGCGGT
61  CCTCCCGGCC ACCGTACTGT TCCGCTCCCA GAAGCCCCGG
   GCGGCGGAAG TCGTCACTCT
121 TAAGAAGGGA CGGGGCCCCA CGCTGCGCAC CCGCGGGTTT
   GCTATGGCGA TGAGCAGCGG
181 CGGCAGTGGT GGCGGCGTCC CGGAGCAGGA GGATTCCGTG
   CTGTTCCGGC GCGGCACAGG
241 CCAGAGCGAT GATTCTGACA TTTGGGATGA TACAGCACTG
   ATAAAAGCAT ATGATAAAGC
301 TGTGGCTTCA TTTAAGCATG CTCTAAAGAA TGGTGACATT
   TGTGAAACTT CGGGTAAACC
361 AAAAACCACA CCTAAAAGAA AACCTGCTAA GAAGAATAAA
   AGCCAAAAGA AGAATACTGC

```

421 AGCTTCCTTA CAACAGTGGG AAGTTGGGGA CAAATGTTCT
 GCCATTTGGT CAGAAGACGG
 481 TTGCATTTAC CCAGCTACCA TTGCTTCAAT TGATTTTAAG
 AGAGAAACCT GTGTTGTGGT
 541 TTACACTGGA TATGGAAATA GAGAGGAGCA AAATCTGTCC
 GATCTACTTT CCCCAATCTG
 601 TGAAGTAGCT AATAATATAG AACAGAATGC TCAAGAGAAT
 GAAAATGAAA GCCAAGTTTC
 661 AACAGATGAA AGTGAGAACT CCAGGTCTCC TGGAAATAAA
 TCAGATAACA TCAAGCCCAA
 721 ATCTGCTCCA TGGAACTCTT TTCTCCCTCC ACCACCCCCC
 ATGCCAGGGC CAAGACTGGG
 781 ACCAGGAAAG CCAGGTCTAA AATTCAATGG CCCACCACCG
 CCACCGCCAC CACCACCACC
 841 CCACTTACTA TCATGCTGGC TGCCTCCATT TCCTTCTGGA
 CCACCAATAA TTCCCCCACC
 901 ACCTCCCATTA TGTCCAGATT CTCTTGATGA TGCTGATGCT
 TTGGGAAGTA TGTTAATTTT
 961 ATGGTACATG AGTGGCTATC ATACTGGCTA TTATATGGGT
 TTCAGACAAA ATCAAAAAGA
 1021 AGGAAGGTGC TCACATTCCT TAAATTAAGG AGAAATGCTG
 GCATAGAGCA GCACTAAATG
 1081 ACACCACTAA AGAAACGATC AGACAGATCT GGAATGTGAA
 GCGTTATAGA AGATAACTGG
 1141 CCTCATTCT TCAAAATATC AAGTGTTGGG AAAGAAAAAA
 GGAAGTGGAA TGGGTAATC
 1201 TTCTTGATTA AAAGTTATGT AATAACCAA TGCAATGTGA
 AATATTTTAC TGGACTCTTT
 1261 TGAAAAACCA TCTGTAAAAG ACTGGGGTGG GGGTGGGAGG
 CCAGCACGGT GGTGAGGCAG
 1321 TTGAGAAAAT TTGAATGTGG ATTAGATTTT GAATGATATT
 GGATAATTAT TGGTAATTTT
 1381 ATGGCCTGTG AGAAGGGTGT TGTAGTTTAT AAAAGACTGT
 CTTAATTTGC ATACTTAAGC
 1441 ATTTAGGAAT GAAGTGTTAG AGTGTCTTAA AATGTTTCAA
 ATGGTTTAAC AAAATGTATG
 1501 TGAGGCGTAT GTGGCAAAAT GTTACAGAAT CTAAGTGGTG
 GACATGGCTG TTCATTGTAC
 1561 TGTTTTTTTC TATCTTCTAT ATGTTTAAAA GTATATAATA
 AAAATATTTA ATTTTTTTTT
 1621 A (SEQ ID NO: 4).

[00155] As substituições de nucleotídeos conservativas de DNA de SMN são também contempladas (por exemplo, uma mudança de guanina para adenina na posição 625 do Número de Acesso do

GenBank NM_000344.2). Em algumas modalidades, o genoma não possui o DNA de rep e cap de AAV, isto é, não há DNA de rep ou cap entre as ITRs do genoma. Os polipeptídeos de SMN contemplados incluem, mas não estão limitados ao polipeptídeo de SMN1 humano descrito no banco de dados de proteína NCBI número NP_000335.1. Em modalidades, o DNA de SMN compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de SMN humano (por exemplo, a proteína SMN humana identificada pelo número de acesso Uniprot Q16637, isoforma 1 (Q16637-1)). Está também contemplado o polipeptídeo modificador de SMN1 plastina-3 (PLS3) [Oprea et al., Science 320 (5875): 524-527 (2008)]. Sequências que codificam outros polipeptídeos podem ser substituídas pelo DNA de SMN.

[00156] Antes da transfecção, as células são expandidas em meios de cultura adequados, em frascos ou um biorreator adequado ou ambos. Em algumas modalidades, as células podem ser expandidas em biorreatores que fornecem uma circulação contínua de meios de cultura de células. Em uma modalidade, as células são expandidas em biorreatores iCELLis de 200 m², 333 m² ou 500 m². Um meio de cultura é DMEM com FBS 5 a 10%, glicose 4,5 g/l, L-glutamina 4 mM. Em algumas modalidades, as células aderentes são adicionadas aos meios em uma bolsa de meios de recirculação e circuladas através do biorreator. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular ou qualquer outro meio é continuamente circulado novamente através do biorreator utilizando uma bomba peristáltica. As células podem ser semeadas em uma densidade adequada nos frascos ou biorreatores para cultura e transfecção. A densidade da semeadura pode depender do tipo de célula e da quantidade de tempo até transfecção. Em algumas modalidades, as células são semeadas em cerca de 8000 a 16000 células/cm². Em uma modalidade, as células HEK293 são semeadas a 8000 a 12.000 células/cm².

[00157] Métodos adequados para a transdução e reintrodução de células transduzidas em um indivíduo são conhecidos na técnica. Em uma modalidade, as células podem ser transduzidas in vitro pela combinação de rAAV com as células, por exemplo, em meio apropriado e selecionando aquelas células que abrigam o DNA de interesse utilizando técnicas convencionais, tais como Southern blots e/ou PGR ou utilizando marcadores selecionáveis.

[00158] Em algumas modalidades, uma linhagem celular de empacotamento é transfectada com três plasmídeos: um plasmídeo que codifica ou compreende a sequência do vetor a ser empacotado dentro do vetor de AAV (por exemplo, pSMN, transgene pMECP2 ou pSOD1sh), pHELP e pAAV2/9. A transfecção pode ser realizada usando qualquer uma das técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitadas a eletroporação, lipofecção, por exemplo, com uma lipofectamina, polímeros catiônicos e lipídios catiônicos. Qualquer meio de transfecção adequado pode ser usado. Em uma modalidade do processo de transfecção, células aderentes de rim embrionário humano (HEK293) são transfectadas com uma coprecipitação de plasmídeo triplo de DNA polietilenoimina (PEI). Em uma modalidade, um vetor scAAV9.CB.SMN (um vetor AAV9 autocomplementar que compreende um promotor CB e um polinucleotídeo que codifica SMN) é produzido usando transfecção com um plasmídeo triplo de DNA tripla em células HEK293 aderentes usando uma co-precipitação com PEI em um biorreator de células aderentes de grande escala. Em uma modalidade, o meio de crescimento DMEM usado para a expansão celular é substituído por um meio de transfecção DMEM modificado. Este meio é formulado sem cálcio e L-glutamina. Em uma modalidade, o meio de transfecção é DMEM sem FBS, sem cálcio, sem L-glutamina e 4,5 g/L de glicose. Em algumas modalidades, o meio de transfecção sem soro (por exemplo, sem FBS) melhora a eficácia da transfecção. Em uma modalidade, o

meio de transfecção é OptiMEM (Invitrogen/Thermo Fisher). Em uma modalidade, os três plasmídeos (pSMN, pHELP e pAAV2 / 9) são misturados junto com PEI em meio de transfecção e deixados reagir. Em algumas modalidades, os três plasmídeos são misturados juntos em uma proporção molar de cerca de 1: 1:1. Em algumas modalidades, os plasmídeos e PEI são misturados em uma proporção de 1:1 em peso de DNA:PEI. Em algumas modalidades, os plasmídeos e PEI são misturados em uma proporção menor do que 1:1 em peso de DNA: PEI. Em uma modalidade, pSMN, pHELP e p AAV 2/9 são misturados em uma proporção molar de 1:1:1 em meio OptiMEM. Em tal modalidade, PEI é adicionado tal que DNA: PEI seja 1:1 em peso. Em algumas modalidades, a reação ocorre durante 0 a 60 minutos, ou 10 a 45 minutos, ou 20 a 30 minutos. Em uma modalidade, a reação é deixada ocorrer durante 15 a 30 minutos.

[00159] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um método para fabricar um vetor viral baseado em AAV que compreende as etapas de (i) cultivar as células HEK293 aderentes em um biorreator de escala industrial, (2) transfectar as células aderentes com plasmídeos por menos de 60 minutos para permitir a produção do vetor de AAV e, opcionalmente, a aplicar de etapas adicionais de processamento, purificação, formulação e preenchimento para produzir um produto farmacêutico. Em uma modalidade deste processo, o vetor scAAV9.CB.SMN produzido utilizando a transfecção com plasmídeo de DNA triplo usando a co-precipitação com polietilenoimina ("PEI"). Em uma modalidade, os 3 plasmídeos utilizados para esta transfecção são pSMN, pAAV2/9 e pHELP.

[00160] A transfecção pode ser realizada pelo contato da linhagem celular de empacotamento com o coprecipitado de DNA-PEI. Em algumas modalidades, o coprecipitado de DNA-PEI no meio de transfecção é introduzido em uma bolsa de recirculação de meio. Em

algumas modalidades, o coprecipitado de DNA-PEI no meio de transfecção é circulado no biorreator e desloca completamente o meio de crescimento. Em algumas modalidades, o coprecipitado de DNA-PEI no meio de transfecção é deixado em contato com as células aderentes no biorreator. Em algumas modalidades, o coprecipitado de DNA-PEI no meio de transfecção é deixado em contato com as células aderentes no biorreator por até duas horas. Em algumas modalidades, a transfecção ocorre por uma a duas horas. Em algumas modalidades, a transfecção ocorre durante menos de uma hora, por exemplo, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos ou 50 minutos. Em algumas modalidades, a transfecção ocorre durante uma a duas horas. Em algumas modalidades, a transfecção é interrompida pela recirculação do meio de crescimento completo através do biorreator e deslocando completamente o meio de transfecção.

2. Coleta das Partículas Virais Expandidas

[00161] Após um período adequado de expansão celular pós-transfecção, em algumas modalidades, as células são lisadas e as partículas virais coletadas. Em algumas modalidades, as células são dissociadas do reator antes que o processo de lise celular ser iniciado. Em algumas modalidades, as células são lisadas in situ. Opcionalmente, as partículas virais são coletadas sem lise. Em algumas modalidades, é adicionada uma endonuclease, por exemplo, circulada no biorreator até uma concentração-alvo final. A endonuclease pode ser uma que degrade ambos DNA e RNA. Em uma modalidade, a endonuclease é uma endonuclease geneticamente manipulada de *Serratia marcescens* (Eaves, G.N. et al. J. Bact. 1963, 85, 273-278; Nestle, M. et al. J. Biol. Chem. 1969, 244, 5219-5225) que é comercializada sob o nome Benzonase® (EMD Millipore). A enzima é produzida e purificada a partir da cepa W3110 de *E. coli*, um mutante da cepa K12, que contém o plasmídeo de produção de pNUC1 (Patente U.S. No. 5.173.418, que

está aqui incorporada por referência na sua totalidade). Estruturalmente, a proteína é um dímero de 245 aminoácidos idênticos, cerca de 30 kDa de subunidades com duas ligações dissulfeto importantes. Benzonase® degrada todas as formas de DNA e RNA (de fita simples, fita dupla, linear e circular) e é eficaz em uma vasta gama de condições de operação, digerindo ácidos nucleicos em oligonucleotídeos terminados em 5'-monofosfato com 2-5 bases de extensão. Benzonase® é produzida sob boas práticas de fabricação atuais (cGMP) e, portanto, pode ser usada em processos de escala industrial para a purificação de proteínas e/ou partículas virais. Outras endonucleases que são produzidas sob condições de cGMP podem ser igualmente utilizadas nos métodos de purificação descritos neste pedido. Em uma modalidade, a benzonase é adicionada ao biorreator em uma concentração final entre 50 a 200 U/ml, por exemplo, 75 a 150 U/ml, por exemplo, cerca de 100 U/ml. Em algumas modalidades, a adição de Benzonase reduz significativamente o DNA da célula hospedeira, enquanto permite uma produção elevada de vg em um biorreator.

[00162] Em algumas modalidades, a endonuclease é deixada misturar antes que o tampão de lise seja adicionado ao reator. Em algumas modalidades, a solução de lise celular é deixada misturar com as células aderentes por até 1 hora, até 2 horas, até 3 horas, até 4 horas ou até 5 horas. Em algumas modalidades, o tampão de lise pode compreender cloreto de magnésio e/ou Tween-20 em um tampão adequado. Em uma modalidade exemplificadora, o tampão de lise é HEPES 500 mM, Tween 20 a 10%, $MgCl_2$ 20 mM, pH 8,0. Uma Solução de Sal e Sacarose (SSS) que extingue a reação da Benzonase pode ser adicionada para parar a reação de lise. Em algumas modalidades, SSS é adicionada a uma bolsa de coleta que compreende o tampão de lavagem e misturada por 15 minutos. Em algumas modalidades, o

biorreator é lavado com um Tampão de Lavagem de Biorreator e a lavagem é então coletada na bolsa de coleta, juntamente com a solução de lise celular extinta e o conteúdo de lisado celular, que em conjunto compreendem a coleta a granel. Em algumas modalidades, o Tampão de Lavagem de Biorreator pode compreender Tris, MgCl_2 , NaCl, Tween-20 e sacarose. Em uma modalidade exemplificadora, o Tampão de Lavagem do Biorreator compreende Tris 20 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 1% p/v e sacarose 1% p/v em pH 8,1.

3. Purificação das Partículas Virais

[00163] Após a coleta, as partículas virais da coleta a granel podem ser concentradas e purificadas, tipicamente através de filtração. Em uma modalidade, as partículas virais são filtradas por filtração em profundidade seguida pela filtração através de um filtro que remove contaminantes de moléculas grandes e resíduos celulares, por exemplo, um filtro de 0,45 μm , mas que permite que os genomas virais passem através dele. Qualquer filtro de profundidade adequado pode ser usado.

[00164] Como entendido na técnica, a filtração em profundidade se refere ao uso de um meio filtrante poroso para clarificar soluções que contêm quantidades significativas de partículas grandes (por exemplo, células intactas ou resíduos celulares) em comparação com a filtração por membranas que ficariam rapidamente entupidadas sob tais condições. Uma variedade de meios de filtração de profundidade de tamanhos de poros variados está comercialmente disponível a partir de uma variedade de fabricantes, tais como Millipore, Pall, General Electric e Sartorius.

[00165] A taxa de fluxo pretendida para a filtração de profundidade pode ser reduzida para manter a pressão de entrada do filtro dentro do relatório. Uma vez que toda a coleta a granel tenha sido filtrada, o filtro de profundidade pode, em certas modalidades, ser rastreado com o tampão de diafiltração utilizado para uma primeira etapa subsequente

de filtração de fluxo tangencial ("TFF1"). O pool de filtros de profundidade é misturado. O pool de filtros de profundidade pode então ser filtrado através de um filtro de 0,45 µm para clarificar melhor o material de coleta a granel. O filtro de 0,45 µm é então rastreado com o tampão de TFF1.

4. Filtração de Fluxo Tangencial

[00166] Em várias modalidades, a filtração de fluxo tangencial é usada para concentrar a coleta a granel e remover sais e proteínas, por exemplo, utilizando Filtração de Fluxo Tangencial. Filtração de Fluxo Tangencial (TFF) também conhecida como Filtração de Fluxo Cruzado (CFF) é bem conhecida para aqueles versados na técnica e o equipamento e protocolos para a sua implementação em uma vasta gama de situações estão comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de fabricantes incluindo, mas não limitados a Pall Corporation, Port Washington, NY e Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA. Geralmente, a TFF pode envolver a recirculação do concentrado através da superfície da membrana. Esta alimentação cuidadosa de fluxo cruzado pode, em certas modalidades, minimizar a incrustação da membrana, manter uma taxa de filtração elevada e fornecer uma recuperação elevada do produto. Em uma modalidade, a etapa de TFF pode ser implementada com um sistema de folha plana, como aqui exemplificado. Os sistemas de folha plana podem ser utilizados em produção em grande escala, onde tais sistemas são fornecidos com um meio (por exemplo, um canal de fluxo aberto) para evitar forças de cisalhamento excessivas sobre as partículas virais. Alternativamente, a etapa de TFF pode ser implementada com um sistema de fibra oca, como aqui exemplificado. Em uma modalidade, o ponto de corte do peso molecular (MWCO) do sistema TFF está entre 200-400 kDa, por exemplo, cerca de 300 kDa.

[00167] Em uma modalidade, a etapa de TFF1 é realizada usando

um cassete de membrana de celulose regenerada com ponto de corte de 300 kDa MW. O cassete é lavado e higienizado com solução de NaOH e equilibrada com o tampão de TFF1. Em uma modalidade, o tampão de TFF1 compreende Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 500 mM, sacarose 1%, pH 8,1.

[00168] Em algumas modalidades, a fase de concentração da etapa de TFF1 é selecionada para reduzir o volume da coleta clarificada em aproximadamente 10x. Uma vez atingido o volume pretendido do retentado, as operações de diafiltração podem ser iniciadas. O retentado pode, em algumas modalidades, ser diafiltrado com cerca de 6 diavolumes de tampão de TFF1. Em algumas modalidades, o retentado é diafiltrado com cerca de 5 a 20, ou 10 a 15 ou 12 diavolumes de tampão de TFF1. Uma vez que 6 diavolumes de fluxo total de permeado tenham sido alcançados, o retentado pode ser novamente concentrado e coletado. Lavagens, por exemplo, duas lavagens sucessivas da membrana, podem ser realizadas para aumentar a recuperação do produto da substância intermediária do fármaco.

5. Produto Intermediário

[00169] Em algumas modalidades, a substância medicamentosa intermediária pode então ser congelada em gelo seco ou em um congelador e depois transferida para um armazenamento $\leq -60^{\circ}\text{C}$. Em outras modalidades, o produto intermediário não precisa ser congelado antes do processo a jusante.

[00170] Em algumas modalidades, múltiplos lotes da substância de produto intermediário são agrupados para o processamento adicional (por exemplo, para purificação por um processo a jusante, por exemplo, como aqui descrito). Os múltiplos lotes da substância de produto intermediário podem ser agrupados antes do congelamento e armazenamento. Em outras modalidades, os múltiplos lotes da substância de produto intermediário podem ser agrupados depois de

descongelar os lotes congelados e armazenados.

PROCESSO A JUSANTE

[00171] Em algumas modalidades, um processo a jusante é utilizado para processar o produto intermediário (por exemplo, o produto intermediário agrupado) em uma substância medicamentosa filtrada. Em algumas modalidades, as etapas do processo a jusante incluem: (a) acidificação e clarificação (por exemplo, usando filtração), (b) cromatografia de troca de cátion, (c) filtração de fluxo tangencial ("TFF2"), (d) ultracentrifugação com CsCl, e) coleta do vetor viral e (f) filtração de fluxo tangencial ("TFF3") adicional para produzir uma substância do fármaco filtrada em que as partículas de AAV purificadas são suspensas em um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o processo a jusante contém as seguintes etapas de fabricação subsequentes à produção do intermediário TFF1: descongelamento e mistura do intermediário de TFF1: descongelar e agrupar o intermediário de TFF1, acidificação e clarificação, cromatografia de troca iônica (CEX), filtração de fluxo tangencial (TFF2), ultracentrifugação com CsCl para Separação de Capsídeos Cheios/Vazios, filtração de fluxo tangencial (TFF3) para Concentração/Troca de Tampão, filtração do material agrupado de TFF3 para gerar substância de fármaco, diluição e filtração de substância de fármaco para produzir o fármaco, armazenamento do fármaco e preenchimento do fármaco em frascos.

[00172] Em algumas modalidades, o processo a jusante aqui descrito pode ser utilizado para processar um intermediário que compreende uma SMN de AAV, uma MECP2 de AAV ou um shRNA que codifica AAV que atinge SOD1 como aqui descrito.

1. Acidificação e Clarificação do Intermediário

[00173] Em modalidades nas quais o intermediário é congelado, o processo a jusante inicia pelo descongelamento do material

intermediário de TFF1. Um detergente, por exemplo, Tween 20, pode ser usado para promover a floculação do concentrado de proteínas da célula hospedeira e DNA sob pH ácido. O pH do intermediário de TFF1 que contém o detergente pode então ser diminuído. O floculado e precipitado formados quando o pH é diminuído pode ser removido pela filtração através de um filtro de profundidade e um filtro que remova contaminantes de molécula grande e resíduos celulares, por exemplo um filtro de 0,45 µm, mas que permite que os genomas vetoriais passem através dele. Qualquer filtro de profundidade adequado pode ser usado.

[00174] Em uma modalidade, o Tween 20 é adicionado lentamente à solução de intermediário de TFF1 para atingir a concentração final entre 10 a 20% de Tween 20. Em algumas modalidades, a composição alvo depois da adição de Tween 20 é uma solução de Tween 20 a 36% em Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 500 mM, sacarose 1%, pH 8,1. Em algumas modalidades, o Tween 20 é adicionado lentamente ao longo de intervalo de cerca de 1 a 6 horas. Em algumas modalidades, o Tween 20 é adicionado lentamente ao longo de 3 a 6 horas. Em algumas modalidades, o Tween 20 é adicionado lentamente ao longo de 4 horas. Em algumas modalidades, a solução de Tween 20/Intermediário de TFF1 é deixada incubar durante a noite à temperatura ambiente. Em algumas modalidades, a solução de Tween 20/Intermediário de TFF1 é deixada a incubar durante 8 a 20 horas em temperatura ambiente. Em uma modalidade exemplificadora, a solução de Tween 20/Intermediário de TFF1 é deixada a incubar durante 12 a 20 horas em temperatura ambiente.

[00175] Após a incubação, o pH do Tween 20 que contém o intermediário de TFF1 pode ser diminuído pela adição de qualquer ácido adequado. Em algumas modalidades, 1 M de glicina pH 2,5 é adicionada para atingir um pH alvo de 3,5 ± 0,1. Em algumas modalidades, o pH alvo é pH 3,0 a 4,0, cerca de pH 3,3 a 3,7, cerca de

pH 3,4 a 3,6, ou cerca de pH 3,5. Uma vez que o pH esteja dentro da faixa aceitável, a solução pode ser passada através de um filtro de qualquer tamanho. Em uma modalidade exemplificadora, um filtro de profundidade (por exemplo, Clarisolve POD) em linha com um filtro de 0,45 μm (por exemplo, filtro Opticap XL10 Durapore) ou um filtro PES de 0,8/0,45 μm é usado.

2. Cromatografia de Troca de Cátion

[00176] Em várias modalidades, é usada uma etapa de cromatografia de captura de troca de cátion (CEX), por exemplo, para separar os capsídeos virais das proteínas da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira, lipídeos da célula hospedeira, Tween 20 e outras impurezas relacionadas com o processo. Os princípios da cromatografia de troca de cátion são bem conhecidos na técnica, mas, resumidamente, este método baseia-se nas interações de carga-carga entre as partículas positivamente carregadas a serem isoladas e a resina negativamente carregada usada. Em geral, a coluna é primeiramente equilibrada correndo alguns diavolumes de tampão até que o pH e a condutividade se estabilizem. A amostra é então carregada e a coluna é lavada com um tampão de carregamento. Finalmente, um tampão de eluição é usado para eluir a amostra de interesse da coluna e as frações que contêm a amostra são coletadas. A presença da amostra de interesse pode ser detectada por medições de absorbância óptica do eluído.

[00177] Em uma modalidade, a etapa de CEX usa uma coluna de cromatografia CIMmultus S03-8000 Advanced Composite Column (Sulfonyl) (poros de 2 μm). Em uma modalidade, o pico de eluição é coletado começando em uma ascensão acentuada em OD280. OD280 começará a subir quando a condutividade estiver entre 80-85 mS/cm. O eluído de CEX pode ser coletado de acordo com procedimentos de rotina e pode ser coletado em duas frações. Em uma modalidade, a

primeira fração começa na ascensão acentuada em OD280 e é coletada para 1,5 volumes de coleta (CVs). Em outra modalidade, a segunda fração começa imediatamente após a primeira fração e é coletada para 1,0 CV. As duas frações são agrupadas e depois neutralizadas para pH $8,0 \pm 0,30$. Em uma modalidade, um Tampão de Neutralização compreende Tris 1,0 M pH $9,1 \pm 0,1$ a 20°C.

3. Filtração de Fluxo Tangencial 2

[00178] Em algumas modalidades, uma etapa de filtração de fluxo tangencial (TFF2) é usada para concentrar, remover impurezas proteicas e trocar o tampão por um tampão apropriado para a etapa subsequente de ultracentrifugação com CsCl. Qualquer membrana adequada de TFF pode ser usada. Em uma modalidade, a etapa de TFF2 usa membranas de celulose regenerada de 300 kD MWCO.

[00179] Em algumas modalidades, a fase de concentração desta etapa é projetada para reduzir o volume do eluído de CEX. Em uma modalidade, o retentado é diluído 2 vezes com um tampão de diafiltração e o retentado é concentrado até seu volume inicial. Em uma modalidade, o tampão de diafiltração é o tampão de diafiltração de TFF2 NaCl que contém Tris 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM, NaCl 150 mM, Poloxâmero 188 0,2%, Sacarose 1%, pH $8,1 \pm 0,1$ a 20°C. Em tais modalidades, este processo pode ser repetido até a diafiltração com o novo tampão estar completa. Em uma modalidade, o retentado é diluído 2 vezes com um tampão de diafiltração contendo CsCl e o retentado é concentrado até seu volume inicial. Em uma modalidade, o tampão de diafiltração que contém CsCl é o tampão de diafiltração TFF2 CsCl que contém Tris 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM, CsCl 3 M, Poloxâmero 188 0,2%, pH $8,1 \pm 0,1$ a 20°C. Em tais modalidades, este processo pode ser repetido até a diafiltração com o novo tampão estar completa. Uma vez completada a diafiltração com CsCl, o retentado pode então ser concentrado para um volume prescrito que é dependente do volume de retenção do sistema. Em

algumas modalidades, a lavagem, por exemplo, duas lavagens sucessivas da membrana, é executada para maximizar a recuperação do produto a partir do sistema de TFF2.

4. Ultracentrifugação com CsCl

[00180] Em algumas modalidades em que um AAV é usado para transdução de gene in vivo, o produto final de rAAV pode conter impurezas mínimas e partículas vazias. Dois métodos para purificar o vetor de AAV são a ultracentrifugação usando um gradiente de iodixanol ou um gradiente de CsCl. Um estudo comparando os dois métodos demonstrou que o iodixanol produziu vetores de AAV com maior pureza de vetor, mas teve mais capsídeos virais vazios em comparação com CsCl. Strobel et al. "Comparative Analysis of Cesium Chloride- and Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications". Human Gene Therapy Methods, 26 (4): 147-157. Embora o uso de CsCl leve a quantidades menores de capsídeos virais vazios, CsCl pode ser tóxico para as células e múltiplas etapas de purificação podem ser necessárias para remover o CsCl residual, levando a um longo tempo de processamento (~ 3,5 dias) comparado com métodos mais curtos como iodixanol (~ 1 dia). Um estudo diferente mostrou que as várias etapas para remover o CsCl residual frequentemente resultam na perda dramática de rAAV, levando a rendimentos e taxa de recuperação baixos, muitas vezes negando os outros benefícios do método. Hermens et al. "Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus by Iodixanol Gradient Ultracentrifugation Allows Rapid and Reproducible Preparation of Vector Stocks for Gene Transfer in the Nervous System." Human Gene Therapy, 10:1885-1891. Além disso, embora esses dois métodos funcionem bem em um laboratório para a produção de amostras pré-clínicas, eles não são escalonáveis e, portanto, não são adequados para a produção em grande escala de produtos comerciais. Veja, por

exemplo, Tomono et al., "Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1)." *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3:15058 ("purification methods using cesium chloride (CsCl) or iodixanol density ultracentrifugation are not suitable for large-scale production").

[00181] Em algumas modalidades, é usada uma etapa de ultracentrifugação, por exemplo, para separar capsídeos vazios de capsídeos cheios. Inesperadamente, o método de ultracentrifugação com CsCl aqui descrito foi escalonável e adequado para produção em larga escala de vetores de AAV purificados. A ultracentrifugação pode ser realizada pela ultracentrifugação analítica e pode envolver o uso de tampões de gradiente. Exemplos de tampões de gradiente incluem, mas não se limitam a CsCl, sacarose, iodixanol e outros conhecidos na técnica. A centrifugação pode ser realizada em qualquer centrífuga capaz de atingir as forças g desejadas, por exemplo, um sistema de Optima XPN 100 Ultra Centrifuge automatizado ou sistema equivalente equipado com rotor Type 50.2 Ti ou rotor equivalente. Após a ultracentrifugação, os capsídeos vazios e os capsídeos cheios se separam em diferentes bandas dentro do tubo e podem ser extraídos retirando o material de uma faixa específica. Em algumas modalidades, o material filtrado purificado de TFF2 é centrifugado a 241.600-302.000 g (~40.000-50.000 rpm em rotor 50.2 Ti). Em algumas modalidades, o material filtrado purificado por TFF2 é centrifugado durante a noite. Em algumas modalidades, o material filtrado purificado por TFF2 é centrifugado durante 16 a 24 horas. Em algumas modalidades, o material filtrado purificado por TFF2 é centrifugado durante 20 a 24 horas. Em algumas modalidades, o material filtrado purificado por TFF2 é centrifugado a 15-25°C. Em uma modalidade, o material filtrado purificado por TFF2 é centrifugado a 302.000 g (50.000 rpm em rotor

50.2 Ti) durante 17 horas a 20°C. Em algumas modalidades, o tampão para a centrifugação de CsCl pode ter um ou mais dos seguintes ingredientes, compreendendo (a) CsCl, que compreende ainda um ou mais de (b) MgCl₂, (c) Poloxâmero 188 e (d) Tris. Em algumas modalidades, o tampão para CsCl pode incluir todos de (a), (b), (c) e (d). Em algumas modalidades, o tampão para CsCl tem um pH de 7,5-8,5 ou pH 7,9-8,2. Em uma modalidade, um tampão adequado para a centrifugação de CsCl é Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, CsCl 3 M, Poloxâmero 188 0,2%, pH 8,1 ± 0,10. Após a conclusão da etapa de centrifugação, os tubos podem ser removidos da ultracentrífuga. Em algumas modalidades, a banda mais alta, Banda A, contém os capsídeos vazios. Em algumas modalidades, as bandas próximas mais altas, as bandas B, C e D, contêm as bandas de dubleto do capsídeo cheio. Em algumas modalidades, os vetores virais de AAV são coletados usando uma seringa. Em uma modalidade, as bandas B, C e D são removidas por uma agulha 18G ligada a uma seringa de 30 mL inserida logo abaixo da banda D para meio do tubo. Em outras modalidades, as bandas podem ser ensaiadas quanto a presença de capsídeo cheio ou vazio usando técnicas conhecidas e/ou como aqui descrito, e as bandas contendo capsídeo cheio recolhidas.

[00182] A proporção entre capsídeos virais vazios e não vazios pode ser medida por técnicas laboratoriais padronizadas. Em algumas modalidades, a medição é feita por medidas de absorbância óptica. Em algumas modalidades, a medição é feita por medidas de absorbância de UV. Em algumas modalidades, a quantidade total de proteínas do capsídeo e a quantidade total de DNA pode ser determinada a partir de medições de absorbância de UV. Em algumas modalidades, a medição é feita por medidas do índice de refração óptica. Em algumas outras modalidades, a medição é feita por ultracentrifugação analítica.

[00183] Em uma modalidade, o vetor viral de AAV coletado após a

ultracentrifugação tem menos de 8% de capsídeos vazios, menos de 7% de capsídeos vazios, menos de 5%, menos de 3% ou menos de 1%. Em uma modalidade, o vetor viral de AAV coletado após a ultracentrifugação tem 1 a 10% de capsídeos vazios. Em uma modalidade, o vetor viral de AAV coletado após a ultracentrifugação tem 2 a 8% de capsídeos vazios. Em uma modalidade, o número de capsídeos vazios está abaixo do limite de detecção. Em outra modalidade, o percentual de capsídeos vazios é determinado como um percentual do total de capsídeos

5. Filtração de Fluxo Tangencial 3 para Gerar a Substância do fármaco Filtrada

[00184] Em algumas modalidades, uma etapa de filtração de fluxo tangencial (TFF3) é usada para remover o CsCl e concentrar os capsídeos de vetor cheios. A filtração de fluxo tangencial pode ser realizada utilizando membranas adequadas. Em uma modalidade, são usadas membranas de celulose regeneradas de 300 kDa MWCO. Os capsídeos de vetor podem ser retidos pelas membranas. A fase de concentração da operação de TFF3 pode ser projetada para reduzir a concentração de CsCl residual e o volume do pool de ultracentrifugação. Em algumas modalidades, uma vez atingido o volume de retentado alvo, a diafiltração é iniciada. O retentado é diafiltrado com até 10 diavolumes de um tampão de TFF3 adequado. Em uma modalidade, um tampão de TFF3 adequado pode incluir um ou mais dos seguintes componentes, que compreendem (a) Tris, (b) $MgCl_2$, (c) NaCl, ou (d) Poloxâmero 188. Em uma modalidade, um tampão de TFF3 adequado pode incluir todos (a), (b), (c) e (d). Em uma modalidade, o tampão TFF3 tem pH 7,5-8,5, pH 7,7-8,3 ou pH 8,0. Em uma modalidade, um tampão TFF3 adequado compreende Tris 20 mM, $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 200 mM, Poloxâmero 188 a 0,001%, pH $8,0 \pm 0,1$ a 20 °C. Em algumas modalidades, o tampão para CsCl pode incluir todos de (a), (b), (c) e (d). Em algumas

modalidades, o tampão para CsCl tem um pH de 7,5-8,5 ou pH 7,9-8,2. Em uma modalidade, um tampão adequado para a centrifugação de CsCl é Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, CsCl 3 M, Poloxâmero 188 0,2%, pH $8,1 \pm 0,1$ a 20°C. Em uma modalidade, o retentado concentrado é filtrado utilizando um Filtro Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade 0,2µm (Mini Kleenpak) para produzir uma substância medicamentosa filtrada. Em algumas modalidades, os métodos aqui descritos rendem mais do que 5×10^{15} vg, ou mais do que 8×10^{15} vg ou mais que 1×10^{16} vg de rAAV por lote de fabricação.

Composições Farmacêuticas

[00185] As partículas virais (por exemplo, AAV) purificadas de acordo com os métodos aqui descritos podem ser produzidas com elevado rendimento com pureza suficiente para que possam ser administradas a um indivíduo humano. Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração entre cerca de 1 a 8×10^{13} genomas de vetor viral/mL (vg/mL), ou cerca de 1,7 a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração de cerca de 1,9 a $2,1 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração de cerca de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL.

[00186] Em algumas modalidades, durante o processo de produção do vetor viral, capsídeos virais vazios que não contêm o material de ácido nucleico podem ser gerados. Composições farmacêuticas que compreendem baixas quantidades de capsídeos virais vazios podem ser vantajosas, porque evitam expor os pacientes, por exemplo, crianças, com sistemas imunes imaturos a material antigênico (capsídeos vazios, proteína da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira) desnecessariamente sem benefício terapêutico. Em algumas modalidades, tais composições farmacêuticas podem reduzir potenciais reações de infusão ou respostas imunes mais amplas e podem melhorar a eficácia terapêutica. Em comparação com os

capsídeos virais cheios com o material do genoma, os capsídeos vazios têm diferentes densidades, permitindo que as duas espécies sejam separadas por centrifugação em gradiente, ou outros métodos conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, os capsídeos vazios são separados por ultracentrifugação. Em algumas modalidades, os capsídeos vazios são separados por ultracentrifugação com gradiente de CsCl. Em outras modalidades, os capsídeos vazios são separados por ultracentrifugação em gradiente de iodixanol. Em algumas modalidades, os capsídeos vazios são separados por ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

[00187] A relação entre capsídeos virais vazios e não vazios pode ser medida por técnicas laboratoriais padronizadas. Em algumas modalidades, a proporção é medida por medições de absorbância óptica. Em algumas modalidades, a proporção é medida por medições de absorbância de UV. Em algumas modalidades, a quantidade total de proteínas da capsídeo e a quantidade total de DNA podem ser determinadas por medidas de absorbância de UV. Em algumas modalidades, a medição é determinada por medições do índice de refração óptica. Em algumas outras modalidades, a medição é determinada por ultracentrifugação analítica.

[00188] Altos níveis de capsídeos vazios podem representar desafios para a eficácia dos tratamentos com vetores virais. Em uma modalidade, a composição farmacêutica tem menos de 10% de capsídeos vazios, menos de 8% de capsídeos vazios, menos de 7%, menos de cerca de 5%, menos de 3%, menos de 1% de capsídeos vazios. Em outra modalidade, a composição farmacêutica tem 1 a 10% de capsídeos vazios. Em outra modalidade, a composição farmacêutica tem 2 a 8% de capsídeos vazios. Em outra modalidade, a composição farmacêutica tem menos do que ou igual a 6% de capsídeos vazios, 5% de capsídeos vazios, 4% de capsídeos vazios, 3% de capsídeos vazios, 2% de

capsídeos vazios, ou menos. Em uma modalidade, o número de capsídeos vazios está abaixo do limite de detecção. Em outra modalidade, o percentual de capsídeos vazios é determinado como um percentual do total de capsídeos, por exemplo, utilizando AUC. Em algumas modalidades, o baixo percentual de capsídeos vazios melhora a eficácia do tratamento e/ou reduz eventos adversos (por exemplo, respostas inflamatórias, lesão hepática) depois da administração a um paciente, por exemplo, em comparação com composições com percentual mais elevado de capsídeos vazios. Em algumas modalidades, os métodos de preparação de vetores virais aqui descritos fornecem estes percentuais melhorados de capsídeos vazios, em comparação com os níveis nos métodos anteriores, por exemplo, aqueles que não utilizam células aderentes e/ou os métodos de purificação aqui descritos.

[00189] Durante o processo de produção do vetor viral, a proteína residual das células aderentes (por exemplo, células HEK293) usadas para gerar os vetores virais podem não ser completamente separadas. Proteínas residuais de células hospedeiras representam um potencial para desencadear uma resposta imune. A quantidade residual de célula hospedeira pode ser medida por qualquer técnica laboratorial padronizada que possa distinguir entre as proteínas do capsídeo viral e as proteínas residuais da célula hospedeira. Em algumas modalidades, a quantidade de proteínas residuais da célula hospedeira pode ser medida por exclusão de tamanho ou cromatografia de troca iônica. Em algumas modalidades, a medida pode ser feita por um western blot com anticorpos específicos para células parentais. Em uma modalidade, a quantidade de proteína residual da célula hospedeira pode ser medida por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Em algumas modalidades, a quantidade de proteína residual da célula hospedeira pode ser medida por um kit ELISA comercial. Em algumas modalidades,

a quantidade de proteína residual da célula hospedeira pode ser medida por um Kit HEK293 HCP ELISA da Cygnus Technologies.

[00190] Em outra modalidade, a proteína residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a 5×10^6 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml, inferior ou igual a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml ou 1×10^5 pg/ml por 1×10^{13} vg/mL a $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml ou menor ou igual a 40 ng/ml por 1×10^{13} vg/ml. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende menos do que ou igual a 5, 4, 3, 2, 1 ou menos ng de proteína residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende menos do que ou igual a 4 ng de proteína residual da célula hospedeira por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00191] Durante o processo de produção do vetor viral, o DNA residual da célula hospedeira das células aderentes (por exemplo, células HEK293) ou DNA plasmídico residual transfectado para gerar os vetores virais pode não ser completamente removido. O processo de purificação (por exemplo, acidificação, clarificação, filtração de fluxo tangencial, etc.) remove a maior parte da célula hospedeira residual ou DNA plasmídico. Em uma modalidade, a medição da quantidade de célula hospedeira residual ou DNA plasmídico é realizada por PCR. Em outra modalidade, a medição da quantidade de DNA residual da célula hospedeira ou de plasmídeo realizada por PCR quantitativa (qPCR) com iniciadores específicos para sequências da célula hospedeira ou de plasmídeo.

[00192] Em outra modalidade, a medição da quantidade de célula hospedeira residual ou Plasmídeo de DNA é realizada por meio de digital droplet PCR (ddPCR). Em uma modalidade, a quantidade de Plasmídeo de DNA é determinada utilizando um ensaio de qPCR com iniciadores específicos para a região do gene de resistência a canamicina do plasmídeo. Em outra modalidade, a quantidade de DNA

residual da célula hospedeira é determinada por kits de ensaio de qPCR comerciais, por exemplo, resDNASEQ® Human Residual DNA Quantitation Kit by ThermoFisher, Residual DNA Quantification Supermix by Biorad ou qualquer produto equivalente. A redução da quantidade de célula hospedeira residual ou plasmídeo de DNA pode melhorar os resultados terapêuticos e tais composições podem ser purificadas e/ou selecionadas para utilização nos tratamentos aqui descritos.

[00193] Em uma modalidade, a quantidade de DNA residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $1,7 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml, 1×10^5 pg/ml por 1×10^{13} vg/ml to $1,2 \times 10^6$ pg/ml por 1×10^{13} vg/ml. Em uma modalidade, a quantidade de DNA residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a 3×10^5 , 2×10^5 , $1,1 \times 10^5$, 1×10^5 pg ou menos por $1,0 \times 10^{13}$ vg. Em modalidades, o DNA residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00194] Em outra modalidade, o plasmídeo de DNA residual na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $1,7 \times 10^6$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, $1,0 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg a $1,7 \times 10^6$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg. Em outra modalidade, o plasmídeo de DNA residual na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00195] Em uma modalidade, a quantidade de DNA residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg e o plasmídeo de DNA residual na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00196] Em uma modalidade, a quantidade de DNA residual da célula hospedeira na dita composição farmacêutica é menor do que ou

igual a $1,1 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg e o plasmídeo de DNA residual na dita composição farmacêutica é menor do que ou igual a $6,8 \times 10^5$ pg por $1,0 \times 10^{13}$ vg e a proteína residual da célula hospedeira é menor do que ou igual a 4 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00197] Em algumas modalidades, a quantidade de endotoxina na composição farmacêutica é menor do que cerca de 1 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,75 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,5 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,4 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,35 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,3 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,25 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,2 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,15 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,1 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, menor do que cerca de 0,05 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL ou menor do que cerca de 0,02 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL. Métodos para determinar a quantidade de endotoxina são conhecidos na técnica, por exemplo, um teste com o lisado de amebócito de limulus (LAL). Em modalidades, a endotoxina é ensaiada por U.S. Pharmacopeia ("USP") <85> (incorporada aqui por referência em sua totalidade).

[00198] Em uma modalidade, a albumina sérica bovina (BSA) em uma composição farmacêutica é menor do que 0,5 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que 0,3 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, ou menor do que 0,22 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, Em uma modalidade, a benzonase na dita composição farmacêutica é menor do que 0,2 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menor do que 0,1 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg, ou menor do que 0,09 ng por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00199] Em uma modalidade, a composição farmacêutica aqui descrita compreende um ou mais dos seguintes: menos do que cerca de 0,09 ng de benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que cerca de 30 µg/g (ppm) de cério, cerca de 20-80 ppm de Poloxâmero 188, menos

do que cerca de 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que cerca de $6,8 \times 10^5$ pg de plasmídeo de DNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que cerca de $1,1 \times 10^5$ pg de hcDNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que cerca de 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg, pH 7,7-8,3, cerca de 390-430 mOsm/kg, menos do que cerca de 600 partículas que têm $\geq 25 \mu\text{m}$ de tamanho por recipiente, menos do que cerca de 6000 partículas que têm $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamanho por recipiente, cerca de $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genômico, título infeccioso de cerca de $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg, proteína total de cerca de 100-300 μg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, sobrevida média de ≥ 24 dias de camundongos $\Delta 7\text{SMA}$ com cerca de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg por dose de vetor viral, cerca de 70-130% de potência relativa com base em um ensaio baseado em célula in vitro e/ou menos do que cerca de 5% de capsídeos vazios.

[00200] Em uma modalidade a composição farmacêutica aqui descrita compreende um ou mais, por exemplo, todos os seguintes: pH 7,7-8,3 (por exemplo, como medido pela USP <791>), cerca de 390-430 mOsm/kg (por exemplo, como medida pela USP <785>), menor do que cerca de 600 partículas que têm $\geq 25 \mu\text{m}$ de tamanho por recipiente, (por exemplo, como medido pela USP <787>), menor do que cerca de 6000 partículas que têm $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamanho por recipiente (por exemplo, como medido pela USP <787>), cerca de $1,7 \times 10^{13}$ - $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genômico, título infeccioso de cerca de $3,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg, proteína total de cerca de 100-300 μg por $1,0 \times 10^{13}$ vg, sobrevida média de ≥ 24 dias de camundongos $\Delta 7\text{SMA}$ com cerca de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg dose de vetor viral, por exemplo, em um teste de funcionalidade in vivo, por exemplo, como descrito aqui, cerca de 70-130% de potência relativa em um ensaio baseado em célula in vitro e/ou menor do que cerca de 5% de capsídeos vazios. Em modalidades, a composição farmacêutica aqui descrita compreende uma pureza total maior do que ou igual a 95% (por exemplo, como

determinado por SDS-PAGE). Em modalidades, a composição farmacêutica aqui descrita não compreende nenhuma única impureza relacionada não mencionada em um nível maior do que 2% (por exemplo, como determinado por SDS-PAGE). Em modalidades, a composição farmacêutica aqui descrita compreende níveis de Endotoxina menores do que ou iguais a 0,75 EU/mL (por exemplo, como medido pela USP <85>). Em modalidades, a composição farmacêutica aqui descrita compreende testes para o não crescimento em um teste de esterilidade, por exemplo, como medido pela USP <71>.

[00201] Altos níveis de proteína residual da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira, plasmídeo de DNA e/ou endotoxina podem representar desafios quanto a eficácia dos tratamentos com vetor viral. Em algumas modalidades, essas baixas quantidades de proteína residual da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira, plasmídeo de DNA e/ou endotoxina melhoram a eficácia do tratamento e/ou reduzem eventos adversos (por exemplo, respostas inflamatórias, lesão hepática) depois da administração a um paciente, por exemplo, quando comparadas com composições que possuem quantidades maiores. Em algumas modalidades, os métodos de preparação de vetores virais aqui descritos fornecem esses níveis melhorados, quando comparados aos níveis dos métodos anteriores, por exemplo, aqueles que não usam células aderentes e/ou os métodos de purificação aqui descritos. Em algumas modalidades, os métodos também permitem a preparação de vetores virais com percentuais reduzidos de capsídeos vazios em adição a pequenas quantidades de proteína residual da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira, plasmídeo de DNA e/ou endotoxina.

[00202] Em algumas modalidades, a quantidade de césio residual após TFF, por exemplo, a segunda TFF, é menor do que cerca de 50 µg/g. Em algumas modalidades, a quantidade de césio residual após a

TFF, por exemplo, a segunda TFF, é menor do que cerca de 30 µg/g. Em algumas modalidades, a quantidade de cério residual após a TFF, por exemplo, a segunda TFF, é menor do que cerca de 20 µg/g. Em algumas modalidades, o cério residual na composição farmacêutica é menor do que ou igual a 30 µg/g (ppm). Em algumas modalidades, a quantidade de CsCl residual pode ser medida por espectrometria de massa, espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e/ou outro método adequado. Em algumas modalidades, a quantidade de cério residual após a segunda TFF está abaixo do limite de quantificação, por exemplo, utilizando ICP-MS.

[00203] Em algumas modalidades, a concentração de vetores virais de AAV coletados depois da segunda TFF maior do que ou igual a cerca de 5×10^{12} vg/ml, maior do que ou igual a cerca de 1×10^{13} vg/ml, ou maior do que ou igual a cerca de 3×10^{13} vg/ml.

[00204] Em uma modalidade, uma composição farmacêutica tem um ou mais dos seguintes: menos do que 0,09 ng de benzonase por 1×10^{13} vg/ml, menos do que 30 µg/g (ppm) de cério, cerca de 20-80 ppm de Poloxâmero 188, menos do que 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que $6,8 \times 10^5$ pg de plasmídeo de DNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, menos do que $1,1 \times 10^5$ pg de hcDNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, e menos do que 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg.

[00205] Em outra modalidade, a composição farmacêutica retém uma potência entre $\pm 20\%$, entre $\pm 15\%$, entre $\pm 10\%$, ou entre $\pm 5\%$, de um padrão de referência. Em uma modalidade, a potência é avaliada contra um padrão de referência usando os métodos de Foust et al., Nat. Biotechnol., 28(3), pp. 271-274 (2010). Qualquer padrão de referência pode ser usado. Em uma modalidade, a composição farmacêutica tem uma potência in vivo, como testada em camundongos SMAΔ7. Em uma modalidade, um camundongo testado tratado com $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg por dose tem uma sobrevida média maior do que 15 dias, maior do que 20

dias, maior do que 22 dias ou maior do que 24 dias. Em uma modalidade, a composição farmacêutica tem uma potência relativa in vitro como testada por um ensaio celular baseado em célula de 50-150%, 60-140% ou 70-130% em relação a um padrão de referência e/ou controle adequado.

[00206] As partículas virais purificadas de acordo com a presente descrição (por exemplo, partículas virais) podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmaceuticamente aceitáveis. Composições da descrição podem ser formuladas para administração a um indivíduo mamífero, por exemplo, um humano, utilizando técnicas conhecidas. Em particular, os sistemas de liberação podem ser formulados para dispositivos do tipo de depósito intramuscular, intradérmico, mucoso, subcutâneo, intravenoso, intratecal, injetável ou administração tópica.

[00207] Quando o sistema de liberação é formulado como uma solução ou suspensão, o sistema de liberação está em um veículo aceitável, por exemplo, um veículo aquoso. Pode ser usada uma variedade de veículos aquosos, por exemplo, água, água tamponada, solução salina 0,8%, glicina 0,3%, ácido hialurônico e semelhantes. Estas composições podem ser esterilizadas por técnicas de esterilização convencionais bem conhecidas, ou podem ser esterilizadas por filtração. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso como tal ou liofilizadas, sendo a preparação liofilizada combinada com uma solução estéril antes da administração.

[00208] As composições, por exemplo, composições farmacêuticas, podem conter substâncias auxiliares farmaceuticamente aceitáveis para se aproximar das condições fisiológicas, tais como agentes de ajuste de pH e tampões, agentes de ajuste de tonicidade, agentes umectantes e semelhantes, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, potássio cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitana, oleato

de trietanolamina, etc. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende um conservante. Em algumas outras modalidades, a composição farmacêutica não compreende um conservante.

[00209] O título genômico de vetores virais, por exemplo, aquele das composições e formulações aqui descritas, pode ser determinado de várias maneiras padronizadas. PCR com iniciadores específicos para o vetor viral pode fornecer medidas relativas, mas a PCR quantitativa (qPCR) pode ser usada para amostras menores e medições absolutas. Droplet Digital PCR (ddPCR) é um método para a realização de PCR digital baseado na tecnologia de gotículas de emulsão de água-óleo. Uma amostra é fracionada em dezenas de milhares de gotículas e a amplificação por PCR das moléculas de molde ocorre em cada gotícula individual. Não é necessário fazer uma curva-padrão ou ter iniciadores com alta eficiência de amplificação; portanto, o ddPCR normalmente não usa tanta amostra quanto as técnicas tradicionais baseadas em PCR. Em uma modalidade, o título genômico de vetores virais é determinado utilizando PCR. Em outra modalidade, o título genômico de vetores virais determinado utilizando qPCR. Em outra modalidade, o título de gene do vetor viral é determinado utilizando ddPC. O método de determinação do título genômico viral usando ddPCR é descrito, por exemplo, em Lock et al., "Absolute Determination of Single-Stranded and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vector Genome Titers by Droplet Digital PCR" *Human Gene Therapy Methods*, 25 (2): 115-125.

[00210] Em algumas modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado usando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o gene SMN. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado usando iniciadores e

sondas especificamente concebidos visando o promotor de beta-actina de galinha. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado usando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o intensificador de CMV. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado utilizando iniciadores e sondas especificamente concebidos para as sequências de ITR. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado usando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino.

[00211] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica tem pH cerca de 7,7 a 8,3 e tem uma osmolaridade de 390 a 430 mOsm/kg. Em algumas modalidades, o pH é medido utilizando um medidor de pH. Em algumas modalidades, o pH é medido potenciometricamente utilizando um microeletrodo com compensação de temperatura de acordo com padrões estabelecidos pela United States Pharmacopeia (USP), por exemplo, <791> (incorporada por referência na sua totalidade). Em algumas modalidades, a osmolaridade é medida utilizando um osmômetro de depressão do ponto de congelamento de acordo com USP, por exemplo, USP <785> (incorporada por referência na sua totalidade). Em algumas modalidades, a osmolaridade é medida utilizando um osmômetro de depressão de pressão de vapor. Em outras modalidades, a osmolaridade é medida usando um osmômetro de membrana.

[00212] Em uma modalidade, uma formulação intravenosa tem um pH entre 7,5 e 8,5, um título genômico de 2×10^{13} vg/ml a 6×10^{13} vg/ml e uma osmolaridade de 384 a 448 mOsm/kg. Em outra modalidade, uma formulação intravenosa tem um pH entre 7,5 e 8,5, um título genômico de $1,5 \times 10^{13}$ vg/ml - $3,5 \times 10^{13}$ vg/ml e uma osmolaridade de 384 a 448

mOsm / kg. Em outra modalidade, uma formulação intravenosa tem um pH entre 7,5 e 8,5, um título genômico de $1,8 \times 10^{13}$ vg/ml - $2,2 \times 10^{13}$ vg/ml e uma osmolaridade de 384 a 448 mOsm/kg. Em uma modalidade, uma formulação IV compreende cerca de 0,1-2,0 mM de $MgCl_2$. Em uma modalidade, uma formulação IV compreende cerca de 100-300 mM de NaCl. Em uma modalidade, uma formulação IV compreende cerca de 0,001% -0,01% p/v de Poloxâmero 188. Em uma modalidade, uma formulação IV é uma formulação aquosa em tampão Tris 10-30 mM, por exemplo, em um pH de 7,5 a 8,5.

[00213] Em uma modalidade, uma formulação IV compreende $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 200 mM, Poloxâmero 188 0,005% p / v, em tampão Tris 20 mM a pH 8,0. Em modalidades, a formulação IV compreende um título genômico de cerca de 1×10^{13} vg/mL- 3×10^{13} vg/mL ou $1,7 \times 10^{13}$ a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL.

Usos das Composições Farmacêuticas

[00214] Em outras modalidades, são aqui descritos métodos para a liberação de um polinucleotídeo ao sistema nervoso central de um paciente que compreende a administração de um rAAV9 com um genoma que inclui o polinucleotídeo. Em algumas modalidades, a liberação é a liberação intratecal de um polinucleotídeo ao sistema nervoso central de um paciente que compreende a administração de um rAAV9 com um genoma que inclui o polinucleotídeo. Em algumas modalidades, um agente de contraste de baixa osmolaridade, não iônico também é administrado ao paciente. O agente de contraste não-iônico e de baixa osmolaridade aumenta a transdução das células alvo no sistema nervoso central do paciente. Em algumas modalidades, o genoma de rAAV9 é um genoma autocomplementar. Em outras modalidades, o genoma rAAV9 é um genoma de fita simples.

[00215] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo é liberado em uma região do cérebro. Áreas do cérebro contempladas para liberação

incluem, mas não estão limitadas ao córtex motor e o tronco encefálico. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo é liberado na medula espinhal. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo é liberado em um neurônio motor inferior. Modalidades da descrição empregam rAAV9 para liberação de polinucleotídeos em células nervosas e da glia. Em algumas modalidades, a célula da glia é uma célula da microglia, um oligodendrócito ou um astrócito. Em algumas modalidades, o rAAV9 é usado para liberação de um polinucleotídeo em uma célula de Schwann.

[00216] Os usos incluem, por exemplo, tratamento de doenças do neurônio motor inferior, como SMA e ALS, assim como a doença de Pompe, distúrbios do armazenamento do lisossoma, Glioblastoma multiforme e doença de Parkinson. Os distúrbios do armazenamento do lisossoma incluem, mas não estão limitados a Deficiência do Ativador/Gangliosidose GM2, Alfa-manosidose, Aspartilglicosaminúria, Doença do armazenamento do éster coletérico, Deficiência Crônica de Hexosaminidase A, Cistinose, doença de Danon, doença de Fabry, doença de Farber, Fucosidose, Galactosialidose, Doença de Gaucher Disease (Tipo I, Tipo II, Tipo III), Gangliosidose GM1 (Infantil, Infantil tardia/Juvenil, Adulto/Crônico), Doença da Célula I/Mucopolidose II, Doença do Armazenamento do Ácido Siálico Livre Infantil/ISSD, Deficiência de Hexosaminidase A Juvenil, doença de Krabbe (Início na Infância, Início Tardio), Leucodistrofia Metacromática, Mucopolissacaridoses (Polidistrofia Pseudo-Hurler/Mucopolidose IIIA, MPSI Síndrome de Hurler, MPSI Síndrome de Scheie, MPS I Síndrome de Hurler-Scheie, MPS II Síndrome de Hunter, Síndrome de Sanfilippo Tipo A/MPS III A, Síndrome de Sanfilippo Tipo B/MPS III B, Síndrome de Sanfilippo Tipo C/MPS III C, Síndrome de Sanfilippo Tipo D/MPS III D, Morquio Tipo A/MPS WA, Morquio Tipo B/MPS IVB, MPS IX Deficiência de Hialuronidase, MPS VI Maroteaux-Lamy, MPS VII Síndrome de Sly, Mucopolidose I/Sialidose, Mucopolidose IIIC,

Mucopolidose tipo IV), Deficiência múltipla de sulfatase, Doença de Niemann-Pick (Tipo A, Tipo B, Tipo C), Lipofuscinose Neuronal Ceroide (doença CLN6 (Atípica Tardia Infantil, Variante de Início Tardio, Juvenil Precoce), Doença de Batten-Spielmeyer-Vogt/Juvenil NCL/CLN3, CLN5 Finlandesa Variante Tardia Infantil, doença de Jansky-Bielschowsky /Tardia infantil CLN2/TPP1, Doença de Kufs/Início no Adulto NCL/CLN4, Epilepsia do Norte/variante tardia infantil CLN8, Doença de Santavuori-Haltia/Infantil CLN1/PPT, Beta-manosidose, Doença de Pompe / Doença de armazenamento do glicogênio tipo II, Pichodisostose, Doença de Sandhoff /Início no Adulto / Gangliosidose GM2, Doença de Sandhoff /Gangliosidose GM2--Infantil, Doença de Sandhoff / Gangliosidose GM2--Juvenil, Doença de Schindler, Doença de Salla /Doença do Armazenamento do Ácido Siálico, Tay-Sachs/gangliosidose GM2, Doença de Wolman.

[00217] Em outras modalidades, o uso dos métodos e materiais é indicado para o tratamento de doenças do sistema nervoso, tais como síndrome de Rett, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington ou para tratamento de lesões do sistema nervoso, incluindo lesões na medula espinal e traumatismo cerebral e cânceres cerebrais. Em uma modalidade, o uso dos métodos e materiais é indicado para o tratamento da atrofia muscular espinhal (SMA).

[00218] Existem quatro tipos de SMA, que são convencionalmente classificados por idade de início e maior função motora alcançada. Todas as formas de SMA são por herança autossômica recessiva e são causadas por mutações do gene da proteína 1 de sobrevivência do neurônio motor (SMN1). Os seres humanos também carregam uma segunda cópia quase idêntica do gene de SMN chamado SMN2. Lefebvre *et al.* "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." *Cell*, 80(1):155-65. Monani et al. "Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor-neuron

specific disease." *Neuron*, 48(6):885-896. Ambos os genes SMN1 e SMN2 expressam a proteína SMN, no entanto, SMN2 contém uma mutação traducionalmente silenciosa no éxon 7, o que resulta na inclusão ineficiente do éxon 7 em transcritos de SMN2. Assim, SMN2 produz a proteína SMN de extensão completa e uma versão truncada de SMN sem o éxon 7, sendo a versão truncada a forma predominante. Como resultado, a quantidade de proteína funcional completa produzida por SMN2 é muito menor (em 70-90%) do que a produzida por SMN1. Lorson et al. "A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy." *PNAS*, 96(11) 6307-6311. Monani et al, "A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2." *Hum Mol Genet* 8(7):1177-1183. Embora a SMN2 não possa compensar completamente a perda do gene SMN1, os pacientes com formas mais leves de SMA geralmente têm números de cópias SMN2 mais altos. Lefebvre et al., "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy." *Nat Genet* 16(3):265-269. Park et al., "Spinal muscular atrophy: new and emerging insights from model mice." *Curr Neurol Neurosci Rep* 10(2):108-117. Uma ressalva é que o número de cópias de SMN2 não é o único modificador fenotípico. Em particular, a variante c.859G >C no éxon 7 do gene SMN2 foi descrita como um modificador positivo da doença. Pacientes com essa mutação particular apresentam fenótipos de doença menos graves. Prior et al., "A positive modified of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene." *Am J Hum Genet* 85(3):408-413.

[00219] SMA tipo I (também chamada de início na infância ou doença de Werdnig-Hoffmann) ocorre quando os sintomas da SMA estão presentes no nascimento ou aos 6 meses de idade. Neste tipo, os bebês geralmente têm um tônus muscular baixo (hipotonia), um choro fraco e desconforto respiratório. Eles geralmente têm dificuldade para engolir e

sugar e não atingem o marco do desenvolvimento de ser capaz de sentar-se sem ajuda. Eles frequentemente mostram um ou mais dos sintomas da SMA selecionados a partir da hipotonia com atraso nas habilidades motoras, controle inadequado da cabeça, postura de ombro projetado e hipermobilidade das articulações. Normalmente, esses bebês têm duas cópias do gene SMN2, uma em cada cromossomo 5. Mais da metade de todos os novos casos de SMA são SMA tipo I.

[00220] A SMA tipo II ou intermediária é quando a SMA tem seu início entre as idades de 7 e 18 meses e antes que a criança possa ficar de pé ou andar independentemente. Crianças com SMA tipo 2 geralmente têm pelo menos três genes de SMN2. SMA de início tardio (também conhecido como SMA tipos III e IV, SMA leve, SMA de início na idade adulta e doença de Kugelberg-Welander) resulta em níveis variáveis de fraqueza. A SMA tipo III tem início após 18 meses e as crianças podem ficar de pé e andar independentemente, embora possam precisar de ajuda. SMA tipo IV tem início na idade adulta e as pessoas são capazes de andar durante a idade adulta. Pessoas com tipos SMA III ou IV geralmente têm entre quatro e oito genes SMN2, dos quais uma boa quantidade de proteína SMN de extensão completa pode ser produzida.

[00221] Em uma modalidade, a expressão "tratamento" compreende a etapa de administrar intravenosamente, ou através da via intratecal, uma dose eficaz, ou múltiplas doses eficazes, de uma composição que compreende um rAAV como aqui descrito a um animal (incluindo um ser humano) necessitado. Se a dose for administrada antes do desenvolvimento de um distúrbio/doença, a administração é profilática. Se a dose for administrada após o desenvolvimento de um distúrbio/doença, a administração é terapêutica. Em modalidades, uma dose eficaz é uma dose que alivia (elimina ou reduz) pelo menos um sintoma associado a doença/estado de doença a ser tratado, que retarda ou previne a progressão de um distúrbio/estado de doença, que

diminui ou previne a progressividade de um distúrbio / estado de doença, que diminui a extensão da doença, que resulta em remissão (parcial ou total) da doença e/ou prolonga a sobrevida. Exemplos de estados de doença contemplados para tratamento estão aqui descritos.

[00222] Em uma modalidade, as composições que compreendem rAAV da descrição são administradas intravenosamente a um paciente necessitado que têm SMA tipo I. Em outra modalidade, as composições que compreendem rAAV da descrição são administradas por via intratecal a um paciente necessitado que tem SMA tipos II , III ou IV.

[00223] Um método de tratamento de SMA tipo 1 em um paciente necessitado, através da administração do vetor viral de AAV9 através de uma via intratecal ou intravenosa, está aqui descrito. Em algumas modalidades, o paciente tem 0 a 9 meses de idade. Em algumas outras modalidades, o paciente tem 0 a 6 meses de idade. Em algumas modalidades em que o vetor viral é usado para tratar SMA do tipo I em um paciente, o peso do paciente é determinado. Em algumas modalidades, o paciente tem um peso corporal menor do que 8,5 kg. Em algumas modalidades, o paciente tem um peso corporal de maior do que 2,6 kg. Em algumas modalidades, o paciente tem um peso corporal de 2,6 a 8,5 kg.

[00224] Em algumas modalidades, o paciente tem mutações, por exemplo, uma mutação nula, em uma cópia do gene de SMN1 (abrangendo qualquer mutação que torne a SMN1 codificada não funcional). Em algumas modalidades, o paciente tem mutações, por exemplo, uma mutação nula, em duas cópias do gene de SMN1. Em algumas modalidades, o paciente tem mutações, por exemplo, uma mutação nula, em todas as cópias do gene de SMN1. Em algumas modalidades, o paciente tem uma deleção em uma cópia do gene de SMN1. Em algumas modalidades, o paciente tem uma deleção em duas cópias do gene de SMN1. Em algumas modalidades, o paciente tem

mutações bialélicas de SMN1, isto é, uma deleção ou substituição de SMN1 em ambos os alelos do cromossoma. Em algumas modalidades, o paciente tem pelo menos uma cópia funcional do gene de SMN2. Em algumas modalidades, o paciente tem pelo menos duas cópias funcionais do gene de SMN2. Em algumas modalidades, o paciente tem pelo menos duas cópias funcionais do gene de SMN2. Em algumas modalidades, o paciente tem pelo menos três cópias funcionais do gene de SMN2. Em algumas modalidades, o paciente tem pelo menos quatro cópias funcionais do gene de SMN2. Em algumas modalidades, o paciente tem pelo menos cinco cópias funcionais do gene SMN2. Em algumas modalidades, o paciente não tem uma substituição c.859G>C no éxon 7 de pelo menos uma cópia do gene de SMN2. Em algumas modalidades, a sequência genética do gene de SMN1 ou SMN2 pode ser determinada por sequenciamento completa do genoma. Em outras modalidades, a sequência genética e o número de cópias do gene de SMN1 ou SMN2 podem ser determinados por sequenciamento de alto rendimento. Em algumas modalidades, a sequência genética e o número de cópias do gene de SMN1 ou SMN2 podem ser determinados pela análise de microarranjo. Em algumas modalidades, a sequência genética e o número de cópias do gene de SMN1 ou SMN2 podem ser determinados pelo sequenciamento de Sanger. Em algumas modalidades, o número de cópias do gene de SMN1 ou SMN2 pode ser determinado por hibridização fluorescente in situ (FISH).

[00225] Em algumas modalidades, o paciente apresenta um ou mais sintomas de SMA. Os sintomas da SMA podem incluir hipotonia, retardo nas habilidades motoras, controle inadequado da cabeça, postura projetada dos ombros e hiper mobilidade das articulações. Em algumas modalidades, é determinado o controle deficiente da cabeça colocando o paciente em uma posição sentada com os pés se tocando (ring sitting position) com ajuda dada nos ombros (frente e costas). O controle da

cabeça é avaliado pela capacidade do paciente de manter a cabeça ereta. Em algumas modalidades, o movimento espontâneo é observado quando o paciente está em posição supina e as habilidades motoras são avaliadas pela capacidade do paciente de levantar os cotovelos, joelhos, mãos e pés da superfície. Em algumas modalidades, a força de preensão do paciente é medida colocando um dedo na palma do paciente e levantando o paciente até que o ombro saia da superfície. A hipotonia e a força de preensão são medidas pela rapidez que o paciente mantém o aperto. Em algumas modalidades, o controle da cabeça é avaliado colocando a cabeça do paciente em uma rotação máxima disponível e medindo a capacidade do paciente de virar a cabeça de volta para a linha média. Em algumas modalidades, a postura do ombro pode ser avaliada sentando-se o paciente com apoio de cabeça e tronco, e observando se o paciente flexiona os cotovelos ou o ombro para alcançar um estímulo que é colocado ao nível do ombro no comprimento dos braços. Em algumas modalidades, a postura do ombro também pode ser avaliada colocando o paciente em uma posição de decúbito lateral e observando se o paciente flexiona os cotovelos ou ombro para alcançar um estímulo que é colocado ao nível do ombro no comprimento dos braços. Em algumas modalidades, as habilidades motoras são avaliadas observando se os pacientes flexionam seus quadris ou joelhos quando o pé é acariciado, sente cócegas ou é beliscado. Em algumas modalidades, a flexão do ombro, flexão do cotovelo, adução do quadril, flexão do pescoço, extensão da cabeça, extensão do pescoço e/ou encurvamento da coluna vertebral podem ser avaliadas por medidas clínicas conhecidas, por exemplo, CHOP INTEND. Outros sintomas de SMA podem ser avaliados de acordo com medidas clínicas conhecidas, por exemplo, CHOP INTEND.

[00226] Em algumas modalidades, os pacientes são tratados após mostrarem sintomas de SMA tipo I (por exemplo, um ou mais sintomas),

conforme determinado utilizando um dos testes aqui descritos. Em algumas modalidades, os pacientes são tratados antes de mostrarem sintomas de SMA tipo I. Em algumas modalidades, os pacientes são diagnosticados com SMA tipo I com base em testes genéticos, antes de serem sintomáticos. As terapias de combinação também são contempladas aqui. A combinação tal como aqui usada inclui tratamento simultâneo ou tratamentos sequenciais. Combinações de métodos podem incluir a adição de certos tratamentos médicos padronizados (por exemplo, riluzol em ALS), como são combinações com novas terapias. Por exemplo, outras terapias para SMA incluem oligonucleotídeos antissenso (ASOs) que alteram a ligação ao pré-mRNA e alteram os seus padrões de splicing. Singh. et al., "A multi-exon-skipping detection assay reveals surprising diversity of splice isoforms of spinal muscular atrophy genes." Plos One, 7(11):e49595. Em uma modalidade, nusinersen (Patentes US 8.361.977 e US 8.980.853, aqui incorporadas como referência) pode ser usado. O Nusinersen é um ASO aprovado que tem como alvo o íntron 6, o éxon 7 ou o íntron 7 do pré-mRNA de SMN2, modulando o processamento de SMN2 para produzir mais eficientemente a proteína SMN de extensão completa. Em algumas modalidades, o método de tratamento que compreende o vetor viral de AAV9 é administrado em combinação com um intensificador muscular. Em algumas modalidades, o método de tratamento que compreende o vetor viral de AAV9 é administrado em combinação com um neuroprotetor. Em algumas modalidades, o método de tratamento que compreende o vetor viral de AAV9 é administrado em combinação com um fármaco à base de oligonucleotídeo antissenso que atinge SMN. Em algumas modalidades, o método de tratamento que compreende o vetor viral de AAV9 é administrado em combinação com nusinersen. Em algumas modalidades, o método de tratamento que compreende o vetor viral de

AAV9 é administrado em combinação com um fármaco inibidor do fármaco miostatina. Em algumas modalidades, o método de tratamento que compreende o vetor viral de AAV9 é administrado em combinação com stamulumab.

[00227] Embora a administração para um indivíduo necessitado após o nascimento seja contemplada, a administração intrauterina a um feto é também contemplada.

[00228] Métodos de tratamento de pacientes com SMA tipo I utilizando as composições farmacêuticas que compreendem o vetor viral são contemplados. Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração de cerca de $1 \text{ a } 8 \times 10^{13}$ genomas de vetor viral de AAV9/mL (vg/mL). Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração de cerca de $1,7 \text{ a } 2,3 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração de cerca de $1,9 \text{ a } 2,1 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, o vetor viral é formulado em uma concentração de cerca de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL.

[00229] Em algumas modalidades em que o vetor viral usado para tratar SMA do tipo I em um paciente, o vetor viral de AAV (por exemplo, AAV SMN) é administrado ao paciente em uma dose de cerca de $1,0 - 2,5 \times 10^{14}$ vg/kg. Em algumas modalidades em que o vetor viral é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral AAV é administrado ao paciente em uma dose de cerca de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg. Em algumas modalidades em que o vetor viral usado para tratar SMA do tipo I em um paciente, o vetor viral AAV é infundido no paciente durante cerca de 45-70 min. Em algumas modalidades em que o vetor viral é usado para tratar SMA do tipo I em um paciente, o vetor viral de AAV é infundido no paciente durante cerca de 60 min. Em algumas modalidades em que o vetor viral é usado para tratar SMA do tipo I em um paciente, o vetor viral AAV é infundido no paciente utilizando uma bomba de infusão, uma

bomba peristáltica ou qualquer outro equipamento conhecido na técnica. Em algumas modalidades em que o vetor viral é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral de AAV é infundido no paciente utilizando uma bomba de seringa.

[00230] Títulos de vetor viral de rAAV a serem administrados variarão dependendo, por exemplo, do rAAV particular, do modo de administração, da meta de tratamento, do indivíduo e do tipo celular a ser atingido e podem ser determinados pelos métodos padronizados na técnica. Títulos de rAAV podem variar entre cerca de 1×10^6 , cerca de 1×10^7 , cerca de 1×10^8 , cerca de 1×10^9 , cerca de 1×10^{10} , cerca de 1×10^{11} , cerca de 1×10^{12} , cerca de 1×10^{13} , cerca de 1×10^{14} ou mais partículas resistentes a DNase (DRP) por ml. As dosagens podem ser expressas em unidades de genomas do vetor (vg). O título genômico pode ser determinado usando ddPCR como descrito nesse pedido, em Lock et al., ou quaisquer outros métodos conhecidos na técnica.

[00231] As dosagens também podem variar com base na periodicidade da administração a um humano. Essas dosagens de rAAV podem variar entre cerca de 1×10^{11} vg/kg, cerca de 1×10^{12} vg/kg, cerca de 1×10^{13} vg/kg, cerca de 1×10^{14} vg/kg, cerca de 1×10^{15} vg/kg, cerca de 1×10^{16} vg/kg ou mais genomas de vetor por quilograma de peso corporal em um adulto. Para um recém-nascido as dosagens de rAAV podem variar entre cerca de 1×10^{11} vg/kg, cerca de 1×10^{12} vg/kg, cerca de 3×10^{12} vg/kg, cerca de 1×10^{13} vg/kg, cerca de 3×10^{13} vg/kg, cerca de 1×10^{14} vg/kg, cerca de 3×10^{14} vg/kg, cerca de 1×10^{15} vg/kg, cerca de 3×10^{15} vg/kg, cerca de 1×10^{16} vg/kg, cerca de 3×10^{16} vg/kg ou mais genomas de vetor por quilograma de peso corporal.

[00232] As dosagens também podem variar com base na periodicidade da administração a um humano. Essas dosagens de rAAV podem variar entre cerca de 1×10^{11} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{12} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{13} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{14}

vg/kg/semana, cerca de 1×10^{15} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{16} vg/kg/semana ou mais genomas de vetor por quilograma de peso corporal em um adulto. Para um recém-nascido as dosagens de rAAV podem variar entre cerca de 1×10^{11} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{12} vg/kg/semana, cerca de 3×10^{12} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{13} vg/kg/semana, cerca de 3×10^{13} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{14} vg/kg/semana, cerca de 3×10^{14} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{15} vg/kg/semana, cerca de 3×10^{15} vg/kg/semana, cerca de 1×10^{16} vg/kg/semana, cerca de 3×10^{16} vg/kg/semana, ou mais genomas de vetor por quilograma de peso corporal por semana. Dosagens of rAAV 1×10^{11} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{12} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{13} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{14} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{15} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{16} vg/1,5 kg/semana ou mais genomas de vetor por quilograma de peso corporal em um adulto. Para um recém-nascido as dosagens de rAAV podem variar entre cerca de 1×10^{11} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{12} vg/1,5 kg/semana, cerca de 3×10^{12} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{13} vg/1,5 kg/semana, cerca de 3×10^{13} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{14} vg/1,5 kg/semana, cerca de 3×10^{14} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{15} vg/1,5 kg/semana, cerca de 3×10^{15} vg/1,5 kg/semana, cerca de 1×10^{16} vg/1,5 kg/semana, cerca de 3×10^{16} vg/1,5 kg/semana, ou mais genomas de vetor por 1,5 kg de peso corporal por semana.

[00233] Em uma modalidade, a dose é cerca de $1,1 \times 10^{14}$ genomas de vetor por kg (vg/kg) de peso corporal do paciente. Em uma modalidade, um paciente de 5 kg receberia uma dose total entre $0,5 \times 10^{14}$ a $5,0 \times 10^{14}$ de genomas de vetor. Em uma modalidade, o vetor viral é administrado em uma solução de Tris-salina tamponada. Em uma modalidade, o vetor viral é administrado em cerca de 5-20 mL/kg., cerca de 10-20 mL/kg, ou cerca de 5,5-6,5 mL/kg de solução de Tris-salina tamponada.

[00234] A dose pode ser determinada de várias formas padronizadas. PCR com iniciadores específicos para o vetor viral pode fornecer medidas relativas, mas a qPCR pode ser usada para amostras menores e medidas absolutas. ddPCR é um método para a realização de PCR digital que é baseada na tecnologia de gotículas de emulsão de água-óleo. Baker et al., "Digital PCR hits its stride." *Nature Methods*, 9(6):541-544. Sykes et al., "Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution." *Biotechniques*, 13(3)444-449. Uma amostra é fracionada em dezenas de milhares de gotículas e a amplificação por PCR das moléculas de molde ocorre em cada gotícula individual. Não é necessário fazer uma curva padrão ou ter iniciadores com alta eficiência de amplificação; portanto, o ddPCR normalmente não usa tanta amostra quanto as técnicas tradicionais baseadas em PCR. Exemplos de máquinas ddPCR comercialmente disponíveis incluem, mas não estão limitados a BioRad QX100 ddPCR e RainDance Raindrop Digital PCR. Em uma modalidade, a dose é determinada utilizando PCR. Em outra modalidade, a dose é determinada utilizando qPCR. Em outra modalidade, a dose é determinada utilizando digital droplet PCR (ddPCR). Em algumas modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado utilizando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o gene de SMN. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado utilizando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o promotor de beta-actina de galinha. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado utilizando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o intensificador de CMV. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado utilizando iniciadores e sondas especificamente concebidos para as sequências

ITR. Em outras modalidades, os métodos baseados em PCR detectam e quantificam o genoma viral de AAV9 encapsidado utilizando iniciadores e sondas especificamente concebidos para o sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino.

[00235] Em um aspecto, a dose é administrada de acordo com a tabela a seguir, usando $2,0 \times 10^{13}$ vg/ml como a concentração alvo do produto farmacológico.

Tabela 2: Dosagem

Média de Peso do Paciente (kg)	Volume da Dose^a (mL)
2,6 – 3,0	16,5
3,1 – 3,5	19,3
3,6 – 4,0	22,0
4,1 – 4,5	24,8
4,6 – 5,0	27,5
5,1 – 5,5	30,3
5,6 – 6,0	33,0
6,1 – 6,5	35,8
6,6 – 7,0	38,5
7,1 – 7,5	41,3
7,6 – 8,0	44,0
8,1 – 8,5	46,8

^a NOTA: Volume da Dose é calculado usando o limite superior da Média do Peso do Paciente.

[00236] Em algumas modalidades a composição farmacêutica que compreende o vetor viral de AAV é infundida no paciente por cerca de 20-70 minutos, por exemplo durante cerca de 45-70 minutos. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica que compreende o vetor viral de AAV é infundida no paciente durante cerca de 60 min. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica que compreende o vetor viral de AAV é infundida no paciente utilizando uma bomba de infusão, uma bomba peristáltica ou qualquer outro equipamento conhecido na técnica. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica que compreende o vetor viral de AAV é infundida no

paciente utilizando uma bomba de seringa.

[00237] A pré-seleção de pacientes passíveis de tratamento também é contemplada, assim como a administração do tratamento a pacientes identificados de acordo com critérios descritos. Os AAVs podem dar origem a uma resposta imune celular e humoral. Como resultado, uma fração de pacientes em potencial para terapia gênica baseada em AAV abriga anticorpos preexistentes contra AAV. Jeune et al., "Pre-existing anti-Adeno-Associated Virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy." *Hum Gene Ther Methods*, 24(2):59-67. Boutin et al., "Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors." *Hum Gene Ther*, 21:704-712. Como mesmos níveis muito baixos de anticorpos podem impedir a transdução bem-sucedida, os anticorpos anti-AAV preexistentes representam um sério obstáculo à aplicação universal da terapia gênica com AAV. Em algumas modalidades, os níveis de título de anticorpo anti-AAV9 em um paciente são determinados antes da administração do vetor viral AAV. Em algumas modalidades, os níveis de títulos de anticorpos anti-AAV9 em um paciente são determinados por um imunoensaio de ligação ELISA. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpo anti-AAV 9 iguais ou inferiores a 1: 100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes da administração do tratamento. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 iguais ou inferiores a 1:50, conforme determinado por um imunoensaio de ligação ELISA, antes da administração do tratamento. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação por ELISA depois do tratamento e monitorizado durante 1-8 semanas ou até titulação diminuir para menos de 1:100. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpos

anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA após o tratamento e é monitorado durante 1-8 semanas ou até os títulos caírem abaixo de 1:50.

[00238] Uma abordagem para superar o alto título de anticorpos anti-AAV é o uso de drogas imunossupressoras. O anticorpo monoclonal anti-CD20 rituximab em combinação com ciclosporina A demonstrou ser eficaz na redução dos títulos de anti-AAV. Mingozi et al., "Pharmacological modulation of humoral immunity in a nonhuman primate model of AAV gene transfer for hemophilia B." *Mol Ther*, 20:1410-1416. Outra abordagem é o uso de plasmaferese para depletar os anticorpos neutralizantes antes da administração do vetor. Monteilhet et al., "A 10 patient case report on the impact of plasmapheresis upon neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 6, and 8." *Mol Ther*, 19(11):2084-2091. Durante a plasmaferese, o sangue é retirado de um paciente e o plasma e as células sanguíneas são separados por centrifugação ou por filtração em fibra oca. As células sanguíneas são então devolvidas ao paciente em conjunto com plasma tratado ou com fluidos de substituição, tal como uma albumina humana a 4,5% em solução salina. Um uso comum de aférese terapêutica é a remoção de imunoglobulinas indesejadas, mas, neste caso, a plasmaferese representa uma abordagem atraente para depletar os anticorpos anti-AAV. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes ou após o tratamento e é tratado com plasmaferese. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpo anti-AAV9 acima de 1:50 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes ou após o tratamento e é tratado com plasmaferese.

[00239] Os anticorpos maternos preexistentes para AAV9 podem ser transferidos para um paciente infantil através do leite materno ou

transferência placentária no útero. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 acima de 1:100, como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes ou depois do tratamento e é mudado para alimentação com fórmula. Em algumas modalidades, o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 acima de 1:50, como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes ou depois do tratamento e é mudado para alimentação com fórmula.

[00240] Antes e após a administração do tratamento, a condição do paciente pode ser monitorada. Alguns pacientes que receberam tratamentos baseados em AAV experimentaram trombocitopenia, que é uma condição caracterizada por baixa contagem de plaquetas. A trombocitopenia pode ser detectada por um hemograma completo com uma amostra diluída de sangue em um hemocítômetro. A trombocitopenia também pode ser detectada observando-se uma lâmina preparada com o sangue do paciente (uma fina película de sangue ou esfregaço de sangue periférico) sob o microscópio. A contagem normal de plaquetas humanas varia entre 150.000 células/ml e cerca de 450.000 células/ml.

[00241] Em algumas modalidades, o paciente tem contagens de plaquetas acima de cerca de 67.000 células/ml antes da administração ou acima de cerca de 100.000 células/ml, ou acima de cerca de 150.000 células/ml. Em algumas modalidades, o paciente tem contagens de plaquetas abaixo de cerca de 150.000 células/ml antes da administração ou abaixo de cerca de 100.000 células/ml ou abaixo de cerca de 67.000 células/ml e é monitorado durante 1-8 semanas ou até a contagem de plaquetas aumentar para mais 67.000 células/ml, ou acima de cerca de 100.000 células/ml, ou acima de cerca de 150.000 células/ml. Em algumas modalidades em que as contagens de plaquetas estão abaixo de cerca de 67.000 células/ml após a administração do vetor viral, o paciente pode ser tratado com transfusão

de plaquetas. Em algumas modalidades, o paciente não tem trombocitopenia antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o paciente tem trombocitopenia após a administração do vetor viral e é monitorado por cerca de 1-8 semanas ou até que o paciente não tenha trombocitopenia. Em algumas modalidades, o paciente tem trombocitopenia após a administração do vetor viral e é tratado com uma transfusão de plaquetas.

[00242] A monitorização da condição dos pacientes também pode envolver testes sanguíneos padronizados que medem os níveis de plaquetas, eletroforese de proteínas séricas, gama-glutamil transferase sérica (GGT), aspartato transaminase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total, glicose, creatinina quinase (CK), creatinina, nitrogênio ureico no sangue (BUN), eletrólitos, fosfatase alcalina e amilase. Os níveis de troponina I são uma medida geral para a saúde do coração, e os níveis elevados refletem danos no coração ou condições relacionadas ao coração. Em algumas modalidades, os níveis de troponina-I são monitorizados após a administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes podem ter níveis de troponina-I menores do que cerca de 0,3, 0,2, 0,15 ou 0,1 µg/mL antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes podem ter níveis de troponina I menores do que cerca de 0,176 µg/ml antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes podem ter níveis de troponina I maiores do que cerca de 0,176 µg/ml após a administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes recebem monitorização cardíaca após a administração do vetor viral, até que os níveis de troponina-I sejam menores do que cerca de 0,176 µg/ml.

[00243] Aspartato transaminase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e bilirrubina total são uma medida geral da função hepática, enquanto a creatinina rastreia a função renal. Níveis elevados de AST,

ALT ou bilirrubina total podem indicar mau funcionamento hepático. Em algumas modalidades, o paciente tem função hepática normal antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o paciente tem níveis de transaminase hepática inferiores a cerca de 8 a 40 U/L antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o paciente tem níveis de AST ou ALT inferiores a cerca de 8 a 40 U/L antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o paciente tem níveis de bilirrubina inferiores a 3,0 mg/dL antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes têm níveis de creatinina inferiores a 1,8 mg/dL antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes têm níveis de hemoglobina (Hgb) entre 8 a 18 g/dL antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o paciente tem contagens de glóbulos brancos (WBC) inferiores a 20000 por mm³ antes da administração do vetor viral.

[00244] A eficácia do método de tratamento pode ser determinada usando uma variedade de testes para habilidades motoras antes e depois do tratamento. Particularmente, o Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND) foi desenvolvido para avaliar as habilidades motoras de pacientes com SMA tipo I. Glanzman et al., "The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): Test development and reliability". *Neuromuscular Disorders*, 20 (3): 155-161. O teste CHOP INTEND foi desenvolvido após a avaliação de 26 bebês com SMA Tipo I, idade média de 11,5 meses (1,4-37,9 meses) com o Test of Infant Motor Performance (TIMP) e o The Children's Hospital of Philadelphia Test of Strength in SMA (CHOP TOSS), uma avaliação motora recém-desenvolvida para a SMA. O teste de tratamento de eficácia não se limita ao teste CHOP INTEND, mas também pode incluir outros testes de habilidades motoras conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitados a TIMP, CHOP TOSS, Peabody Development Motor

Scales, o teste Brazelton Neonatal Behavior Assessment, Motor Milestone Development Survey, Ability Captured Through Interactive Video Evaluation (ACTIVE), a Escala Bayley de Desenvolvimento Infantil e medições de potenciais de ação motores compostos (CMAP).

[00245] Em algumas modalidades, o teste da linha de base antes do tratamento é realizado utilizando a escala CHOP INTEND. Em uma modalidade, a eficácia do tratamento é determinada utilizando a escala CHOP INTEND durante as visitas de acompanhamento. Em algumas modalidades, o CHOP INTEND inclui medidas de controle da cabeça, reações de correção, movimentos do tronco sentado com apoio, posição de supinação e pronação. Em algumas modalidades, o CHOP INTEND inclui medidas de movimentos antigravitacionais em rolamento assistido, suspensão ventral e posição de pé apoiada.

[00246] Em muitos estudos de terapia com gene que envolve vetores de AAV, foi observada uma resposta da célula T específica para o antígeno do vetor de AAV e pode ser esperada entre 2-4 semanas depois da transferência do gene. Uma consequência possível para tal resposta da célula T específica para o antígeno é a depuração das células transduzidas e perda da expressão do transgene. Em uma tentativa de minimizar a resposta imune do hospedeiro à terapia baseada em AAV, os pacientes podem receber imunossupressores. Em algumas modalidades, os pacientes podem receber glicocorticoides antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes podem receber um corticosteroide antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, os pacientes podem receber um esteroide oral antes da administração do vetor viral. Exemplos de esteroides orais incluem, mas não estão limitados a prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, dexametasona e hidrocortisona. Em algumas modalidades, o esteroide oral é ou compreende prednisolona. Em algumas modalidades, o

paciente é tratado inicialmente com esteroide profilático pelo menos 24 horas antes da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o paciente recebe esteroide oral por pelo menos 30 dias depois da administração do vetor viral. Em algumas modalidades, o esteroide oral é administrado uma vez por dia. Em algumas modalidades, o esteroide oral é administrado duas vezes por dia. Em algumas modalidades, o esteroide oral administrado em uma dose de cerca de 0,1 a 10 mg/kg, por exemplo, cerca de 1 mg/kg. Em algumas modalidades, o esteroide oral administrado em uma dose de cerca de 0,1 a 10 mg/kg/dia, por exemplo, cerca de 1 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, os níveis de AST e ALT são monitorados após a administração do vetor viral. Em tais modalidades, o tratamento oral com esteroides é administrado quando os níveis de AST e ALT excedem duas vezes o limite superior do normal, por exemplo, conforme determinado pelos padrões clínicos e métodos conhecidos na técnica, ou cerca de 120 IU/L. Em algumas modalidades, o tratamento oral com esteroides é administrado durante mais de 30 dias desde que os níveis de AST e ALT excedam duas vezes o limite superior do normal, por exemplo, conforme determinado pelos padrões clínicos e métodos conhecidos na técnica, ou excedem cerca de 120 UI/L. Durante o tratamento prolongado com corticosteroides, as glândulas suprarrenais diminuem naturalmente a produção de cortisol. Se o tratamento com corticosteroides for interrompido abruptamente, o organismo pode apresentar deficiência de cortisol. Em algumas modalidades em que o esteroide oral é administrado a um paciente durante pelo menos 30 dias, a dose de esteroide é diminuída lentamente em um esquema. Em algumas modalidades, a dose oral de esteroides é reduzida quando os níveis de AST e ALT caem abaixo do dobro do limite superior do normal, por exemplo, conforme determinado pelos padrões clínicos e métodos conhecidos na técnica, ou cerca de 120 IU/L. Em algumas modalidades, a diminuição inclui reduções

escalonadas para 0,5 mg/kg/dia durante 2 semanas seguidas por 0,25 mg/kg/dia por mais 2 semanas. Em algumas outras modalidades, a redução gradual do esteroide oral ocorre a critério do médico

Kit

[00247] A descrição também fornece um kit para o tratamento de SMA em um paciente necessitado, em que o kit compreende uma ou mais doses de uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade ou dose eficaz de um vetor viral que compreende um polinucleotídeo de SMN aqui descrito e dependendo do tipo de SMA (como adicionalmente aqui descrito) o kit compreende ainda um agente de contraste (por exemplo, omnipaque 180) e instruções sobre como usar a preparação ou composição farmacêutica e o agente de contraste.

[00248] Em algumas modalidades, o kit contém frascos de uma composição farmacêutica de vetor viral. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica de vetor viral está em uma concentração de cerca de $1,7$ a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica de vetor viral está em uma concentração de cerca de $1,9$ a $2,1 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica de vetor viral está em uma concentração de cerca de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL. Em algumas modalidades, os frascos contêm cerca de 5,9 mL de uma composição farmacêutica de vetor viral. Em algumas modalidades, os frascos contêm cerca de 8,7 mL de uma composição farmacêutica de vetor viral. Em algumas modalidades, o kit não contém frascos de 5,9 ml, pelo menos um frasco de 5,9 ml, pelo menos dois frascos de 5,9 ml, ou pelo menos três frascos de 5,9 ml. Em algumas modalidades, o kit não contém frascos de 8,7 ml, pelo menos um frasco de 8,7 ml, pelo menos dois frascos de 8,7 ml, pelo menos três frascos de 8,7 ml, pelo menos quatro frascos de 8,7 ml, pelo menos cinco frascos de 8,7 ml, pelo menos seis frascos de 8,7 ml. frascos.

[00249] Em algumas modalidades onde o kit é usado para o

tratamento de SMA tipo I em um paciente, o peso do paciente é determinado. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o peso do paciente é de pelo menos cerca de 2,6 kg. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o peso do paciente não é superior a cerca de 8,5 kg. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o peso do paciente é de cerca de 2,6 a 8,5 kg. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral AAV dos frascos no kit é administrado ao paciente. Em algumas modalidades onde o kit é usado para o tratamento de SMA tipo I em um paciente, o vetor viral AAV dos frascos no kit é administrado ao paciente em uma dose de cerca de $1,0$ a $2,5 \times 10^{14}$ vg/kg. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral AAV dos frascos no kit é administrado ao paciente em uma dose de cerca de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral AAV dos frascos no kit é infundido no paciente durante cerca de 45-70 min. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral de AAV dos frascos no kit é infundido no paciente durante cerca de 60 min. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral de AAV dos frascos no kit é infundido no paciente utilizando uma bomba de infusão, uma bomba peristáltica ou qualquer outro equipamento conhecido na técnica. Em algumas modalidades em que o kit é usado para tratar SMA tipo I em um paciente, o vetor viral de AAV dos frascos no kit é infundido no paciente utilizando uma bomba de seringa.

[00250] Em uma modalidade, o vetor é administrado por via intravenosa ou intratecal. Em uma modalidade, o vetor é administrado por via intravenosa. Em uma modalidade, o vetor é administrado por via

intravenosa em junto com omnipaque 180. Em outra modalidade, o vetor é administrado por via intratecal junto com omnipaque 180.

[00251] Em outro aspecto, métodos de transdução de células alvo de um paciente (incluindo, mas não se limitando a células nervosas ou da glia) com rAAV são contemplados aqui.

[00252] A transdução de células de um paciente com rAAV aqui descrito pode resultar na expressão sustentada de polipeptídeo ou RNA codificado pelo rAAV. A presente descrição fornece assim métodos de administrar/liberar rAAV (por exemplo, que codifica a proteína SMN) para um animal ou paciente humano. Estes métodos incluem transdução de células nervosas e/ou da glia com um ou mais rAAV. A transdução pode ser realizada com cassetes de gene que compreendem elementos de controle específicos para o tecido. Por exemplo, promotores que permitem expressão especificamente dentro dos neurônios ou especificamente dentro de astrócitos. Exemplos incluem a enolase específica para os neurônios e promotores de proteínas ácidas fibrilares da glia. Promotores induzíveis sob o controle de um fármaco ingerido também podem ser desenvolvidos.

[00253] Em alguns aspectos, é contemplado que a transdução das células é aumentada quando um vetor da descrição é usado em combinação com um agente de contraste como descrito aqui em relação à transdução de um vetor da descrição quando não usado em combinação com um agente de contraste. Em várias modalidades, a transdução de células é aumentada em pelo menos cerca de 1%, ou pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 100%, pelo menos cerca de 120%, pelo menos cerca de 150% %, pelo menos cerca de 200%, pelo menos cerca de 250%, pelo menos cerca de 300%,

pelo menos cerca de 350%, pelo menos cerca de 400%, pelo menos cerca de 450%, pelo menos cerca de 500% ou mais quando um vetor da descrição é usado em combinação com um agente de contraste como aqui descrito, em relação à transdução de um vetor da descrição quando não usado em combinação com um agente de contraste. Em modalidades adicionais, a transdução das células é aumentada em cerca de 10% a cerca de 50%, ou em cerca de 10% a cerca de 100%, ou em cerca de 5% a cerca de 10% %, ou cerca de 5% a cerca de 50%, ou cerca de 1% a cerca de 500%, ou cerca de 10% a cerca de 200%, ou cerca de 10% a cerca de 300%, ou cerca de 10% a cerca de 400 %, ou cerca de 100% a cerca de 500%, ou cerca de 150% a cerca de 300%, ou cerca de 200% a cerca de 500% quando um vetor da descrição é usado em combinação com um agente de contraste como aqui descrito, em relação a transdução de um vetor da descrição quando não usado em combinação com um agente de contraste.

[00254] A descrição também fornece aspectos em que a administração intratecal de um vetor da descrição e um agente de contraste ao sistema nervoso central de um paciente necessitado resulta em um aumento da sobrevivência do paciente em relação a sobrevivência do paciente quando um vetor da descrição é administrado na ausência do agente de contraste. Em várias modalidades, o vetor da descrição e um agente de contraste são administrados separadamente por via intratecal ao sistema nervoso central de um paciente necessitado. Em outras modalidades, o vetor e o agente de contraste são coformulados e administrados por via intratecal ao sistema nervoso central de um paciente necessitado. Em outras modalidades, o vetor e o agente de contraste são fornecidos na mesma embalagem para administração intratecal ao sistema nervoso central ou a um paciente necessitado. Em várias modalidades, a administração de um vetor da descrição e um agente de contraste ao sistema nervoso central de um

paciente necessitado resulta em um aumento da sobrevivência do paciente em pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% %, pelo menos cerca de 100%, pelo menos cerca de 150%, pelo menos cerca de 200% ou mais em relação a sobrevida do paciente quando um vetor da descrição é administrado na ausência do agente de contraste.

[00255] Em alguns aspectos, é contemplado que a transdução de células é ainda aumentada quando um vetor da descrição é usado em combinação com um agente de contraste e quando o paciente é colocado na posição de Trendelenburg (decúbito dorsal com a parte superior do dorso abaixada e pés elevados). Em algumas modalidades, por exemplo, os pacientes são inclinados a cabeça abaixada e pés elevados em cerca de 1 grau a cerca de 30 graus, cerca de 15 a cerca de 30 graus, cerca de 30 a cerca de 60 graus, cerca de 60 a cerca de 90 graus cerca de 180 graus) durante ou após a infusão de vetor intratecal. Em várias modalidades, a transdução de células é aumentada em pelo menos cerca de 1%, ou pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 100%, pelo menos cerca de 120%, pelo menos cerca de 150% %, pelo menos cerca de 200%, pelo menos cerca de 250%, pelo menos cerca de 300%, pelo menos cerca de 350%, pelo menos cerca de 400%, pelo menos cerca de 450%, pelo menos cerca de 500% ou mais quando o vetor da descrição é usado em combinação com um agente de contraste e posição de Trendelenburg como aqui descrito, em relação à transdução de um vetor da descrição quando não usado em combinação com um agente de contraste e a posição de

Trendelenburg.

[00256] Em outras modalidades, a transdução de células é aumentada em cerca de 10% a cerca de 50%, ou cerca de 10% a cerca de 100%, ou cerca de 5% a cerca de 10%, ou cerca de 5% a cerca de 50%, ou cerca de 1% a cerca de 500%, ou cerca de 10% a cerca de 200%, ou cerca de 10% a cerca de 300%, ou cerca de 10% a cerca de 400%, ou cerca de 100% a cerca de 500%, ou cerca de 150% a cerca de 300% ou cerca de 200% a cerca de 500% quando um vetor da descrição é usado em combinação com um agente de contraste e posição de Trendelenburg como aqui descrito, em relação à transdução de um vetor da descrição quando não é usado em combinação com um agente de contraste e posição de Trendelenburg.

[00257] A descrição também fornece aspectos em que a administração intratecal de um vetor da descrição e um agente de contraste ao sistema nervoso central de um paciente necessitado colocado na posição de Trendelenburg resulta em um aumento adicional na sobrevida do paciente em relação a sobrevida do paciente, quando um vetor da descrição é administrado na ausência do agente de contraste e na posição de Trendelenburg. Em várias modalidades, a administração de um vetor da descrição e um agente de contraste ao sistema nervoso central de um paciente necessitado, colocado na posição de Trendelenburg resulta em um aumento da sobrevida do paciente em pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, cerca de 90%, pelo menos cerca de 100%, pelo menos cerca de 150%, pelo menos cerca de 200% ou mais em relação à sobrevida do paciente quando um vetor da descrição é administrado na ausência do agente de contraste e da posição de Trendelenburg.

[00258] Como usado nesta descrição e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um"/"uma" e "o/a" incluem referências no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Opcional ou opcionalmente significa que o evento ou circunstância descrito subsequentemente pode ou não ocorrer, e que a descrição inclui casos em que o evento ou circunstância ocorre e instâncias em que não ocorre. Por exemplo, a frase opcionalmente a composição pode compreender uma combinação significa que a composição pode compreender uma combinação de moléculas diferentes ou pode não incluir uma combinação, tal que a descrição inclua tanto a combinação como a ausência da combinação (isto é, membros individuais da combinação). As faixas podem ser aqui expressas a partir de cerca de um valor particular e/ou de outro valor particular. Quando esse intervalo é expresso, outro aspecto inclui entre um valor particular e/ou a cerca de outro valor particular. Da mesma forma, quando os valores são expressos como aproximações, pelo uso do antecedente cerca de, será entendido que o valor particular forma outro aspecto. Será ainda entendido que os pontos finais de cada um dos intervalos são significativos em relação ao outro ponto final e independentemente do outro ponto final.

[00259] A presente descrição é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitantes. O conteúdo de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido, assim como as Figuras, estão aqui incorporados por referência na sua totalidade para todos os propósitos.

EXEMPLOS

[00260] Os exemplos a seguir devem ser considerados ilustrativos e não limitantes do escopo da descrição acima.

Exemplo 1 – Geração de um Banco de Célula Master Pre-GMP

Métodos

[00261] **Descongelamento:** Um frasco único de células (1×10^6 células) foi descongelado em um banho de água a 37°C durante cerca de 1 minuto e o conteúdo foi diluído em 5 mL de meio de crescimento completo preaquecido. As células foram transferidas para um frasco de $T-25 \text{ cm}^2$ e cultivadas em incubadora a 37°C por 4 dias, com substituição do meio de cultura por meio de crescimento completo preaquecido todos os dias.

[00262] **Seleção para Aumentar a Aderência:** As células foram cultivadas utilizando a seguinte técnica para selecionar células as fortemente aderentes. Quando as células atingiram 95% de confluência no frasco de 25 cm^2 , as células foram subcultivadas. As células foram lavadas com 5 mL de PBS, então dissociadas com 0,5-1 mL de HyQTase durante ~ 2 minutos em temperatura ambiente. A dissociação foi parada pela adição de 5 mL de meio de crescimento completo e pipetada repetidamente para dissociar aglomerados de células. A suspensão celular foi então centrifugada durante 4 minutos a $200 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o pélete celular foi novamente suspenso em 10 mL de meio de crescimento completo. As células foram transferidas para um frasco de 75 cm^2 . Depois de 4 horas de incubação na incubadora a 37°C , as células pouco aderentes foram lavadas por aspiração do meio de cultura celular para remover células pouco aderentes e não aderentes. O meio de cultura foi substituído por 10 mL de meio de crescimento completo preaquecido. Esse processo reduziu a massa celular em até 35% do número de células, pela inspeção visual. As células foram incubadas por mais 2 dias antes de serem subcultivadas novamente. Este processo de seleção, que consiste na troca do meio 4 horas após a semeadura, foi realizado três vezes antes da expansão da população celular selecionada (Figura 2 e Figura 3). Na etapa de seleção final, as células foram semeadas em frascos de $2 \times 175 \text{ cm}^2$, com volume final de 25 mL. Notou-se que houve redução na perda

celular após a última troca de meio 4 horas após a semeadura.

[00263] **Expansão celular:** As células foram subsequentemente expandidas quando as células atingiram a confluência de frascos de $2 \times 175 \text{ cm}^2$. As células foram lavadas com 15 mL de PBS e depois dissociadas com 3 mL de HyQTase e incubadas durante ~ 2 minutos em temperatura ambiente. A dissociação foi interrompida pela adição de 10 mL de meio de crescimento completo. A suspensão celular foi então centrifugada para produzir 2 péletes de células uma vez que o sobrenadante foi aspirado. Cada pélete foi suspenso novamente em 8 mL de meio de crescimento completo e 2 mL desta suspensão de células concentrada foram adicionados a frascos de $8 \times 175 \text{ cm}^2$. Os frascos foram preparados pela adição de 20 mL de meio de crescimento completo, resultando em um total de 22 mL de suspensão celular e uma proporção de divisão de 1:4. A etapa de expansão a seguir utilizou o mesmo procedimento com as seguintes variações: $4 \times 175 \text{ cm}^2$ frascos foram expandidos em uma proporção de divisão de frascos 1:2 e $4 \times 175 \text{ cm}^2$ frascos foram expandidos em uma proporção de divisão de 1:3. Isto resultou em um total de $20 \times 175 \text{ cm}^2$ frascos.

[00264] **Coleta:** As células foram coletadas dos frascos de $20 \times 175 \text{ cm}^2$. As células foram lavadas com 15 mL de PBS e depois dissociadas com 3 mL de HyQTase como previamente descrito. A dissociação celular foi interrompida pela adição de 10 mL de meio de crescimento completo e coletada em tubos de 50 mL com suspensão de células a partir dos frascos de $4 \times 175 \text{ cm}^2$ adicionados a 1 tubo de 50 mL. Isto resultou em tubos de $5 \times 50 \text{ mL}$ com 40 mL de suspensão de células em cada um. Os tubos foram centrifugados para criar péletes de células, os sobrenadantes foram aspirados e as células foram suspensas novamente com 10 mL de meio de crescimento completo resultando em 50 mL de suspensão de células.

[00265] O volume foi dividido em tubos de $2 \times 50 \text{ mL}$, com um total

de 25 mL de suspensão de células em cada tubo. As amostras diluídas 1: 2 foram usadas para calcular contagens de células viáveis por tubo de células usando um hemocitômetro e Toluidine (trypan) Blue. A amostra do tubo 1 tinha uma contagem de células viáveis de $1,99 \times 10^6$ células/mL produzindo uma concentração de células de $3,98 \times 10^6$ células/mL e a amostra do tubo 2 tinha uma contagem de células viáveis de $2,4 \times 10^6$ células/mL (total de 1×10^8 células) produzindo uma concentração celular de $4,8 \times 10^6$ células/mL (total $1,2 \times 10^8$ células). Assim, um total de $2,2 \times 10^8$ células foi coletado. Ambos os tubos foram novamente centrifugados (6 minutos, 200 xg) e os péletes foram suspensos novamente em 10 mL (Tubo 1) e 12 mL (Tubo 2) de meio de congelamento, respectivamente, para ajustar a concentração celular para 1×10^7 células/mL.

As duas suspensões de células foram agrupadas e alíquotas de 1 mL (cada uma contendo 1×10^7 células) foram preenchidas em 22 criotubos estéreis (Tabela 3).

Tabela 3: Cálculo do total de células coletadas

	Concentração Celular para uma amostra 1:2	Concentração Celular para a Coleta	Total células para a Coleta
Tubo 1	$1,99 \times 10^6$ células/mL	$3,98 \times 10^6$ células/mL	1×10^8 células
Tubo 2	$2,4 \times 10^6$ células/mL	$4,8 \times 10^6$ células/mL	$1,2 \times 10^8$ células
Total	-	-	$2,2 \times 10^8$ células

[00266] Os frascos cheios foram então transferidos para uma câmara de congelamento com isopropanol fresco durante a noite em um congelador a -80°C para uma taxa de congelamento controlada. Os frascos congelados foram então transferidos para nitrogênio líquido em fase de vapor em um tanque de nitrogênio líquido. Dez frascos foram transferidos em gelo seco para serem depositados em uma instalação de GMP.

[00267] Células HEK293 da ATCC foram descongeladas e adaptadas com sucesso para maior aderência em 3 passagens antes da expansão e o depósito bem-sucedido de um banco de sementes. O banco de sementes foi testado quanto ao crescimento e presença de agentes adventícios (micoplasma, fungos e bactérias). Os testes mostraram que o banco de sementes é adequado para o Banco de Célula Master em uma instalação de GMP.

Exemplo 2 – Processo a Montante

[00268] Um processo a montante (veja, por exemplo, Figura 4) foi usado para produzir um intermediário derivado de um banco de células de trabalho, em que o processo a montante compreende as etapas de (a) cultivar as células aderentes, (b) transfectar as células cultivadas com três plasmídeos como mostrado na Figura 1 (por exemplo, que compreende AAV SMN aqui descrito) para permitir a produção do vetor viral de AAV, (c) lisar as células aderentes para isolar o vetor viral de AAV, (d) purificar as partículas virais por filtração para remover quaisquer células intactas ou resíduos celulares e (e) submeter o produto purificado de (d) a filtração de fluxo tangencial e (f) congelar a preparação intermediária resultante de partículas virais purificadas. Em modalidades alternativas, o AAV preparado com o processo a montante aqui divulgado codifica um shRNA direcionado para SOD1 ou um MECP2 como aqui descrito.

(a) Cultura de células aderentes

[00269] Células HEK293 foram descongeladas e expandidas através de sete passagens em frascos descartáveis com o uso de incubadoras de CO₂. As células descongeladas foram lavadas com Meio de Expansão e Crescimento Celular, centrifugadas e suspensas novamente com Meio de Expansão e Crescimento Celular fresco. As células ressuspensas foram semeadas em um frasco contendo Meio de Expansão e Crescimento Celular e incubadas. Quando as células

estavam confluentes, foram lavadas com DPBS e removidas dos frascos com solução de enzima TrypLE Select. Meio de Expansão e Crescimento Celular foi adicionado para neutralizar a solução de enzima e as células suspensas foram divididas e novamente semeadas em novos frascos contendo Meio de Expansão e Crescimento Celular. Este processo de expansão foi repetido por 7 vezes. Na última iteração, as células suspensas não foram semeadas novamente frascos, mas a suspensão de células foi inoculada em um biorreator para posterior expansão.

[00270] Um biorreator de célula aderente iCELLis 500/200 m² ou um iCELLis 500/333 m² foi preparado para inoculação antes da inoculação. As atividades de preparação incluíram a retirada do biorreator descartável da embalagem, inspeção física, teste de vazamento, conexão do conjunto de tubulação e equilíbrio da sonda. Meio de Expansão e Crescimento Celular foi carregado para equilibrar o biorreator. Uma vez que o pH (pH 6,9 a 7,5), temperatura (35°C a 39°C) e oxigênio dissolvido (40 a 125%) foram verificados dentro dos intervalos definidos, o biorreator foi semeado em uma densidade de semeadura alvo de 4800 a 7000 células/cm² (para o reator de 200 m²) ou 5000 a 12000 células/cm² (para o reator de 333 m²). A emulsão celular da etapa anterior foi adicionada ao meio em uma bolsa de recirculação de meio e circulada através do biorreator.

(b) Transfecção de células aderentes

[00271] Nos dias 4, 5 ou 6, a partir do momento da inoculação do biorreator, as células HEK293 aderentes foram transfectadas com uma coprecipitação de plasmídeo de DNA triplo PEI. Os 3 plasmídeos usados para esta transfecção são pSMN, pAAV2/9 e pHELP. O meio de crescimento DMEM usado para expansão celular é removido do biorreator e substituído por Meio de Transfecção. O vetor scAAV9.CB.SMN é produzido utilizando transfecção do plasmídeo de

DNA triplo em células Aderentes de Rim Embrionário Humano (HEK293) utilizando uma co-precipitação com polietilenoimina ("PET") em um biorreator de células aderentes em grande escala. O vetor do plasmídeo pSMN contém o cDNA para a proteína de sobrevivência do neurônio motor humana (SMN). Os 3 plasmídeos usados para esta transfecção são pSMN (222 mg), pAAV2/9 (333 mg) e pHELP (444 mg). Os plasmídeos podem ser transfectados em uma proporção de 1:1:1 mol. O meio de transfecção foi deixado equilibrar no biorreator até que a temperatura do biorreator fosse $> 30^{\circ}\text{C}$ antes da adição da coprecipitação de PEI-Plasmídeo. O processo de coprecipitação de PEI-plasmídeo envolve a adição dos plasmídeos ao meio de transfecção e filtração de $0,2\ \mu$ em uma bolsa de reação. PEI foi adicionado ao meio de transfecção e depois a bolsa de reação. A proporção de PEI-plasmídeo é de cerca de 1:1 em peso. A reação de PEI-plasmídeo foi misturada manualmente para formar uma suspensão homogênea e a reação ocorre ao longo de um período de 15 a 30 minutos. No final do tempo de reação, a coprecipitação de PEI-plasmídeo foi transferida da bolsa de reação para o biorreator. A coprecipitação de PEI-plasmídeo foi deixada a misturar no biorreator durante 1-2 horas (durações alternativas são descritas no Exemplo 7) antes de reiniciar a agitação. O Meio de Transfecção foi circulado novamente no biorreator durante 18 a 24 horas antes da próxima mudança de meio.

[00272] No dia 6 do biorreator, 18 - 24 horas depois da transfecção, o biorreator foi drenado e a bolsa de recirculação de Meio de Transfecção foi substituída por Meio Pós-transfecção. O biorreator foi novamente preenchido com meio pós-transfecção com recirculação no biorreator. No dia 7, 18 a 24 horas após a troca de meio no dia 6, o meio pós-transfecção na bolsa de recirculação foi substituído por uma bolsa fresca de meio pós-transfecção. O biorreator não foi drenado durante

esta etapa. A recirculação do meio continua até a coleta, geralmente no dia 9.

(c) Lise das células aderentes transfectadas

[00273] Após 9 dias no biorreator, as amostras finais da pré-coleta foram retiradas do reator e o processo de lise celular total foi iniciado. A benzonase foi adicionada ao biorreator para uma concentração final de 100 U/mL. A benzonase foi deixada a misturar no reator e o tampão de lise foi adicionado ao reator. O tampão de lise foi misturado no reator em 15 -25°C durante 2 horas antes do conteúdo do biorreator ser transferido para a bolsa de coleta. Uma Solução de Sal e Sacarose (SSS) que extingue a reação de benzonase foi adicionada a bolsa de coleta e misturada durante 15 minutos. O biorreator foi então lavado com o tampão de lavagem do biorreator durante 15 minutos e a lavagem foi então coletada na bolsa de coleta, juntamente com a solução de lise celular extinta. Uma vez que o enxágue foi adicionado à bolsa de coleta, o conteúdo foi misturado por 15 minutos e as amostras concentradas removidas.

(d) Preparação das partículas virais pela filtração e filtração de fluxo tangencial

[00274] O concentrado misto coletado foi filtrado através de um filtro de profundidade POD em uma bolsa de coleta. Depois de todo o concentrado coletado ter sido filtrado, o filtro de profundidade foi lavado com tampão de TFF1. O pool de filtros de profundidade foi misturado e amostrado. O pool dos filtros de profundidade foi então filtrado através de um filtro de 0,45 µm para clarificar ainda mais o material concentrado coletado. O filtro de 0,45 µm foi então lavado com tampão de TFF1.

[00275] Para a etapa de TFF1, 5,0 m² de cassetes de membrana de celulose regenerada com ponto de corte de 300 kDa MW foram lavados, desinfetados e equilibrados com tampão de TFF1. A fase de concentração desta operação foi projetada para reduzir o volume da

coleta clarificada em aproximadamente 10x. Uma vez atingido o volume de retentado alvo, a operação de diafiltração é iniciada. O retentado foi diafiltrado com 6 diavolumes de tampão de TFF1. Alternativamente, o retentado pode ser diafiltrado com mais de 6 diavolumes de tampão de TFF1, por exemplo, 10 diavolumes, 12 diavolumes ou 15 diavolumes. Uma vez que 6 diavolumes de fluxo total de permeado foram alcançados, o retentado foi novamente concentrado e coletado em uma bolsa de coleta. Duas lavagens sucessivas da membrana foram executadas para maximizar a recuperação do produto a partir do sistema de TFF para produzir uma substância medicamentosa intermediária.

(e) Congelamento do intermediário

[00276] O intermediário de TFF1 foi aliqotado em frascos de PETG esterilizados de 1 ou 2 litros em uma capela LFH e depois congelado em gelo seco ou em um congelador e transferido para armazenamento a -60°C.

Tabela 4: Tampões usados no Processo a Montante

Nome	Formulação	Usado na(s) Etapa(s) do Processo
Meio de Expansão e Crescimento Celular	DMEM com 10% FBS, 4,5 g/l glicose, 4 mM L-glutamina	Expansão celular, pré-transfecção Biorreator iCELLis
Meio de Transfecção	DMEM sem FBS, sem cálcio, sem L-glutamina e 4,5 g/L glicose	transfecção Biorreator iCELLis
Meio Pós-Transfecção	OptiMEM com 2,3 g/L glicose, 4 mM L-glutamina e sem FBS	pós-transfecção Biorreator iCELLis
Tampão de Lise	500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM MgCl ₂ , pH 8,0	lise celular Biorreator iCELLis
Solução de Sal e Sacarose (SSS)	3700 mM NaCl, 10% Sacarose	Clarificação
Tampão de Lavagem do Biorreator	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Tween 20, 1% Sacarose	coleta no biorreator iCELLis
Tampão de TFF1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Sacarose	Clarificação, TFF1
Tampão de Higienização de TFF1	0,5 M NaOH	higienização da membrana de TFF1

Exemplo 3 – Processo a Jusante

[00277] Um processo a jusante (veja, por exemplo, Figura 5) foi

usado para processar o intermediário de TFF1 para uma substância medicamentosa filtrada. Em algumas modalidades, o processo a jusante aqui descrito pode ser usado para processar um intermediário que compreende um AAV SMN, um AAV MECP2 ou um AAV que codifica shRNA direcionado para SOD1 como aqui descrito. As etapas do processo a jusante incluem: (a) acidificar e clarificar o intermediário (usando filtração), (b) purificar usando cromatografia de troca de cátion, (c) filtrar por filtração de fluxo tangencial ("TFF2"), (d) ultracentrifugar usando tampão de CsCl para separar capsídeos virais cheios e vazios (e) coletar os vetores virais de AAV, e (d) filtrar os vetores virais de AAV coletados com uma segunda etapa de filtração de fluxo tangencial ("TFF3").

(a) Acidificação e Clarificação

[00278] O material intermediário de TFF1 do processo a montante (descongelado em temperatura ambiente se previamente congelado) foi bombeado para uma bolsa com um misturador. O Intermediário de TFF1 agrupado foi misturado e foi retirada uma amostra para determinar o título. O Intermediário de TFF1 agrupado foi imediatamente processado pela adição de 11 a 14% de Tween 20. O Tween 20 foi usado para promover a floculação do concentrado de proteínas e do DNA das células hospedeiras sob condições de pH ácido. A mistura foi deixada incubar durante 12 a 20 horas. O pH foi então diminuído pela adição de Tampão de Acidificação (1 M glicina) para pH 3,3 a 3,7. O precipitado formado após o pH ser baixado foi então removido pela filtração da solução através de um filtro Clarisolve de 1,1 m² e filtros de profundidade Millistak + C0HC de 2,2 m² e filtros de polimento de 0,45 µm. Este processo resultou em Intermediário de TFF Acidificado e Clarificado.

(b) Purificação por cromatografia de troca de cátion

[00279] A etapa de cromatografia de troca de cátion (CEX) foi usada para separar os capsídeos virais de proteínas, DNA e outras impurezas

do processo, por exemplo, lipídeos de células hospedeiras, TWEEN 20. Esta etapa utilizou uma coluna de cromatografia CIMmultus S03-8000 Advanced Composite Column (Sulfonyl) (poros de 0,2 µm) (8,0 L) operada usando um sistema de cromatografia de processo automatizado. Tampões e soluções estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 5: Tampões e soluções para um ciclo de CEX

Nome da solução	Composição	Propósito	Volume (L) para um Ciclo de CEX 8 L
WFI	WFI	Lavagem da coluna	200 L
Tampão A de CEX	50 mM glicina, 500 mM NaCl, 1,0 % sacarose, 0,20 % poloxâmero 188, pH 3,5 ± 0,1 a 20°C	Equilíbrio, lavagem, eluição	256 L
Tampão B de CEX	50 mM glicina, 2,0 M NaCl, 1,0 % sucrose, 0,20 % poloxâmero 188, pH 3,5 ± 0,1 a 20°C	Equilíbrio e eluição da coluna	40 L
Solução de Limpeza Monolítica	1 M NaOH, 2 M NaCl	Higienização da coluna, CIP	96 L
acetato de amônia 1M	1 M acetato de amônia	Restauração pH da coluna	40 L
Tampão de Neutralização pH 9,0	1,0 M Tris pH 9,1 ± 0,1 a 20°C	Ajusto do pH do produto de CEX	0.5 L
Solução de armazenamento	20% Etanol em WFI	Armazenamento da coluna	40 L

[00280] O Intermediário de TFF Acidificado e Clarificado (isto é, Carga de CEX) foi carregado em uma coluna de CEX limpa e equilibrada. As condições eram tais que os vetores virais se ligam à

coluna monolítica. O material não ligado foi lavado da coluna com tampão A de CEX A. O produto foi eluído da resina com um gradiente de tampão B de CEX em tampão A de CEX. A coleta da Fração 1 foi iniciada no começo do gradiente de eluição para 10 volumes de coluna (CV) e um volume definido de 2,3 a 2,7 CV. A coluna de cromatografia foi descartada após cada lote (isto é, a coluna de cromatografia não foi reusada). O produto eluído de CEX (Fração 2) foi então neutralizado utilizando Tampão de Neutralização para um pH de 7,7 a 8,3.

(c) Filtração com Filtração de Fluxo Tangencial (TFF2)

[00281] A etapa de TFF2 concentrou o vetor viral, removeu as impurezas proteicas e trocou o tampão por um tampão apropriado para a etapa de ultracentrifugação com CsCl. O Eluato Neutralizado de CEX foi processado utilizando um sistema TFF equipado com uma membrana de celulose regenerada de 0,3 m² de 300 kDa MWCO.

[00282] O volume do Eluato Neutralizado de CEX foi reduzido para o volume de retentado alvo. Uma vez atingido o volume de retentado alvo, a diafiltração foi iniciada no modo de TFF descontínuo (modo de lote). O retentado foi diluído 2 vezes com Tampão de Diafiltração de TFF2 com NaCl e o retentado é concentrado até ao seu volume inicial. Isto foi repetido até a diafiltração com Tampão de Diafiltração de TFF2 com NaCl estar completa. O retentado foi então diluído 2 vezes com Tampão de Diafiltração de TFF2 CsCl e o retentado foi concentrado até ao seu volume inicial. Isto foi repetido até a diafiltração com Tampão de Diafiltração de TFF2 com NaCl estar completa.

[00283] O retentado foi ainda concentrado até uma massa final com base no título físico do Eluato de CEX Neutralizado, o volume de manutenção do sistema, volume de lavagem do sistema e densidade de retentado até alcançar a concentração de vetor alvo desejada e recuperado em uma bolsa de coleta. Um ciclo de descarga do sistema com Tampão de Diafiltração de TFF2 CsCl foi seguido pela purga do

produto para maximizar a recuperação do produto a partir do sistema de TFF. Uma amostra do retentado de TFF2, que contém o retentado e a lavagem) foi retirada para a medição do título físico. Os cassetes de membrana de TFF2 foram descartados após cada lote (isto é, as membranas de TFF não foram reusadas).

Tabela 6: Tampões para TFF2

Nome da Solução	Composição
Tampão de Diafiltração de TFF2 com NaCl	20 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 150 mM NaCl, 0,2% Poloxâmero 188, 1% Sacarose , pH 8,1 ± 0,1 a 20°C
Tampão de Diafiltração de TFF2 com CsCl	20 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxâmero 188, pH 8,1± 0,1 a 20°C

(d) Ultracentrifugação com CsCl

[00284] O objetivo da etapa de ultracentrifugação foi remover capsídeos vazios de capsídeos cheios utilizando ultracentrifugação com gradiente de cloreto de cério. O retentado de TFF2 foi adicionado a tubos de ultracentrifugação e os tubos foram selados. Os tubos foram colocados em uma ultracentrífuga, como um sistema Optima XPN 100 Ultra Centrifuge automatizado ou sistema equivalente equipado com rotor Tipo Ti 50.2 ou rotor equivalente. Os tubos cheios foram centrifugados a 45.000 rpm durante 22 horas a 20°C.

(e) Coleta dos vetores virais de AAV

[00285] Após a conclusão da etapa de centrifugação, os tubos foram removidos da ultracentrífuga e colocados em um gabinete de biossegurança. Tubos contendo o produto foram montados em suportes de anéis acima de um recipiente de resíduos. Uma lâmpada foi posicionada diretamente sob o tubo para visualizar a banda de capsídeos vazios (Banda A, banda mais alta), as bandas de dubleto de capsídeo completo (Banda B e Banda C, bandas superior e inferior do dubleto) e banda mais baixa abaixo do dubleto (Banda D). Os tubos

foram puncionados com uma agulha acoplada a uma seringa para ventilar os tubos e as bandas B, C e D foram removidas por uma agulha. O material coletado foi transferido para uma bolsa de coleta. O pool ultracentrifugado coletado (UC Pool) foi diluído com Tampão de TFF2 para atingir uma concentração de partida de CsCl consistente no material de carga de TFF2. O UC Pool diluído é processado na etapa de TFF3. O buffer para a etapa de ultracentrifugação com CsCl está listado na tabela abaixo:

Tabela 7: Tampão para Ultracentrifugação com CsCl

Nome da Solução	Composição
Tampão de Diafiltração de TFF2 CsCl	20 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxâmoro 188, pH 8,1 ± 0,10

(f) Filtração com Filtração de Fluxo Tangencial (TFF3)

[00286] A etapa de TFF3 removeu o CsCl e concentrou o vetor completo usando o Tampão de Formulação Final. Um sistema de filtração de fluxo tangencial foi usado em conjunto com 50 cm² de membranas de celulose regeneradas de 300kDa MWCO. O vetor viral foi retido pelas membranas.

[00287] O volume do pool de UC diluído foi reduzido para um volume do retentado alvo. Uma vez atingido o volume alvo, a diafiltração contínua em um volume constante de retentado foi iniciada. O retentado foi diafiltrado com tampão de TFF3. Uma amostra do retentado diafiltrado foi retirada para a medida do título físico. O retentado foi ainda concentrado, para atingir um peso de permeado, que foi calculado pelo 1) volume do retentado no sistema de TFF no final da diafiltração, 2) título físico do Pool de UC Diluído, 3) concentração de substancia do fármaco alvo (DS), 4) volume combinado das lavagens do sistema e lavagens do filtro, e 5) densidade do tampão de TFF3. Os cassetes de membrana de TFF3 foram descartados após cada lote (isto é, os cassetes não são reusados).

Tabela 8: Tampões para TFF3

Nome da Solução	Composição
Tampão de TFF3 opção 1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxâmero 188, pH 8,0 ± 0,1 a 20°C
Tampão de TFF3 opção 2	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,005% Poloxâmero 188, pH 8,0 ± 0,1 a 20°C

[00288] Foram realizadas duas lavagens sucessivas de 20 mL das membranas de TFF com o tampão de TFF3 para recuperar o vetor do sistema de TFF. As lavagens foram recuperadas através de um Pall Suport® Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade Filter 0,2 mm (Mini Kleenpak). Foi realizada uma lavagem do filtro com Tampão de TFF3 para recuperar qualquer vetor remanescente no filtro e para ajustar o volume final do Pool de TFF3 Filtrado (isto é, Substância do fármaco DS). A DS foi aliqotada em frascos PETG de 125 ou 250 mL e congelada a < -60°C.

Exemplo 4 – Formulação e Preenchimento

[00289] O Produto Farmacológico (DP) era uma infusão intravenosa em uma única dose, sem conservantes, estéril, clara a ligeiramente opaca e incolor a quase branca, de vetor de AAV9 não replicante, autocomplementar em uma concentração alvo de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL. O DP continha Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 200 mM, Poloxâmero 188 0,005% p/v. O intervalo de pH da solução era de 7,7 a 8,3.

Tabela 9: Operação da Unidade do Produto farmacológico – Composição do Tampão

Nome da Solução	Composição
Tampão de Formulação Produto Farmacológico (DP) opção 1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxâmero 188, pH 8,0 ± 0,1
Tampão de Formulação Produto Farmacológico (DP) opção 2	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,005% Poloxâmero 188, pH 8,0 ± 0,1

[00290] DP foi colocado em frascos de 10 ml Cristal Zenith (CZ) esterilizados, prontos para uso, fechados com rolhas de elastoméricas de clorobutila estéreis, prontos para uso, e selados com lacres de alumínio destacáveis estéreis de 20 mm. Os frascos foram preenchidos com um volume de enchimento nominal de 5,5 mL ou 8,3 mL. O excesso de alvo foi de 0,4 mL e os frascos foram cheios até $5,9 \pm 0,1$ mL ou $8,7 \pm 0,1$ mL.

Exemplo 5 – Ensaio de Potência

[00291] A potência relativa do produto foi medida usando um ensaio quantitativo in vivo. O ensaio usou um modelo estabelecido de camundongo com a doença SMA. Os pares reprodutores da cepa de camundongo SMA Δ 7 (Jackson Laboratories, # 005025) são fenotipicamente normais, mas ~ 25% da sua descendência é homozigótica para a mutação do gene SMN alvo e apresentam o fenótipo semelhante a SMA. No Dia 5, eles mostram sinais de fraqueza muscular e, na semana seguinte, desenvolvem uma marcha anormal e uma tendência a cair. Laboratórios de Jackson relatam a sobrevida média para animais com o fenótipo semelhante a SMA como de $\sim 15 \pm 2$ dias. Estudos piloto demonstraram um tempo médio de sobrevida para animais não tratados com fenótipo semelhante a SMA de 16,3 dias (média geométrica: n = 3 estudos; 10 camundongos por estudo).

[00292] O medicamento biologicamente ativo administrado por infusão intravenosa (IV) produz um aumento no tempo de sobrevida que é uma função da dose (vg/kg). A potência do produto farmacológico foi medida em relação ao material de referência (lote anterior de vetor). O título produto farmacológico e do material de referência (genomas de vetor/mL; vg/mL) foi determinado pela reação em cadeia da polimerase Droplet Digital (ddPCR). O vetor foi diluído em salina para atingir cada um dos três níveis de dose especificados que serão administrados a camundongos com o fenótipo semelhante a SMA.

[00293] Os resultados de um ensaio são considerados aceitáveis se o ensaio passar adequação. A adequação do ensaio consiste no seguinte:

1. Limite de aceitação para a amostra de Controle Negativo (15 ± 2 dias Sobrevida Média)
2. Limite de aceitação para a amostra de Controle Positivo (> 40 dias, Sobrevida Média)
3. Limites de aceitação no padrão de referência da curva dose-resposta da Sobrevida Média

[00294] Um lote de vetor anterior (daqui por diante, Lote Anterior) foi usado neste estudo para determinar a correlação linear entre a sobrevida média (dias) de camundongos SMA Δ 7 quando tratados com o produto farmacológico (daqui por diante, Lote de Amostra) em cinco níveis diferentes de dose incluindo a dose 0 (zero) usando solução salina a 0,9% (grupo não tratado). A Tabela 10 mostra a curva de calibração usando o Lote Anterior como lote de referência.

Tabela 10: Curva de Calibração que usa Cinco Níveis de Dose de AVXS-101

Referência Padronizada Lote Anterior ao Longo do Tempo

Dose (vg/kg)	Sobrevida Média (dias)						
	0 Meses			3 Meses			6 Meses
	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata
	1	2	3	1	2	1	1
	n=44	n=32	n=38	n=21	n=21	n=21	n=22
0	15	16	15	15	14	16	~16
1,21E+13	24	23	25	21	21	21	22
7,38E+13	31	29	27	29	29	ND	28
1,18E+14	ND*(>103)	ND*(>115)	79	---	---	---	---
2,94E+14	ND*(>131)	---	---	ND*(>47)	ND*(>47)	ND*(>37)	ND*(>41)

* Não Determinado (ND) – Sobrevida Média (dias) não pode ser atingida como a de 24AGO2017

[00295] Os dados deste estudo demonstraram que o intervalo linear da curva de resposta-dose da sobrevida média foi de 0 a 7,4 vg/kg. A

potência relativa do Lote de Amostra do produto farmacológico foi estabelecida pela comparação da curva de regressão linear do padrão de referência do Lote Anterior com a curva de regressão linear do Lote de Amostra do produto farmacológico. Isto foi obtido usando a proporção entre o intercepto de y e a inclinação de cada linha de regressão linear (isto é, Padrão de Referência e Artigo de Teste). O cálculo do percentual da Potência Relativa é delineado na equação (1) abaixo:

$$\%RP = [(\text{intercepto } y / \text{inclinação do Artigo de Teste}) : (\text{intercepto } y / \text{inclinação do Artigo de Referência})] \times 100 \quad (1)$$

[00296] O Lote Anterior usado no ensaio clínico de Fase 1 foi usado como lote do Padrão de Referência e foi atribuído com uma potência de 100%.

[00297] Os dados anteriores estabeleceram os critérios de aceitação preliminar do ensaio usando a porção linear da curva de dose-resposta da sobrevida média para determinar a potência relativa dos lotes clínicos do medicamento, como a seguir:

[00298] • Curva dose-resposta da sobrevida média (dias) foi gerada usando 5 níveis de dose (vg/kg)

[00299] • Doses de 0, 1,2E+13 e 7,4E+13 foram selecionadas pela corrida do modelo linear de resposta a dose

[00300] • Limites de adequabilidade para salina (grupo não tratado) foram de 13 a 17 dias de sobrevida média

[00301] • Limites de adequabilidade para a amostra do padrão de referência foram estabelecidos como:

[00302] o Inclinação $\geq 2,0E-13$

[00303] o Intercepto y $\geq 16,00$ dias

[00304] o Proporção Intercepto y/Inclinação $\geq 8,5E+13$

[00305] o $R^2 \geq 0,7$

[00306] O modelo de camundongo $\Delta 7$ foi usado para demonstrar a

eficácia da terapêutica de SMA, incluindo o produto farmacológico. Com uma sobrevida média de 15 dias $\pm$ 2 dias, os animais de controle tratados com Solução de Tampão de TFF3 (veículo) fornecem um controle de referência confiável a partir do qual a potência do produto pode ser medida como um aumento da sobrevida média. O trabalho de desenvolvimento com o produto farmacológico identificou três (3) doses (excluindo a dose com veículo) determinadas por Título Genômico usando Droplet Digital PCR (ddPCR) que afetam a sobrevida no modelo de camundongo com uma correlação linear quando a dose administrada (vg/kg) é transformada em log e representada em gráfico contra Sobrevida Média (em dias) do camundongo neonato SMA Δ 7 tratado. Veja os títulos padronizados (vg/mL) na Tabela 11 para os padrões de título baixo, médio e alto. Além disso, a solução TFF Buffer (veículo) é usada para o ponto zero (0) da curva de calibração assim como um Controle Negativo. Uma dose que demonstra $\geq$ 40 dias de sobrevida (maior que a dose que demonstra a duplicação da sobrevida média) também foi incluída como um Controle Positivo.

Tabela 11: Doses-Alvo

Dose (vg/kg)	Sobrevida Média (dias)	Padrões e Controles
Solução de Tampão de TFF3 (Veículo)	15 $\pm$ 2	Controle Negativo (não tratado)
1,10x10 ¹⁴	$\geq$ 40 dias de Sobrevida Média	Controle Positivo
1,00x10 ¹²	16 $\pm$ 2	Padrão1
1,2x10 ¹³	22 $\pm$ 3	Padrão-2
7,5x10 ¹³	31 $\pm$ 3	Padrão-3

[00307] Preparações da Solução da Dose (consulte a Tabela 12 para o exemplo de esquema de diluição)

[00308] - Controle Negativo – A Solução de Tampão de TFF3 (tampão de formulação final do Produto farmacológico) é usado como Controle Negativo

[00309] - Controle Positivo – O lote do Artigo de Teste é preparado em $1,10 \times 10^{14}$ vg/kg usando Solução de Tampão de TFF3. Veja a Tabela 12 para o exemplo de esquema de diluição.

[00310] - Soluções Padronizadas de Referência – O lote Padronizado de Referência é preparado em três concentrações ilustradas na Tabela 11 usando a Solução de Tampão de TFF3.

Tabela 12: Esquema de Diluição do Padrão de Referência e do Artigo de Teste (Exemplo)

Dose (vg/kg)	Padrão Referência /Artigo de Teste Título por ddPCR (vg/mL)	Conversão para vg/ μ L	Padrão Referência /Artigo de Teste volume de uso (μ L)	Solução Salina (μ L)	Volume Total da Dose (μ L)
$1,2 \times 10^{13}$	$5,0 \times 10^{13}$	$5,0 \times 10^{10}$	2,6	47,4	50,0

[00311] Preparação do Artigo de Teste – O artigo de teste foi diluído utilizando a Solução de Tampão de TFF3. As diluições foram calculadas para gerar as doses de teste (vg/kg) mostradas na Tabela 11 por camundongo em um volume final total de 50 μ L. As diluições foram feitas para 12 camundongos no momento com um volume extra como um Controle Positivo direcionado para aumentar o tempo de vida mínimo dos camundongos tratados para ≥ 40 dias de Sobrevida Média (dias).

[00312] Limites de aceitação em amostras de controle

[00313] - Controle Negativo (camundongos não tratados) – O ensaio do limite de aceitação para o grupo de Controle Negativo foi que os camundongos SMA Δ 7 atingiram a sobrevida média de 15 ± 2 dias. Adicionalmente, qualquer camundongo que morra em $\leq$ de 10 dias será excluído da análise

[00314] - Controle Positivo (grupo tratado com a dose clínica alvo) -- O limite de aceitação do ensaio para o grupo de Controle Positivo, com uma longevidade mínima dos camundongos tratados, foi de ≥ 40 dias. Adicionalmente, qualquer camundongo que morra em $\leq$ de 10 dias será

excluído da análise

[00315] Limites de aceitação da curva dose-resposta do Padrão de Referência

[00316] Os critérios de adequabilidade do ensaio serão determinados para a curva dose resposta linear do padrão de referência representando em gráfico a Sobrevida Média (dias) contra a dose administrada (vg/mL). Veja a Tabela 13 para os critérios de adequabilidade do ensaio.

Tabela 13: Critérios de Adequabilidade do Ensaio (Curva Dose-resposta Linear do Padrão de Referência)

Lote Testado	Inclinação	Intercepto	Proporção Intercepto/ Inclinação	R ²	Potência Designada
Padrão de Referência	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,5$	$\geq 8,5 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	100,0
Artigo de Teste	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,0$	$\geq 8,0 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	-

[00317] Proporção da Intercepto de y/Inclinação – Uma curva de regressão linear da Sobrevida Média (dias) versus a dose administrada (vg/kg) para o Padrão de referência e o Artigo de teste é determinada. A proporção do intercepto y para a inclinação para cada regressão linear é calculada.

Relatório dos Resultados

[00318] Relatório Qualitativo dos Resultados de Potência Relativa - Os critérios de Adequação do Ensaio são avaliados para cada ensaio antes da determinação de um único ponto de Sobrevida Média (dias) lidos em ≥ 40 dias para o material de Controle Positivo. Se a Sobrevida Média do grupo de Controle Positivo for de 5 a 40 dias, o Artigo de Teste poderá ser disposto se os critérios abaixo forem atendidos.

[00319] Relatório Quantitativo dos Resultados da Potência Relativa - Os critérios de Adequabilidade do Ensaio são avaliados para cada ensaio antes da determinação quantitativa da Potência Relativa para o

Artigo do Teste. Potência relativa para o artigo do teste pode ser relatada uma vez que o controle Positivo alcance ≥ 40 dias e a Sobrevida Média de 31 ± 3 dias para o grupo de camundongos que representa a dose padronizada superior de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg seja alcançada. O Percentual de Potência Relativa (% RP) para um Artigo de Teste será calculada usando o intercepto y e a inclinação da regressão linear da dose-resposta da Sobrevida Média (dias) como a seguir:

$$\%RP = 100\% * [(intercepto \ y \ \text{Artigo de Teste} / \text{inclinação}) \div (intercepto \ y \ \text{Padrão de Referência} / \text{inclinação})]$$

Exemplo 6: Estudo de Inativação com Tensoativo

[00320] Para separar a influência do pH baixo e de tween, foi usada uma amostra do Intermediário de TFF1 da substância medicamentosa que tem um pH de 7,6 e 4-8% de Tween-20 para o estudo de inativação com tensoativo. A concentração de Tween-20 no Intermediário de TFF1 é de cerca de 2,5 vezes menor do que no processo completo quando o Tween-20 é adicionado ao Intermediário de TFF1 antes da acidificação. Essa menor concentração de Tween-20 foi considerada a pior condição para a inativação causada pelo tensoativo no processo da substância medicamentosa. O artigo de teste para a etapa de inativação do vírus pelo tratamento com tensoativo foi o Intermediário de TFF-1 contendo Tween-20 4-8%. Para avaliar a capacidade de inativação do vírus pela etapa de tratamento com tensoativo, XMuLV e PRV foram usados para aumentar o pico do artigo de teste com o vírus em experimentos em duplicata. O vírus foi quantificado utilizando um ensaio de infectividade de formação de placa.

[00321] A etapa de fabricação de TFF1 gera uma faixa de concentração de tensoativo de 4-8% Tween-20. O intermediário TFF1 foi agrupado e foi adicionado 12% mais de Tween-20 ao intermediário de TFF1 a uma temperatura de funcionamento de 16-20°C com

misturação por uma duração de 12-20 horas. O processo de depuração viral foi realizado em uma concentração de 4 a 8% de Tween-20 e a uma temperatura controlada de $16,0^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. A duração do processo de inativação foi de 120 minutos versus o tempo típico do processo de 16 horas.

[00322] Para o processo de inativação, a carga de ativação foi preparada pela medida do volume do artigo de teste, equilibrando até a temperatura alvo e então spiking com vírus. Amostras da carga de inativação spike foram removidas em seis (6) pontos de tempo para demonstrar a cinética de inativação ao longo do tempo: <1 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos. Após a coleta, cada amostra foi diluída em meio de crescimento para interromper a inativação do vírus e foi testada quanto ao vírus. Para aumentar a sensibilidade do ensaio aos 90 minutos e aos 120 minutos, grandes volumes destas amostras de ponto de tempo foram também ensaiados quanto ao vírus. Devido à presença de Tween-20 no artigo de teste para esta etapa, o título da carga de inativação foi calculado a partir do título do enriquecimento do vírus de spiking e do volume de vírus enriquecido.

[00323] A eficácia da inativação do vírus pelo tratamento com tensoativo (Tween-20) mostrou ser eficaz como evidenciado pelos valores de LRV superiores a 4 log 10 para ambos os vírus no ponto de tempo de 90 minutos. A cinética da inativação pelo tratamento com tensoativo está ilustrada na Figura 6 e na Figura 7 como gráficos da taxa de inativação do vírus ao longo de 120 minutos durante o tratamento com tensoativo Tween-20.

Exemplo 7: Efeito da Maior Densidade de Semeadura, Transfecção e coleta Precoce e Tempos de Mistura de DNA/PEI sobre a Produção da Substância do Fármaco

[00324] O efeito da maior densidade de semeadura, transfecção e

coleta um dia antes e tempos de mistura de DNA/PEI na produção de DS foi avaliado. Cada condição foi avaliada em duplicata em um biorreator de 1,6m².

MATERIAIS E MÉTODOS

Amplificação Celular

[00325] As células HEK 293 foram descongeladas e ressuspensas em DMEM suplementado com FBS 10%. As células foram centrifugadas a 209 x g, 5 min, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e foi adicionado DMEM fresco + FBS a 10%. As células foram contadas quanto a densidade de células viáveis e a viabilidade e foram semeadas em frascos de 2 x T175 cm² e incubadas a 37,0°C, 5% CO₂ durante três dias até que as culturas atingiram ~90% de confluência. Para cada passagem celular, o meio gasto foi removido, os frascos foram lavados com PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) a 0,08 mL/cm² e depois os frascos foram tratados com TrypLE Select (0,04 mL/cm²) e incubados. a 37,0°C, 5% CO₂ durante 2-3 min. A tripsina foi extinta com DMEM + 10% de FBS (0,04 mL/cm²). As células foram expandidas e semeadas de acordo com o diagrama da Figura 8.

Inoculação e Monitorização Celular

[00326] Os biorreatores foram inoculados em duplicata com células HEK 293 em uma densidade alvo de 8.000 células/cm² e 12.000 células/cm² em meio de crescimento (DMEM com glicose elevada + 10% de FBS de Origem Australiana + 1:100 Penicilina Estreptomicina (Pen Strep) com agitação. Os parâmetros do processo foram ajustados para pH 7,23, 37,0°C, 55% de oxigênio dissolvido (DO) e velocidade linear de 2 cm/s. 24 horas após a semeadura, a recirculação com meio de crescimento DMEM (0,188 mL/cm²) foi ligada a uma velocidade de recirculação (12,5 mL/min). Amostras diárias tomadas para pH, metabolitos e nutrientes off-line foram lidas usando Nova BioFlex. No dia quatro (12.000 células/cm²), dia cinco (8.000 células/cm²) e dia nove

após a semeadura, três fibras foram removidas e lisadas com uma solução 1:1:1 v/v PBS, A100 e B100 o (ChemoMetec) e contadas (NudeoCounter NC-200) para núcleos totais para monitorar o crescimento da cultura.

Transfecção

[00327] Dia quatro (12.000 células/cm²) e dia cinco (8.000 células/cm²) após a inoculação das células, a recirculação foi interrompida e as células em cada biorreator foram transfectadas com plasmídeo de DNA e polietilenoimina (PEI). O DNA e o PEI foram misturados em uma proporção de 1:1 mg/mg. Os DNA de plasmídeo foram transfectados em uma proporção em massa de 1:1,5:2 com o plasmídeo pSMN, o plasmídeo pAAV2 / 9 e o plasmídeo pHELP foram adicionados a meio DMEM - / -; glicose elevada, -CaCl₂, - L-glutamina e 0,2 µM filtrados e misturados por inversão. PEI foi adicionado ao meio DMEM - / - e misturado por inversão. PEI foi então adicionada ao DNA, misturada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos para as 8.000 células/cm² (controle) e 12.000 células/cm². DNA/PEI foi incubado por 1 hora e 2 horas para as outras duas condições de 8.000 células/cm². Esta mistura de complexo de DNA/PEI foi usada para transfectar dois biorreatores para cada uma das quatro condições. O complexo DNA/ PEI foi adicionado a cada biorreator e incubado nos parâmetros do processo durante duas horas. Duas horas após a transfecção, o ciclo de recirculação foi ligado novamente.

Troca de Meio Pós-Transfecção

[00328] 24 horas após a transfecção, todos os meios nos biorreatores e alças de recirculação foram removidos e substituídos por OptiMEM + 1:100 Pen Strep (0,132 mL/cm²) e circulado novamente por 24 horas nos parâmetros do processo. 48 horas após a transfecção todos os meios retirados da recirculação e substituídos por OptiMEM + 1:100 Pen Strep (12 mL/min) e circulado novamente nos parâmetros do

processo.

Coleta

[00329] No Dia oito (12.000 células/cm²) e dia nove (8.000 células/cm²) após a inoculação celular, Benzonase (100 U/mL) foi adicionada, seguida por tampão de lise (50 mM HEPES, 1% Tween 20), e incubada por duas horas nos parâmetros do processo. Os biorreatores foram drenados e a Solução Salina de Sacarose (500 mM NaCl, sacarose 1% p/v) foi adicionada e estas foram misturadas por inversão. Os biorreatores foram lavados com tampão de lavagem de biorreator (500 mM NaCl, sacarose 1% p/v, Tris Base 20 mM, Tween 20 1% v/v, 1 mM MgCl₂.6H₂O) durante cerca de 15 min nos parâmetros do processo. Os biorreatores foram drenados e o tampão de lavagem do biorreator foi misturado com o coletado concentrado bruto, misturado por inversão e amostrado para o ensaio de ddPCR.

Filtração em Profundidade e Filtração de Fluxo Tangencial

[00330] No dia oito (12.000 células/cm²) e no dia nove (controle de 8.000 células/cm²), após a inoculação celular, os biorreatores foram coletados, amostrados e o lisado bruto foi agrupado para cada condição (n = 2 biorreatores). O lisado agrupado foi então clarificado através de Millistak C0HC Pod, filtro de 270 cm² e filtro de polimento de 200 cm² Millipak 40, 0,45 µm, Durapore, (EMD Millipore). As amostras foram coletadas após C0HC + 0,45 e congeladas a -80,0°C. O lisado clarificado foi então concentrado através de um filtro de fluxo tangencial Pellicon® 2 Ultrafiltration Module PLCKM C 0,1 m² (EMD Millipore). Pelo menos 6 diavolumes foram usados para diafiltrar o produto final. As amostras após a filtração de TFF1 foram obtidas e congeladas -80,0°C. Todas as amostras foram submetidas a titulação de AAV2/9 e de proteína da célula hospedeira.

[00331] Plasmídeos foram usados para produzir DS em biorreatores. Os dados representam cada condição em duplicata, correspondendo ao

número e condição do biorreator mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Números de biorreatores e condições correspondentes

Número Biorreator	Densidade da Semeadura células/cm ²	Dia da transfecção	Tempo de Incubação com PEI/DNA (min)	Dia da Coleta
221, 222	12.000	4	20	8
223, 224*	8.000	5	20	9
225, 226	8.000	5	60	9
227, 228	8.000	5	120	9

[00332] **Crescimento celular:** As células foram contadas no dia da semeadura (Dia 0) e os núcleos foram contados no dia 4 (12.000 células/cm²), no dia 5 (8.000 células/cm²) e no dia 9 após a semeadura. Os dados indicam que as células em todos os reatores cresceram exponencialmente entre o dia 0 e o dia 5. Após a transfecção, o número de núcleos no dia 9 sugere que nos biorreatores 221 o total de núcleos aumentou 2,0 vezes do dia 5 ao dia 9. Todos os outros reatores (222 a 228) não apresentaram crescimento significativo entre o dia 5 e o dia 9. O aumento do crescimento no biorreator 221 pode ser um artefato baseado na distribuição desigual de células em fibras individuais usadas para as contagens do total de núcleos. É possível que as células em todos os biorreatores tenham crescido de forma semelhante com base nos dados de metabolitos mostrados nas Figuras 9A-E.

[00333] **pH, Nutrientes e Metabolitos:** O consumo de glicose foi o mesmo em todas as culturas de biorreatores, sugerindo que, apesar do aumento na curva de crescimento do biorreator 221, as células consumiram glicose em taxas semelhantes. O pH para biorreatores semeados com 12.000 células/cm² era em média 7,06 e para 8.000 células/cm² era em média de 7,1 8 durante os primeiros três dias. O pH declinou ligeiramente com o aumento do metabolismo de nutrientes e aumentou no dia 9 concomitante com o aumento nos níveis de íon de

amônia. O lactato aumentou até o dia 5 (biorreatores 221, 223, 224, 225, 227) e o dia 6 (biorreatores 222, 226, 228) e então estabilizou em direção ao final da produção, sugerindo o uso de lactato como fonte de energia neste estágio.

[00334] **Títulos de Produção.** Os genomas virais do material coletado foram medidos por digital droplet (ddPCR). Os títulos foram cerca de 1,5 vezes maiores em biorreatores semeados com 12.000 células/cm² com um título médio de 6,37E+10 vg/mL (n = 2) vs. biorreatores de controle semeados com 8.000 células/cm² com um título médio de 4.33E+10 vg mL (n = 2). Dados de título sugerem que a semeadura em uma maior densidade, transfectando e coletando um dia mais cedo suporta maiores rendimentos de produção de DS. O rendimento do título para DNA/PEI incubado por uma hora exibiu uma diminuição de 1,4 vezes na média do título medido (3,17E10 vg/mL n = 2) e para uma incubação de duas horas o título medido foi 1,6 vezes menor (2,67E10 vg/mL n = 2) comparado ao controle no qual o DNA/PEI foi incubado por 20 minutos (4.33E10 vg/mL n = 2). Os dados sugerem que o tempo de incubação mais longo leva a uma diminuição do título. Isto pode ser devido ao DNA e PEI que formam grandes complexos que são incapazes de transfectar eficientemente as células HEK293. A produção de vírus por mL e os valores de área superficial são apresentados na Figura 10, em comparação com a produção em um processo conhecido como um controle positivo.

[00335] O título viral medido em cada etapa das etapas de clarificação e concentração é mostrado na Figura 11. A proteína residual da célula hospedeira em cada etapa durante a etapa de TFF1 é mostrada nas Figuras 12A-B.

Exemplo 8: Efeito da Densidade da Semeadura sobre a Produção da Substância do Fármaco

[00336] O efeito da densidade da semeadura sobre a produção de

DS foi avaliado. Quatro densidades de semeadura foram avaliadas e cada densidade de semeadura estava em duplicata em um biorreator.

Expansão Celular

[00337] As células HEK 293 foram descongeladas e ressuspensas em DMEM suplementado com FBS 10%. As células foram centrifugadas a 209 x g, 5 min, em temperatura ambiente, depois o sobrenadante foi removido e DMEM fresco + FBS 10% foram adicionados. As células foram contadas quanto a densidade de células viáveis e a viabilidade e foram semeadas em frascos de 2 x T175 cm² e incubadas a 37,0°C, CO₂ 5% durante quatro dias até que as culturas atingissem ~ 90% de confluência. Para cada passagem celular, o meio gasto foi removido, os frascos foram lavados com PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) em 0,08 mL/cm², e depois frascos tratados com TrypLE Select (0,04 mL/cm²) e incubados a 37,0°C, CO₂ 5% durante 2-3 min. A tripsina foi extinta com DMEM + FBS 1% (0,04 mL/cm²). As células foram expandidas e semeadas de acordo com o diagrama da Figura 13.

Inoculação e Monitoração Celular

[00338] Os biorreatores foram inoculados com células HEK 293 em quatro densidades alvo, cada uma em duplicata: 8.000 células/cm², 9.350 células/cm², 10.700 células/cm² e 12.050 células/cm² em 700 ml meio de crescimento (DMEM rico em glicose + FBS 10% de Origem Australiana + 1:100 Pen Strep) com agitação. Os parâmetros do processo foram ajustados para pH 7,23, 37,0°C, 55% de oxigênio dissolvido (DO) e velocidade linear de 2 cm/s. 24 horas após a semeadura, a recirculação com meio de crescimento DMEM (volume total agora 0,188 mL/cm²) foi ligada em uma velocidade de recirculação (12,5 mL/min). Amostras diárias foram coletadas para a medida do pH off-line, metabolitos e nutrientes foram lidos usando Nova BioProfile 400. No dia cinco e dia nove após a semeadura, três fibras foram removidas e lisadas com uma solução 1:1:1 v/v de PBS, A100 e B 100

(ChemoMetec) e contadas (NucleoCounter NC-200) quanto ao total de núcleos para monitorar o crescimento da cultura.

Transfecção

[00339] No dia cinco após a inoculação das células, a recirculação foi interrompida e os meios dentro de cada câmara do biorreator (sem frasco de recirculação) foram substituídos por 600 ml de meio DMEM -/- (rico em glicose, -CaCl₂, - L-glutamina). Cada reator foi transfectado com plasmídeo de DNA e Polietilenoimina (PEIpro) em uma proporção de massa de 1:1. Os plasmídeos de DNA foram misturados em uma proporção em massa 1:1,5:2 (pSMN – 3,56 mg, pAAV2/9 – 5,34 mg, e pHELP – 7,1 mg), adicionados a 300 mL de meio DMEM -/-, filtrados 0,2 µM e misturado por inversão. PEI (16 mL) foi adicionado a 300 mL de meio DMEM -/- e misturado por inversão. As misturas de PEI e DNA foram combinadas, misturadas por inversão e incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Cada mistura de 600 ml de complexo PEI/DNA foi usada para transfectar dois Biorreatores, repetidos para cada densidade de semeadura correspondente. O complexo PEI/DNA foi adicionado a cada biorreator e incubado nos parâmetros do processo durante duas horas. A alça de recirculação foi religada duas horas depois da transfecção (12,5 mL/min).

Troca de meio após a transfecção

[00340] 24 horas após a transfecção, todos os meios nos biorreatores e alças de recirculação foram removidos e substituídos por OptiMEM (0,132 mL/cm²) e circulados novamente (12,5 mL/min) por 24 horas nos parâmetros do processo. 48 horas depois da transfecção, o meio no frasco de recirculação foi trocado com OptiMEM fresco e circulado novamente nos parâmetros do processo (12 mL/min).

Coleta

[00341] Dia 9 pós inoculação celular, benzonase (100 U/mL) foi adicionada, seguida por tampão de lise (HEPES 50 mM, Tween 20 1%),

e incubada por duas horas nos parâmetros do processo. Os biorreatores foram drenados e a Solução de Sal de Sacarose (NaCl 500 mM, 1 sacarose 1% p/v) foi adicionada, misturada por inversão. O biorreator lavado com tampão de lavagem de biorreator (NaCl 500 mM, 1 sacarose 1% p/v, Tris Base 20 mM, Tween 20 1% v/v, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM) durante 15 min nos parâmetros do processo. Biorreatores drenados e tampão de lavagem de biorreatores foram agrupados com a coleta concentrada bruta, misturados por inversão e amostrados para o ensaio por ddPCR. Os plasmídeos foram usados para produzir a Substância do Fármaco em Biorreatores. Os reatores foram semeados em diferentes densidades, e transfectados e coletados no mesmo esquema (dia 5, dia 9 após a semeadura, respectivamente). Os dados representam duplicatas de cada densidade de semeadura, conforme mostrado na Tabela 15 abaixo:

Tabela 15: Densidade Inicial da Semeadura do Biorreator Número

8.000 células/cm ²	221, 222
9.350 células/cm ²	223, 224
10.700 células/cm ²	225, 226
12.050 células/cm ²	227, 228

Crescimento Celular:

[00342] As células foram contadas no dia da semeadura (Dia 0) e os núcleos foram contados no dia 5 e 9 após a semeadura. Os dados indicam que as células em todos os reatores cresceram exponencialmente entre o dia 0 e o dia 5. Apesar das diferenças nas densidades de semeadura de partida, as contagens de núcleos não indicam grandes diferenças nos números celulares entre os grupos no dia 5. Após a transfecção, a contagem do número de núcleos no dia 9 sugere que cinco dos reatores (221, 224, 225, 226, 228) dobrou no total de núcleos do dia 5 ao dia 9. Dois reatores (222, 223) aumentaram 1,4 vezes no total de núcleos como mostrado na Figura 14A. O reator 227 aumentou 3,8 vezes no total de núcleos do dia 5 ao dia 9. Essa diferença

pode ser um artefato baseado na distribuição desigual de células em fibras individuais usadas para as contagens. É possível que as células em todos os biorreatores tenham crescido de forma semelhante com base nos dados de metabolitos mostrados nas Figuras 14B-E.

pH, Nutrientes e Metabolitos:

[00343] O consumo de glicose (Figura 14B) foi o mesmo em todos os biorreatores de cultura, sugerindo que, apesar das diferenças nas densidades de semeadura de partida, as culturas consumiram glicose em taxas semelhantes. O pH offline (Figura 14C) permaneceu consistente (pH 7,25) pelos primeiros três dias em todas as culturas, diminuiu com o metabolismo aumentado dos nutrientes e aumentou após o dia 8 concomitantemente com o aumento nos níveis de íons de amônia (Figura 14E). O lactato (Figura 14D) aumentou até o dia 6 e então estabilizou até o final da produção, sugerindo o uso de lactato como fonte de energia neste estágio. Nenhuma diferença significativa nos perfis de metabolitos foi observada entre os reatores semeados em diferentes densidades de partida. Isso pode ser por que a diferença nas densidades de semeadura de partida é mínima, < 1,2 vezes de diferença.

Títulos de Produção.

[00344] Os genomas virais do material coletado foram medidos por digital droplet (ddPCR). Os títulos foram comparáveis entre as densidades de semeadura de partida 8.000 células/cm² e 10.070 células/cm², com média de $3,99E+10 \pm 2,1E+09$ vg/mL (n = 2) e $3,70E+10 \pm 7,4E+09$ vg/mL (n = 2), respectivamente. Por uma razão não identificada, os reatores semeados com 9.350 células/cm² exibiram uma medida de título médio de $5,02E+08$ vg/mL (n=2), aproximadamente 2 logs menor do que os títulos médios de reatores semeados em densidades paralelas. A diferença é provavelmente o resultado de um erro operacional não identificado durante a transfecção

ou a coleta, mais do que a falta de produtividade dessa densidade de semeadura. Reatores em replicata semeados com $12.050 \text{ células/cm}^2$ demonstrou uma diferença de duas vezes entre um e outro, com um reator na faixa observada para as menores densidades de semeadura, $3,2\text{E}+10 \text{ vg/ml}$, enquanto que o segundo reator produziu um título de apenas $1,4\text{E}+10 \text{ vg/ml}$. A produção de vírus por mL e os valores de área superficial são apresentados na Figura 15A.

[00345] A densidade da semeadura e a produção de DS foram avaliadas, como mostrado na Figura 15B. Células HEK 293 semeadas na faixa de $8\text{E}+03$ a $10\text{E}+03 \text{ células/cm}^2$ apresentaram perfis de crescimento, pH, consumo de glicose, lactato e geração de amônia consistentes. Além disso, títulos comparáveis foram produzidos sugerindo que uma densidade de semeadura ligeiramente maior não impacta negativamente a produção. Em contraste, reatores semeados na maior densidade de $12 \times 10^3 \text{ células/cm}^2$ apresentaram mais variabilidade entre duplicatas, incluindo menor título médio em comparação com outras condições, sugerindo que a abordagem usada neste experimento pode não ser ideal para a produção. Estes resultados suportam que células semeadas com uma densidade que varia entre 8×10^3 e $1 \times 10^4 \text{ células/cm}^2$ para experimentos com biorreatores.

Exemplo 9: Avaliação da Comparabilidade

[00346] A comparabilidade entre o fármaco AVXS-101 usado em estudos clínicos de Fase 1 (Processo A) e o fármaco usado em estudos clínicos principais (Processo B) foi avaliada como o objetivo primário com objetivo secundário de avaliar a consistência de fabricação usando o Processo B pela comparação dos Lotes de produtos 600156 e 600307. A Figura 16 representa os fluxos dos processos de fabricação da Fase 1 (Processo A) e Fase 3 (Processo B) e as diferenças entre eles.

[00347] A avaliação de comparabilidade foi realizada utilizando o

produto de fármaco clínico de Fase 1, lote NCHAAV9SMN0613, fabricado no Nationwide Children's Hospital (NCH) e o produto de fármaco lote 600156, fabricado na AveXis.

Produto.

[00348] Os seguintes lotes de material foram avaliados, conforme resumido na Tabela 16. A avaliação incluiu uma comparação direta dos atributos de qualidade resultantes do produto de fármaco clínico da Fase 1, lote NCHAAV9SMN0613, utilizando o Processo A e o produto AVXS-101 do Lote 600156 utilizando o Processo B. Além disso, os resultados do teste de liberação do Lote 600156 com o Lote 600307 foram avaliados de forma holística quanto a reprodutibilidade e a consistência do processo de aumento de escala.

Tabela 16: Produto de Fármaco AVXS-101 a ser avaliado quanto a Comparabilidade Entre o Processo A (Fase 1) e Processo B (Fase 3) e a Consistência de Fabricação para o processo B

Uso	Número do Lote	Data MFG	Data MFG	Condição de Armazenamento
Estudo Fase 1	NCHAAV9SMN0613	10DEZ13	Processo A	$\leq -60^{\circ}\text{C}$
Estudo Fase 3	AVXS-101 Lot 600156	07NOV17	Processo B	$\leq -60^{\circ}\text{C}$
	AVXS-101 Lot 600307	04DEZ17	Processo B	$\leq -60^{\circ}\text{C}$

Visão Geral do Processo de Fabricação

[00349] A Figura 17A-B fornece um resumo dos resultados da comparabilidade.

Comparabilidade e Avaliação da Consistência de Fabricação

[00350] Os materiais do Processo A e Processo B foram avaliados como sendo comparáveis e os materiais do Processo B foram avaliados como consistentes. Os materiais do Processo B também foram determinados ter benefícios adicionais, por exemplo, para a produção em escala industrial.

Métodos de Teste

pH

[00351] A análise de pH foi realizada no lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). Os resultados de ambos os processos variaram de 7,9 a 8,0. Isto demonstrou que o pH dos materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais do Processo B são consistentes.

Aparência

[00352] A aparência por inspeção visual foi realizada no lote CHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). As aparentes diferenças nos resultados de aparência entre o Processo A e o Processo B foram devidas a diferentes concentrações de vetores (título genômico). O lote NCH AAV9SMN0613 tinha uma concentração de vetor menor do que os lotes do Processo B. Como resultado, o Lote NCH AAV9SMN0613 foi mais diluído, levando a uma solução mais clara e incolor, enquanto que as observações incolores a brancas e ligeiramente opacas para os lotes do Processo B resultam de aproximadamente 4 vezes a concentração de partículas virais em solução por mL.

[00353] Considerando a diferença de concentração, a aparência dos materiais do Processo A e do Processo B foi avaliada como comparável e os materiais do Processo B foram avaliados como sendo consistentes.

Osmolaridade

[00354] A osmolaridade por depressão do ponto de congelamento foi realizada no Lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). Os resultados de ambos os processos variaram de 410-415 mOSm kg. Isto demonstrou que a osmolaridade dos materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais do Processo B eram consistentes.

Partículas subvisíveis

[00355] As partículas subvisíveis por obscurecimento da luz foram pesquisadas no lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156

(Processo B) e no lote 600307 (Processo B). Os resultados de ambos os processos estavam bem abaixo dos limites recomendados na monografia da USP para medicamentos injetáveis. Isto demonstrou que as contagens de partículas subvisíveis para os materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais do Processo B eram consistentes.

Título genômico

[00356] O título genômico por ddPCR foi realizado no lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). O título genômico para os lotes AVXS-101 foi esperado flutuar com base nas concentrações alvo na fabricação. O título genômico produzido pelo Processo B ($3,7 \times 10^{13}$ vg/mL e $4,0 \times 10^{13}$ vg/ml) foi pelo menos 3 vezes superior ao do Processo A ($1,1 \times 10^{13}$ vg/ml), portanto, o Processo B foi um método melhor para a fabricação em grande escala de AVXS-101.

Título infeccioso

[00357] O título infeccioso pela TCID₅₀ foi realizado no lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). O processo B ($1,3 \times 10^{10}$ IU/mL e $6,7 \times 10^9$ IU/mL) produziu, em média, um título infeccioso 66% maior do que aquele do Processo A ($5,9 \times 10^{10}$ IU/mL), o que pode ser vantajoso por exemplo, para fabricação em grande escala de rAAV, por exemplo, AVXS-101.

Proteína total

[00358] A proteína total por micro BCA foi realizada no lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). Normalizados para $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, os resultados de ambos os processos variaram entre 167 a 179 µg/mL. Os valores normalizados da proteína total demonstraram que os materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais

do Processo B eram consistentes.

Potência Relativa *in vivo*

[00359] O lote NCHAAV9SMN0613 foi usado como material de referência para o ensaio. Com base na curva padrão de referência, cada resultado de potência obtido para o Lote 600156 e Lote 600307 foi de 97% e 96% respectivamente. Estes resultados demonstraram que os materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais do Processo B eram consistentes.

Identidade por Western Blot

[00360] A identidade por Western Blot foi realizada no Lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). O perfil do blot e os valores do peso molecular aparente para as bandas principais (VP1, VP2 e VP3) foram avaliados como comparáveis para os materiais do Processo A e do Processo B e também foi avaliado que os materiais do Processo B eram consistentes.

% Capsídeo Vazio por AUC

[00361] O % de Capsídeo Vazio por AUC foi realizado no Lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no Lote 600156 (Processo B) e no Lote 600307 (Processo B). O resultado para o lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A) foi de 7%. Os resultados para os lotes 600156 e 600307 (processo B) foram de 2% e 4%, respectivamente. O processo B (2% e 4%) produziu cerca de duas vezes menos capsídeos vazios, como medido pela AUC do que o Processo A (7%). Assim, o Processo B foi capaz de produzir uma composição melhorada que compreende uma menor concentração de capsídeos vazios.

Identidade e Pureza por SDS-PAGE

[00362] Identidade e Pureza por SDS-PAGE foi realizada no Lote NCHAAV9SM0613 (Processo A), Lote 60016 (Processo B) e Lote 600307 (Processo B). O % de Pureza Total de ambos os processos foi $\geq 98\%$ e os padrões de bandas, assim como o peso molecular aparente

para cada uma das três proteínas do capsídeo foram altamente consistentes. Estes resultados demonstraram que os materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais do Processo B eram consistentes.

Proteína residual da Célula Hospedeira

[00363] A Proteína Residual da Célula Hospedeira por ELISA foi realizada no Lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), Lote 600156 (Processo B) e Lote 600307 (Processo B). Os resultados para todos os lotes testados foram < LOQ (8 ng/mL) para o ensaio. Estes resultados demonstraram que os materiais do Processo A e do Processo B eram comparáveis e que os materiais do Processo B eram consistentes.

Albumina Sérica Bovina Residual (BSA)

[00364] A BSA residual foi realizada no Lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), Lote 600156 (Processo B) e Lote 600307 (Processo B). Os resultados para todos os lotes testados foram <LOQ (0,50 ng/mL) para o ensaio. Esses resultados demonstram que os materiais do Processo A e do Processo B são comparáveis e que os materiais do Processo B são consistentes.

Bonzonase Residual

[00365] A Bonzonase residual por ELISA foi realizada no lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), no lote 600156 (Processo B) e no lote 600307 (Processo B). Os resultados para todos os lotes testados foram <LOQ (0,20 ng/mL) para o ensaio. Esses resultados demonstram que os materiais do Processo A e do Processo B são comparáveis e que os materiais do Processo B são consistentes.

DNA residual da célula hospedeira

[00366] O DNA Residual da Célula Hospedeira por qPCR foi realizado no Lote NCHAAV9SMN0613 (Processo A), Lote 600156 (Processo B) e Lote 600307 (Processo B), Normalizado para $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL, o resultado para o Processo A foi de $3,7 \times 10^5$ pg/mL enquanto

os resultados para o Processo B foram de $0,76 \times 10^5$ pg/mL e $0,68 \times 10^5$ pg/mL, respectivamente. Assim, o Processo B produziu vetores virais com hcDNA residual significativamente menor, que pode ser vantajoso, por exemplo, para a fabricação em grande escala de rAAV, por exemplo, AVXS-101.

Análise Estatística

[00367] A análise estatística foi realizada nos atributos de qualidade quantitativos. As comparações foram realizadas em pares entre o Lote do Processo A (NCHAAV9SMN0613) e cada Lote do Processo B (600156 e 600307) como listado abaixo. Estes resultados são mostrados nas Figuras 18 e 19, Estes estudos mostram que o Processo B é um método superior de produção de vetores virais. O processo B produziu consistentemente uma quantidade maior de vetores virais (medidos pelo título genômico e título infeccioso) com poucas impurezas (hcDNA residual menor) com menos capsídeos vazios.

Sequenciamento da Próxima geração

[00368] Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) também foi realizado para estabelecer a identidade de (determinar e confirmar a sequência genômica) e avaliar se existiam sequências variantes (subpopulações) para o material de Fase 3 do produto de fármaco AVXS-101 do Processo B. Alinhamento do banco de dados de sequência contra a sequência de referência fornecida pelo Patrocinador (pscSMN) revelou amplitude completa (100%) e profundidade de cobertura suficiente em toda a extensão do genoma para permitir a detecção de variantes. Um total de quatro posições variantes menores foram anotadas, entretanto, elas parecem representar erros de sequenciamento dentro de regiões difíceis de sequenciar (por exemplo, as repetições terminais invertidas (ITRs) de AAVs que são notoriamente difíceis de sequenciar devido ao seu alto conteúdo de GC e sequências palindrômicas), em vez de variantes verdadeiras. Consulte a Tabela 17

para os resultados do sequenciamento.

**Tabela 17: Resultados do Sequenciamento de DNA de AVXS-101
Fase 3 Lote 600156 do Processo B**

Total # de Leituras Usadas para o Mapeamento	Sequência de Referência	Comprimento de Referência (Bases)	Total # de Leituras Mapeadas	% da População Mapeada	Profundidade Média da Cobertura	Extensão do Consenso Gerado pelo Mapeamento	% de Cobertura de Referência	% Similaridade de Referência	Total # de Posições Não Mapeadas ou de Baixa Qualidade
44,705,268	AVXS-101	5.991	48.854.239	98,1	1.606.995.7	5.991	100	100	0

Perfil de Estabilidade do Lote NCHAAV9SMN0613 da Fase 1

[00369] Lote NCHAAV9SMN0613 foi armazenado durante 12 meses a $\leq -60^{\circ}\text{C}$. Em cada ponto de tempo, o lote foi analisado. Nenhuma tendência desfavorável é observada. A Figura 20 mostra os resultados da estabilidade até o momento.

[00370] Um estudo de comparabilidade foi concluído para AVXS-101 usado em estudos clínicos de Fase 1. A avaliação foi realizada utilizando o produto farmacêutico clínico de Fase 1, lote NCHAAV9SMN0613, fabricado no Nationwide Children's e o produto de fármaco 600156 AVXS-101, fabricado na AveXis. Além disso, a consistência de fabricação foi avaliada usando os Lotes 600156 e 600307 do Process B. Tanto para a avaliação de comparabilidade (Processo A vs Processo B) quanto para consistência de fabricação (Processo B Lotes 600156 vs 600307), o estudo avaliou a identidade, qualidade, pureza e potência do material de ensaio clínico AVXS-101 usando o processo recém-aperfeiçoado e métodos analíticos para permitir uma avaliação robusta da comparabilidade e consistência de fabricação.

[00371] A análise estatística foi realizada sobre os atributos de qualidade quantitativos. As comparações foram realizadas em pares entre o lote do processo A NCHAAV9SMN0613 e o lote B do processo

B 600156. O Processo B foi um método melhor que produziu maiores quantidades de vetores virais com uma pureza maior que o Processo A. Por exemplo, comparado ao Processo A, vetores virais produzidos pelo Processo B tiveram um título infeccioso 48% maior, nível genômico 8% maior, 92% menos partículas subvisíveis com tamanho superior a 10 µm, 50% menos partículas subvisíveis com tamanho superior a 25 µm, 100% menos capsídeos vazios e 11% menos hcDNA residual. Todos os resultados foram consistentes em relação ao Limite de Teste para cada atributo de qualidade.

[00372] Além disso, para estabelecer consistência de fabricação usando o Processo B, a comparação por pares foi realizada usando os Lotes 600156 e 600307. O resultado desta comparação inicial por pares entre o Processo B, lote 600156 e 600307, apresenta consistência na fabricação. Todos os resultados também foram consistentes em relação ao Limite de Teste para cada atributo de qualidade.

[00373] Com base na avaliação dos resultados, os atributos de qualidade resultantes do lote clínico do fármaco da Fase 1, lote NCHAAV9SMN0613, utilizando o Processo A e o lote 600156 do fármaco AVXS-101, utilizando o Processo B, demonstraram que o Processo B produz maiores quantidades de vetor viral e pureza melhorada, o que pode ser vantajoso, por exemplo, para a fabricação em grande escala de rAAV. Adicionalmente, foi verificado que os dois lotes de material gerados a partir do Processo B (Lotes 600156 e 600307) eram reproduzíveis exibindo ainda consistência de fabricação.

Exemplo 10: Análise por Ultracentrifugação Analítica (AUC)

[00374] O material da Fase-1 (Processo A, Lote NCHAAV9SMN0613) e Fase-3 (Processo B, Lotes 600156 e 600307) foi analisado utilizando o método AUC. Os perfis de AUC (analisados em duplicata) para o NCHAAV9SMN0613, 600156 e 600307 são mostrados na Figura 21, Figura 22 e Figura 23, respectivamente.

[00375] A análise da AUC de cada material exhibe coeficientes de sedimentação similares para os capsídeos vazios e cheios com o material da Fase-1 (Processo A, Lote NCHAAV9SM0613) mostrando conteúdo elevado de capsídeo vazio (7%) quando comparado ao material de Fase-3 (Processo B, Lotes 600156 e 600307) com conteúdo de capsídeo vazio de 2% e 4%, respectivamente. Isto é devido à capacidade da etapa de fabricação de ultracentrifugação com gradiente de CsCl no Processo B para separar mais eficazmente os capsídeos vazios dos capsídeos cheios em comparação com a etapa de fabricação de ultracentrifugação com gradiente de iodixanol empregado pelo Processo A.

[00376] Lotes de produção de AVXS-101 usando apresentação clínica e comercial exibem consistentemente três bandas visíveis de capsídeos quando submetidos ao processo de purificação com gradiente de CsCl usando a ultracentrifugação, ambos no ensaio clínico de Fase 1 produzido no Nationwide Children's Hospital (NCHAAV9SMN0613) e em cada lotes de produção subsequentes de AveXis. Com base nos perfis da AUC para o fármaco clínico de Fase 1, lote NKAHV9SMN0613, utilizando o Processo A e o produto de fármaco AVXS-101, lote 600156, utilizando o Processo B, estes materiais são considerados comparáveis. Adicionalmente, os perfis da AUC para dois lotes de material gerados a partir do Processo B (Lotes 600156 e 600307) foram avaliados como consistentes.

Exemplo 11: Processo A Montante

[00377] Um processo a montante foi usado para produzir um intermediário derivado de um banco de células de trabalho, em que o processo a montante compreende as etapas de (a) cultivar as células, (b) transfectar as células cultivadas com três plasmídeos como mostrado na Figura 1, (c) coletar as partículas virais expandidas das células após um período de cultura, (d) purificar as partículas virais por

filtração para remover quaisquer células intactas ou resíduos celulares, (e) submeter o eluente da etapa (d) a filtração de fluxo tangencial e (f) congelar a preparação intermediária resultante de partículas virais purificadas.

[00378] Antes da transfecção, as células foram expandidas em meios de cultura adequados, em frascos ou em um biorreator adequado, ou em ambos. Um meio de cultura é DMEM com FBS 10%, glucose 4,5 g/L, L-glutamina 4 mM. Em uma modalidade, as células aderentes são cultivadas em frascos inicialmente e depois transferidas para um biorreator iCELL para a expansão adicional de células aderentes dentro do biorreator.

[00379] Após a expansão das células, as células HEK293 aderentes foram transfectadas com uma coprecipitação tripla de plasmídeo de DNA PEI. Os 3 plasmídeos usados para esta transfecção são: pSMN, pAAV2/9 e pHELP. O meio de crescimento DMEM usado para expansão celular é substituído por um meio de transfecção DMEM modificado. Os meios de transfecção de DMEM não continham FBS, nem cálcio, nem L-glutamina e glicose 4,5 g/L. O vetor scAAV9.CB.SMN foi produzido usando a transfecção com plasmídeo triplo de DNA em células HEK293 aderentes, usando uma coprecipitação com PEI num biorreator de células aderentes de grande escala. O vetor do plasmídeo pSMN contém o cDNA para o SMN humano. Os 3 plasmídeos usados para esta transfecção são: pSMN (222 mg), pAAV2/9 (333 mg) e pHELP (444 mg). O meio de transfecção foi deixado equilibrar no biorreator até que a temperatura do biorreator fosse $> 30^{\circ}\text{C}$ antes da adição da coprecipitação PEI-Plasmídeo. O processo de coprecipitação de PEI-Plasmídeo envolveu a adição dos plasmídeos ao meio de transfecção e uma filtração de $0,2\ \mu$ em uma bolsa de reação. O PEI foi adicionado ao meio de transfecção e depois a bolsa de reação. A reação de PEI-Plasmídeo foi misturada manualmente para formar uma suspensão

homogênea e a reação ocorre durante um período de 15 a 30 minutos. No final do tempo de reação, a coprecipitação de PEI-Plasmídeo foi adicionada ao biorreator. A coprecipitação de PEI-Plasmídeo foi deixada a misturar no biorreator durante 1-2 horas antes de reiniciar a recirculação. O meio de crescimento DMEM foi recirculado no biorreator por 18 a 24 horas antes da próxima troca de meio.

[00380] O genoma de rAAV SMN (nucleotídeos 980-3336 de SEQ ID NO: 1) tem na sequência uma ITR de AAV2, o promotor de actina de galinha com um intensificador de citomegalovírus, um íntron de SV40, o DNA que codifica SMN descrito no GenBank Número de Acesso NM_000344. 2), uma sequência de sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino e outra ITR de AAV2. As substituições de nucleotídeos conservativas de DNA de SMN são também contempladas (por exemplo, uma mudança de guanina para adenina na posição 625 do Número de Acesso do GenBank NM 000344.2). O genoma não possui o gene rep e cap de AAV, ou seja, não há nenhum DNA de cap ou rep de AAV entre os ITRs do genoma. Os polipeptídeos de SMN contemplados incluem, mas não estão limitados ao polipeptídeo de SMN1 humano estabelecido no banco de dados de proteína NCBI NP_000335.1. O vetor rAAV9 SMN está descrito em Foust et al., Nature Biotechnology 28 (3): 271-274 (2010), em que a sequência de inserção do genoma do vetor é mostrada como os nucleotídeos 980-3336 da SEQ ID NO: 1).

[00381] No dia 6 do biorreator, 18 - 24 horas após a transfecção, o biorreator foi drenado e a bolsa de meio de recirculação DMEM foi substituído por 200 litros de meio de pós-transfecção OptiMEM fresco. O biorreator foi cheio novamente com 64 litros e a recirculação no biorreator foi reiniciada. No dia 7, 18 - 24 horas após a troca de meio no dia 6, o meio de pós-transfecção OptiMEM na bolsa de recirculação (~135 litros) foi substituído por uma nova bolsa de meio OptiMEM. O

biorreator não foi drenado durante esta etapa. A recirculação de meio continuou até a coleta no dia 9.

[00382] Após 9 dias no biorreator, as amostras finais da pré-coleta foram retiradas do reator e o processo de lise celular foi iniciado. A benzonase foi adicionada ao biorreator até uma concentração final de 100 U/mL. Depois de deixar a benzonase se misturar no reator, foram adicionados 7,1 litros de solução de lise ao reator. A solução de lise foi misturada no reator durante 2 horas antes da primeira etapa de coleta. No final da lise de 2 horas, o conteúdo do biorreator foi transferido para a bolsa de coleta.

[00383] 8,9 litros de Solução de Sal Sacarose (SSS) foram adicionados à bolsa de coleta e misturados durante 15 minutos. A solução de SSS extinguiu a Benzonase no meio de coleta. O biorreator foi então lavado com o tampão de lavagem do biorreator. Para a lavagem do biorreator, foram adicionados 64 litros de tampão de lavagem do biorreator ao biorreator e misturados durante 15 minutos. O enxágue foi então transferido para a bolsa coletora comum. Uma vez que o enxágue foi adicionado ao saco de coleta, o conteúdo foi misturado por 15 minutos e as amostras de coleta a granel foram coletadas.

[00384] O concentrado da coleta misturado foi filtrado através do filtro de profundidade para uma bolsa de coleta. Depois de todo o concentrado da coleta ter sido filtrado, o filtro de profundidade foi retirado com 50 litros de tampão de diafiltração de TFF1. O conjunto de filtros de profundidade foi misturado e amostrado. O conjunto de filtros de profundidade foi então filtrado através de um filtro de 0,45 µm para clarificar melhor o material de coleta a granel. O filtro de 0,45 µm é então lavado com 6 litros de tampão de TFF1.

[00385] Para a etapa de TFF1 cassetes de membrana de celulose regenerada de 5,0 m² de 300 kDaMW, foram lavados, higienizados com

solução de NaOH e equilibrados com tampão de TFF1. A fase de concentração desta operação foi projetada para reduzir o volume da coleta clarificada em aproximadamente 10x. Uma vez atingido o volume de retentado alvo, a operação de diafiltração é iniciada. O retentado foi diafiltrado com 6 diavolumes de tampão de TFF. Uma vez que 6 diavolumes de permeado total de fluxo foram alcançados, o retentado foi novamente concentrado e coletado em uma bolsa de coleta. Duas lavagens sucessivas da membrana foram executadas para maximizar a recuperação do produto do sistema de TFF para produzir uma substância intermediária. O intermediário de TFF1 foi aliqotado em frascos PETG estéreis de 1 ou 2 litros em uma capela de LFH e depois congelado em gelo seco ou em um congelador e transferido para armazenamento a -60°C.

Tabela 18: Tampões usados no Processo a Montante

Nome	Formulação	Etapas Usadas do Processo
Meio de Expansão e Crescimento Celular	DMEM com 10% FBS, 4,5 g/l glicose, 4 mM L-glutamina	Expansão celular, pré-transfecção no biorreator iCELLis
Meio de Transfecção	DMEM sem FBS, sem cálcio, sem L-glutamina e 4,5 g/l glicose	transfecção no biorreator iCELLis
Meio Pós Transfecção	OptiMEM com 2,3 g/l glicose, 4 mM L-glutamina, e sem FBS	pós-transfecção no biorreator iCELLis
Tampão de Lise	500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM MgCl ₂ , pH 8,0	Lise celular no biorreator iCELLis
Solução Sal Sacarose (SSS)	3700 mM NaCl, 10% Sacarose	Clarificação
Tampão Lavagem do Biorreator	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Tween 20, 1% Sacarose	Coleta no biorreator iCELLis
Tampão de TFF1	20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 1% Sacarose	Clarificação, TFF1
Tampão de Higienização de TFF1	0.5 M NaOH	Higienização da membrana de TFF1

Exemplo 12: Processo a Jusante

[00386] Um processo a jusante foi usado para processar o intermediário para uma substância de fármaco filtrada. As etapas do processo a jusante incluíram uma etapa de acidificação e clarificação

(usando filtração), seguida pela cromatografia de troca de cátion, filtração de fluxo tangencial ("TFF2"), ultracentrifugação com CsCl e uma etapa adicional de filtração de fluxo tangencial ('TFF3') para produzir uma substância de fármaco filtrada, em que as partículas de AAV purificadas estão suspensas em um veículo farmacologicamente aceitável. Especificamente, o processo a jusante continha as seguintes etapas de fabricação subsequentes à produção do intermediário de TFF1: descongelamento e pool do intermediário de TFF1, acidificação e clarificação, cromatografia de troca de cátion (CEX), filtração de fluxo tangencial (TFF2), ultracentrifugação com CsCl para a Separação de Capsídeo Cheio/Vazio, filtração de fluxo tangencial (TFF3) para Concentração/Troca de Tampão, TFF3 agrupa a filtração de material para gerar substância de fármaco, diluição e filtração de substância de fármaco para produzir produto de fármaco, armazenamento do produto de fármaco e preenchimento de frascos com produto de fármaco.

[00387] O material intermediário TFF1 foi descongelado e misturado cuidadosamente. Tween 20 foi usado para promover a floculação do concentrado de proteínas e DNA da célula hospedeira sob pH ácido. O pH do pool intermediário de TFF1 contendo 15% de Tween 20 foi diminuído para cromatografia CEX (pH 3,5). O precipitado formado após o pH ser baixado, foi então removido por filtração da solução através de uma profundidade e filtros de 0,45µm.

[00388] Tween 20 (solução Tween 20 a 36% em Tris 20 mM, MgCl₂ 500 mM, NaCl 500 mM, sacarose a 1% m / v, pH 8,1) foi lentamente adicionada à solução intermediária de TFF1 durante 4 horas para atingir uma concentração final de 20% de Tween 20. Após incubação durante a noite em temperatura ambiente (RT), o pH do intermediário contendo Tween 20 foi diminuído adicionando aproximadamente 4 g de glicina 1M em pH 2,5 por kg de meio de intermediário de TFF1 / Tween spike para atingir um pH alvo de 3,5±0,1. Uma vez que o pH estava dentro do

intervalo aceitável, a solução foi passada através do filtro de profundidade Clarisolve POD em linha com um filtro Opticap XL Durapore de 0,45 µm ou um filtro Durapore Opticap XL.10 ou filtro PES 0,8/0,45 µm seguido de uma lavagem dos filtros com duas vezes o volume de retenção do filtro POD mais um volume de retenção do filtro de polimento com o tampão CEX A.

[00389] A etapa de cromatografia de captura e troca de cátion (CEX) foi usada para separar as capsídeos virais da proteína, DNA e outras impurezas do processo. Esta etapa utilizou uma coluna de cromatografia CIMmultus S03-8000 Advanced Composite Column (Sulfonyl) (Poros 2µm) (8,0 L) operada usando um sistema de processo de cromatografia automatizado. Tampões e soluções são descritos na seguinte tabela:

Tabela 19: Tampões e Soluções para um ciclo de CEX

Nome da Solução	Composição	Propósito	Volume (L) para um Ciclo de 8 L CEX
WFI	WFI	Lavagens da coluna	200 L
Tampão CEX A	50 mM glicina, 500 mM NaCl, 1,0% sacarose, 0,20 % Poloxâmero 188, pH 3,5 ± 0,1 a 20°C	Equilibração, lavagem, eluição	256 L
Tampão CEX B	50 mM glicina, 2,0 M NaCl, 1,0% sacarose, 0,20 % Poloxâmero 188, pH 3,5 ± 0,1 a 20°C	Equilibração da coluna e eluição	40 L
Solução de Limpeza Monolítica	1 M NaOH, 2 M NaCl	Higienização da coluna, CIP	96 L
1 M cetato de amônia	1 M acetate de amônia	Restauração do pH da coluna	40 L
Tampão de neutralização pH 9,0	1.0 M Tris pH 9,1 ± 0,1 a 20°C	Ajuste do pH do produto de CEX	0,5 L
Solução de armazenamento	20% Etanol em WFI	Armazenamento da coluna	40 L

[00390] A carga da coluna de CEX foi determinada pelo conteúdo de proteína do intermediário de TFF1 clarificado, acidificado. A carga de

proteína para a coluna de CEX foi ajustada em 70% da capacidade máxima da coluna.

[00391] O pico de eluição foi coletado manualmente começando em uma ascensão acentuada em OD280. OD280 aumentou quando a condutividade estava entre 80 a 85 mS/cm. O volume apropriado do eluído de CEX (produto) foi de ~ 20 litros ou 2,5 CVs (volumes de coluna). O eluído de CEX foi coletado em duas frações. A primeira fração começou na ascensão acentuada em OD 280 e foi coletada como 2,5 CVs. A segunda fração começou imediatamente após a primeira fração e foi coletada como 1,0 CV. As duas frações foram neutralizadas para $\text{pH}=8,0 \pm 0,30$ usando Tampão de Neutralização pH 9,0.

[00392] A etapa de TFF2 concentrou, removeu impurezas de proteína e trocou o tampão para um tampão apropriado para a etapa de ultracentrifugação com CsCl. Um sistema de filtração de fluxo tangencial foi utilizado em conjunto com membranas de celulose regeneradas de $0,4 \text{ m}^2$ (dois ciclos de CEX) ou $0,2 \text{ m}^2$ (um ciclo de CEX) 300 K MWCO.

[00393] A fase de concentração dessa operação reduziu o volume dos eluídos de CEX. Uma vez atingido o volume de retentado alvo, a diafiltração foi iniciada no modo de TFF descontínuo (modo de lote). O retentado foi diluído 2 vezes diafiltrado com 8 diavolumes de tampão de diafiltração de TFF2 com NaCl e depois com 8 diavolumes de tampão de diafiltração com CsCl de TFF2 em modo de TFF descontínuo. Uma vez que a diafiltração com CsCl estava completa, o retentado foi concentrado até um volume prescrito que era dependente do volume de retenção do sistema. Duas lavagens sucessivas da membrana foram executadas para maximizar a recuperação do produto a partir do sistema de TFF2.

[00394] A taxa de alimentação do retentado foi ajustada em $5 \text{ L/m}^2/\text{min}$ (500 mL/min por cassete de $0,1 \text{ m}^2$) com uma taxa de conversão de 20% para permear (uma taxa de fluxo do permeado de

100 ml por 500 mL de taxa de alimentação de retentado). A taxa de fluxo do retentado foi controlada por uma braçadeira na tubulação do permeado para manter uma taxa de fluxo do permeado de 20% da taxa de fluxo de alimentação do permeado.

Tabela 20: Tampões para TFF2

Nome da Solução	Composição
Tampão de Diafiltração de TFF2 NaCl	20mM Tris, 2mM MgCl ₂ , 150mM NaCl, 0,2% Poloxâmero 188, 1% Sacarose , pH 8.1 ± 0.1 a 20°C
Tampão de Diafiltração de TFF2 CsCl	20mM Tris, 2mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0.2% Poloxâmero 188, pH 8.1 ± 0.1 at 20°C

[00395] A ultracentrifugação pode ser usada para remover capsídeos vazios de capsídeos cheios utilizando a ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério. Um sistema automatizado Centrífuga Optima XPN 100 Ultra ou sistema equivalente equipado com rotor Tipo Ti 50.2 ou rotor equivalente foi usado para a etapa de ultracentrifugação com CsCl. O material filtrado purificado de TFF2 foi lentamente adicionado em tubos de ultracentrifugação ao longo do interior da parede do tubo sem introduzir bolhas na solução. Os tubos cheios foram selados a quente com um selador manual e centrifugados a 302.000 g (50.000 rpm em rotor 50.2 Ti) por 17 horas a 20°C. Após a conclusão da etapa de centrifugação, os tubos foram removidos da Ultra Centrifuge e colocados em uma câmara de biossegurança. Tubos contendo produtos foram montados em suportes de anéis acima de um recipiente de resíduos. Uma lâmpada foi posicionada diretamente sob o tubo e a banda de capsídeos vazios (Banda A é a banda mais alta), as bandas de dubleto de capsídeo cheio (Bandas B e C superiores e inferiores do dubleto) e banda mais baixa abaixo do dubleto foi marcada no tubo. As bandas B, C e D foram removidas por uma agulha de 18G acoplada a uma seringa de 30 mL inserida logo abaixo da banda D no meio do tubo. O material coletado foi transferido para uma garrafa esterilizada de 1 L

de PETG. O material de todos os tubos da centrífuga foi reunido em um frasco esterilizada de PETG de 1 litro para produzir o Pool de Ultracentrifugação (UC). O tampão para a etapa de ultracentrifugação com CsCl está listado na tabela abaixo:

Tabela 21: Tampão para Ultracentrifugação com CsCl

Nome da Solução	Composição
Tampão de Diafiltração de TFF2 CsCl	20mM Tris, 2mM MgCl ₂ , 3 M CsCl, 0,2% Poloxâmero 188, pH 8,1 ± 0,10

[00396] A etapa de TFF3 removeu o CsCl e concentrou o vetor cheio usando o Tampão de Formulação Final. Um sistema de filtração de fluxo tangencial foi usado em conjunto com duas membranas de celulose regeneradas de 50 cm² 300k MWCO. A fase de concentração da operação de TFF3 foi projetada para reduzir a concentração de CsCl residual e o volume do Pool UC. Uma vez atingido o volume de retenção pretendido, a diafiltração foi iniciada. O retentado foi diafiltrado com 10 diavolumes de tampão de TFF3. Uma vez completada a diafiltração, o retentado concentrado foi transferido para um tubo cônico secundário através de um Filtro Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade (Mini Kleenpak) de 0,2 µm.

[00397] Uma lavagem sucessiva da membrana foi executada para recuperar o vetor do sistema de TFF3. O tampão de TFF3 foi adicionado ao tubo cônico primário que anteriormente continha o retentado de TFF3. Este material foi circulado novamente através das membranas de celulose. Após a recirculação, o fluxo foi transferido para o tubo cônico secundário através do Filtro Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade (Mini Kleenpak) de 0,2 µm. O concentrado de TFF3 e o pool parcial foram misturados para atingir uma concentração final de vetor $\geq 4,5 \times 10^{13}$ vg/mL de Substância de Fármaco (concentrado retido em TFF3 + duas lavagens).

[00398] Uma lavagem sucessiva da membrana foi executada para maximizar a recuperação do produto do sistema de TFF3. O Tampão de TFF3 foi adicionado ao tubo cônico primário que continha anteriormente o retentado de TFF3 e o material da lavagem inicial. Este material foi circulado novamente através das membranas de celulose. A descarga secundária é transferida para um tubo cônico secundário através do Filtro Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade (Mini Kleenpak) de 0,2 µm até que o peso determinado seja atingido no tubo cônico secundário. A solução concentrada final é referida como Substância de Fármaco (DS).

Tabela 22: Tampões para TFF3

Nome da Solução	Composição
Tampão de TFF3	20mM Tris, 1mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxâmero 188, pH 8, ± 0,1 a 20°C

[00399] DS foi filtrado com um Filtro Pall Supor® EKV Sterilizing-Grade (Mini Kleenpak) em um frasco de vidro estéril de 1 L usando um conjunto de uso único esterilizado. Antes da filtração do pool de TFF3, o filtro foi lavado pela passagem do Tampão de TFF3 através do filtro utilizando uma bomba peristáltica e descartando-o em um saco de descarga de resíduos. A Substância de Fármaco (DS) foi então filtrada através do filtro lavado utilizando uma bomba peristáltica e coletada em um frasco de vidro esterilizado de 1L. Com base na concentração desejada de DS em 5×10^{13} vg/mL, foi adicionado o Tampão de TIF3 ao tubo cônico secundário que continha a DS e passada através do filtro para preparar o produto de fármaco diluído ("DP") em uma concentração alvo de $3,5 \times 10^{13}$ vg/mL.

[00400] O Tampão de TFF3 usado na lavagem do filtro e na diluição de DS para preparar DP é composto pela seguinte formulação.

Tabela 23: Operação na Unidade de Produto de Fármaco – Composição do Tampão

Nome da Solução	Composição
Tampão de TFF3	20mM Tris, 1mM MgCl ₂ , 200 mM NaCl, 0,001% Poloxâmero 188, pH 8, ± 0,1

[00401] DP foi colocada em frascos de 5mL estéreis, prontos para uso Crystal Zenith (CZ), tampados com tampas esterilizadas, prontas para uso e lacradas com lacres esterilizados prontos para uso.

Exemplo 13: Ensaio de Potência

[00402] A potência relativa do produto de fármaco foi medida usando um ensaio quantitativo in vivo. O ensaio utilizou um modelo estabelecido da doença SMA em camundongo. Os pares reprodutores da cepa SMAΔ& de camundongo (Jackson Laboratories, # 005025) são fenotipicamente normais, mas ~25% da sua descendência é homozigota para a mutação do gene de SMN alvo e apresenta o fenótipo semelhante a SMA. No dia 5, eles mostram sinais de fraqueza muscular e, na semana seguinte, desenvolvem uma marcha anormal e uma tendência a cair. Jackson Laboratories reporta a sobrevida média para animais com o fenótipo semelhante a SMA como $\sim 15 \pm 2$ dias. Estudos piloto demonstraram um tempo médio de sobrevida para animais não tratados com fenótipo semelhante à SMA de 16,3 dias (média geométrica; n = 3 estudos; 10 camundongos por estudo).

[00403] O produto de fármaco biologicamente ativo administrado por infusão intravenosa (IV) produz um aumento no tempo de sobrevida que é uma função da dose (vg/kg). A potência do produto de fármaco foi medida em relação ao material de referência (lote anterior de vetor). O título do produto de fármaco e do material de referência (genomas vetoriais/mL; vg/mL) foi determinado pela Droplet Digital reação em cadeia da polimerase (ddPCR). O vetor foi diluído em solução salina para atingir cada um dos três níveis de dose especificados que serão administrados a camundongos com o fenótipo semelhante a SMA. Os resultados de um ensaio são considerados aceitáveis se o ensaio

passar a adequação. A adequação do ensaio consiste no seguinte:

[00404] 4. Limite de aceitação para a amostra do Controle Negativo (15 ± 2 dias, Sobrevida Média)

[00405] 5. Limite de aceitação para a amostra de Controle Positivo (> 40 dias, Sobrevida Média)

[00406] 6. Limites de aceitação no padrão de referência da curva dose-resposta da Sobrevida Média

[00407] Um lote anterior de vetor (daqui em diante, Lote Anterior) foi usado neste estudo para determinar a correlação linear entre a sobrevida média (dias) do camundongo SMAΔ7 quando tratado com produto de fármaco em cinco níveis de dose diferentes incluindo a dose 0 (zero) que usa solução salina 0,9% (grupo não tratado). A Tabela 24 mostra a curva de calibração usando o Lote Anterior como de lote de referência.

Tabela 24: Curva de Calibração usando Cinco Níveis de Dose de AVXS-101

Desempenho da Referência Padronizada NCH0613 ao Longo do Tempo

Dose (vg/kg)	Sobrevida Média (dias)						
	0 Meses			3 Meses			6 Meses
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 1
	n=44	n=32	n=38	n=21	n=21	n=21	n=22
0	15	16	15	15	14	16	~16
1,21E+13	24	23	25	21	21	21	22
7,38E+13	31	29	27	29	29	ND	28
1,18E+14	ND*(>103)	ND*(>115)	79	---	---	---	---
2,94E+14	ND*(>131)	---	---	ND*(>47)	ND*(>47)	ND*(>37)	ND*(>41)

* Não Determinado (ND) – Sobrevida Média (dias) não pode ser atingida como a de 24AGO2017

[00408] Os dados deste estudo demonstraram que o intervalo linear da curva de dose-resposta da sobrevida média foi de 0 a 7,4 vg/kg. A potência relativa do lote 816836 do produto farmacológico foi

estabelecida pela comparação da curva de regressão linear do padrão de referência do Lote Anterior com a curva de regressão linear do lote 816836 do produto de fármaco. Isto foi obtido usando a proporção entre o intercepto de y e a inclinação de cada linha de regressão linear (isto é, Padrão de Referência e Artigo de Teste). O cálculo do percentual da Potência Relativa é delineado na equação (1) abaixo:

$$\%RP = [(\text{intercepto } y / \text{inclinação do Artigo de Teste}) : (\text{intercepto } y / \text{inclinação do Artigo de Referência})] \times 100 \quad (1)$$

[00409] O Lote NHC0613 usado no ensaio clínico de Fase 1 foi usado como lote do Padrão de Referência e foi atribuído com uma potência de 100%.

[00410] Os dados anteriores estabeleceram os critérios de aceitação preliminar do ensaio usando a porção linear da curva de dose-resposta da sobrevida média para determinar a potência relativa dos lotes clínicos do produto de fármaco, como a seguir:

[00411] • Curva dose-resposta da sobrevida média (dias) foi gerada usando 5 níveis de dose (vg/kg)

[00412] • Doses de 0, 1,2E+13 e 7,4E+13 foram selecionadas pela corrida do modelo linear de resposta a dose

[00413] • Limites de adequabilidade para salina (grupo não tratado) foram de 13 a 17 dias de sobrevida média

[00414] • Limites de adequabilidade para a amostra do padrão de referência foram estabelecidos como:

[00415] o Inclinação $\geq 2,0E-13$

[00416] o Intercepto y $\geq 16,00$ dias

[00417] o Proporção Intercepto y / Inclinação $\geq 8,5E+13$

[00418] o $R^2 \geq 0,7$

[00419] O modelo de camundongo $\Delta 7$ foi usado para demonstrar a eficácia da terapêutica de SMA, incluindo o produto de fármaco. Com uma sobrevida média de 15 dias $\pm$ 2 dias, os animais de controle não

tratados ou tratados com salina fornecem um controle de referência confiável a partir do qual a potência do produto pode ser medida como um aumento da sobrevida média. O trabalho de desenvolvimento com o produto de fármaco identificou três (3) doses (excluindo a dose com veículo) determinadas por Título Genômico usando Droplet Digital PCR (ddPCR) que afetam a sobrevida no modelo de camundongo com uma correlação linear quando a dose administrada (vg/kg) é transformada em log e representada em gráfico contra Sobrevida Média (em dias) do camundongo neonato SMAΔ7 tratado. Veja os títulos padronizados (vg/mL) na Tabela 26 para os padrões de título baixo, médio e alto. Além disso, a solução de Tampão de TFF (veículo) é usada para o ponto zero (0) da curva de calibração assim como um Controle Negativo. Uma dose que demonstra ≥ 40 dias de sobrevida (maior que a dose que demonstra a duplicação da sobrevida média) também foi incluída como um Controle Positivo.

Tabela 25: Doses – Alvo

Dose (vg/kg)	Sobrevida Média (dias)	Padrões e Controles
Salina	15±2	Controle Negativo (não tratado)
1,50x10 ¹⁴	≥ 40 dias de Sobrevida Média	Controle Positivo
0 (salina)	15±2	Padrão-1
1,2x10 ¹³	22 ± 3	Padrão-2
7,5x10 ¹³	31 ± 3	Padrão-3

[00420] Preparações da Solução da Dose (consulte a Tabela 26 para o exemplo de esquema de diluição)

[00421] - Controle Negativo – A Solução Salina 0,9% é usada como Controle Negativo

[00422] - Controle Positivo – O lote do Artigo de Teste é preparado em $1,5 \times 10^{14}$ vg/kg usando salina.

[00423] - Soluções Padronizadas de Referência – O lote Padronizado de Referência é preparado em três concentrações

ilustradas na Tabela 25 usando a Solução salina.

Tabela 26: Esquema de Diluição do Padrão de Referência e do Artigo de Teste (Exemplo)

Dose (vg/kg)	Padrão Referência /Artigo de Teste Título por ddPCR (vg/mL)	Conversão para vg/ μ L	Padrão Referência /Artigo de Teste volume de uso (μ L)	Solução Salina (μ L)	Volume Total da Dose (μ L)
$1,2 \times 10^{13}$	$5,0 \times 10^{13}$	$5,0 \times 10^{10}$	2,6	47,4	50,0

[00424] Preparação do Artigo de Teste – O artigo de teste foi diluído utilizando a Solução Salina. As diluições foram calculadas para gerar as doses de teste (vg/kg) mostradas na Tabela 26 por camundongo em um volume final total de 50 μ L. As diluições foram feitas para 10 camundongos no momento com um volume extra como um Controle Positivo direcionado para aumentar o tempo de vida mínimo dos camundongos tratados para ≥ 40 dias de Sobrevida Média (dias).

[00425] Limites de aceitação em amostras de controle

[00426] - Controle Negativo (camundongos não tratados) – O ensaio do limite de aceitação para o grupo de Controle Negativo foi que os camundongos SMA Δ 7 atingiram a sobrevida média de 15 ± 2 dias. Adicionalmente, qualquer camundongo que morra em $\leq$ de 10 dias será excluído da análise. Se mais do que 7 camundongos são usados em um grupo, um máximo de 2 camundongos podem ser excluídos se morrerem em $\leq$ 10 dias.

[00427] - Controle Positivo (grupo tratado com a dose clínica alvo) -- O limite de aceitação do ensaio para o grupo de Controle Positivo, com uma longevidade mínima dos camundongos tratados, foi de ≥ 40 dias de Sobrevida Média. Adicionalmente, qualquer camundongo que morra em $\leq$ de 10 dias será excluído da análise. Se mais do que 7 camundongos são usados em um grupo, um máximo de 2 camundongos podem ser excluídos se morrerem em $\leq$ 10 dias.

Limites de aceitação da curva dose-resposta do Padrão de Referência [00428] Os critérios de adequabilidade do ensaio serão determinados para a curva dose resposta linear do padrão de referência representando em gráfico a Sobrevida Média (dias) contra a dose administrada (vg/mL). Veja a Tabela 27 para os critérios de adequabilidade do ensaio.

Tabela 27: Critérios de Adequabilidade do Ensaio (Curva Dose-Resposta Linear do Padrão de Referência)

Lote Testado	Inclinação	Intercepto	Proporção Intercepto/ Inclinação	R ²	Potência Designada
Padrão de Referência	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,5$	$\geq 8,5 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	100,0
Artigo de Teste	$\geq 2,0 \times 10^{-13}$	$\geq 16,0$	$\geq 8,0 \times 10^{13}$	$\geq 0,7$	-

[00429] Proporção do Intercepto de y/Inclinação – Uma curva de regressão linear da Sobrevida Média (dias) versus a dose administrada (vg/kg) para o Padrão de referência e o Artigo de teste é determinada. A proporção do intercepto y para a inclinação para cada regressão linear é calculada.

Relatório dos Resultados

[00430] Relatório Qualitativo dos Resultados de Potência Relativa - Os critérios de Adequação do Ensaio são avaliados para cada ensaio antes da determinação de um único ponto de Sobrevida Média (dias) lidos em ≥ 40 dias para o material de Controle Positivo. Se a Sobrevida Média do grupo de Controle Positivo for de 5 a 40 dias, o Artigo de Teste poderá ser disposto se os critérios abaixo forem atendidos.

[00431] Relatório Quantitativo dos Resultados da Potência Relativa - Os critérios de Adequabilidade do Ensaio são avaliados para cada ensaio antes da determinação quantitativa da Potência Relativa para o Artigo do Teste. Potência relativa para o artigo do teste pode ser relatada uma vez que o controle Positivo alcance ≥ 40 dias e a

Sobrevida Média de 31 ± 3 dias para o grupo de camundongos que representa a dose padronizada superior de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg seja alcançada. O Percentual de Potência Relativa (% RP) para um Artigo de Teste será calculado usando o intercepto y e a inclinação da regressão linear da dose-resposta da Sobrevida Média (dias) como a seguir:

$$\%RP = 100\% * [(intercepto \text{ y } \text{Artigo de Teste} / \text{inclinação}) \div (intercepto \text{ y } \text{Padrão de Referência} / \text{inclinação})]$$

Exemplo 14: Terapia de Substituição de Gene de Dose Única para a Atrofia Muscular Espinhal: Um Estudo de Dose

[00432] A atrofia muscular espinhal (SMA) é uma doença monogênica grave da infância, que resulta da perda ou disfunção do gene que codifica a sobrevida do neurônio motor 1 (*SMN1*). A incidência desta doença é de aproximadamente 1 em 10.000 nascidos vivos, com uma frequência de portadora de 1 em 54. SMA é caracterizada pela degeneração e perda de neurônios motores inferiores, o que leva à atrofia muscular. A doença é dividida em quatro subtipos (1 a 4) com base na idade de início e na conquista de marcos. A SMA tipo 1 (SMA1) é a forma mais grave e a causa genética mais comum de morte entre as crianças. Existem duas formas de *SMN*; *SMN1* é o principal gene responsável pela produção funcional da proteína SMN. *SMN2* preferencialmente exclui o éxon 7 durante o junção e, como resultado, produz apenas uma pequena fração da proteína SMN funcional em comparação com *SMN1*. Portanto, o número de cópias de *SMN2* modifica o fenótipo da doença, e a presença de duas cópias de *SMN2* está associada à SMA1. Bebês com deleções bialélicas de *SMN1* e duas cópias de *SMN2* têm um risco de 97% de SMA1.

[00433] Estudos recentes da história natural de SMA1 (coorte histórica) mostraram que a idade média no início dos sintomas entre as crianças com a doença foi de 1,2 meses (variando de 0 a 4 meses), e a

doença foi caracterizada por hipotonia, astenia severa na infância precoce e incapacidade de sentar sem apoio. Em crianças com SMA1 que têm duas cópias de *SMN2*, a média de idade da morte ou a necessidade de ventilação não invasiva por pelo menos 16 horas por dia por pelo menos 14 dias consecutivos (considerada equivalente à ventilação permanente) foi de 10,5 meses. Em uma coorte de crianças afetadas, apenas 25% sobreviveu sem suporte ventilatório permanente aos 13,6 meses e 8% sobreviveu sem esse suporte em 20 meses. Outro estudo histórico prospectivo e multicêntrico patrocinado pelo National Institutes of Health (NeuroNEXT) envolvendo pacientes com duas cópias de *SMN2* mostrou uma sobrevida média livre de traqueostomia de 8 meses (intervalo de confiança de 95%, 6 a 17). Todos os pacientes com SMA1 apresentam declínio acentuado das funções respiratórias e de deglutição após o nascimento e, por fim, necessitam de suporte nutricional mecânico (através de sonda nasogástrica ou de gastrostomia) para manter uma nutrição adequada e reduzir os riscos respiratórios associados à aspiração. Para pacientes com SMA1, nos quais o início dos sintomas ocorre aos 3 meses de idade, a maioria dos pacientes necessita de suporte nutricional aos 12 meses de idade.

[00434] Os pacientes com SMA1 também não atingem os principais marcos na função motora e têm um declínio na função, conforme medido pela escala CHOP INTEND (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders), que varia de 0 a 64, com maiores escores indicando melhor função motora, uma ferramenta que é sensível a pequenas alterações na função motora, como movimentos antigravitacionais de membros. Em uma análise histórica de 34 pacientes com SMA1, todos, exceto 1 dos pacientes, não atingiram uma pontuação de pelo menos 40 após 6 meses de idade. No Coorte NeuroNEXT, os escores do CHOP INTEND diminuíram em uma média de 10,7 pontos de 6 meses a 12 meses de idade.

[00435] Estratégias terapêuticas para aumentar os níveis de proteína SMN em neurônios motores têm se concentrado em aumentar a eficácia da *SMN2*. Uma abordagem tem sido a liberação no sistema nervoso central de nusinersen (Ionis Pharmaceuticals / Biogen), um oligonucleotídeo antissenso que foi desenvolvido para inibir o junção do éxon 7 em *SMN2*. Este fármaco demonstrou melhorar a astenia no modelo murino de SMA grave e aumentar o tempo de vida médio dos camundongos afetados de 16 dias para 25 dias. Em dezembro de 2016, o nusinersen foi aprovado pelo Food and Drug Administration para o tratamento da SMA. Este fármaco é administrado por meio de injeções intra-tecais repetidas depois de quatro doses de ataque dentro de 2 primeiros meses da vida.

[00436] Um tratamento alternativo potencial para SMA1 é a terapia com gene, administrada como uma administração intravenosa única que libera uma cópia de *SMN* em um sorotipo viral adenoassociado autocomplementar 9 (scAAV9). (A região codificadora deste vírus recombinante forma um molde de DNA de fita dupla intramolecular [ou autocomplementar].) Esta abordagem tem induzido a expressão de SMN em neurônios motores e tecidos periféricos, o que contraria os efeitos da SMA em um modelo murino e estendeu a sobrevida média neste modelo de 15 dias para 28,5 dias com uma dose baixa ($6,7 \times 10^{13}$ vg por quilograma de peso corporal) e a mais de 250 dias com doses mais elevadas do vetor ($2,0 \times 10^{14}$ e $3,3 \times 10^{14}$ vg por quilograma).

[00437] Além de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir os neurônios do sistema nervoso central em todas as regiões da medula espinhal, a administração sistêmica de terapia gênica mediada por AAV9 pode ser vantajosa, dado que a proteína SMN é expressa de forma ubíqua e a SMA1 afeta múltiplos sistemas (por exemplo, sistemas nervosos autonômicos e entéricos, sistema cardiovascular e pâncreas), juntamente com muitos tipos de células (por exemplo, coração,

pâncreas e músculo esquelético). A característica autocomplementar do vetor, combinada com um híbrido de intensificador de citomegalovírus-promotor de beta-actina de galinha, permite a expressão rápida e sustentada de *SMN*. Em abril de 2014, iniciamos um estudo de terapia de substituição gênica envolvendo crianças com SMA1 que receberam uma dose única de scAAV9 com liberação do gene de sobrevivência do neurônio motor humano (hSMN), sob o controle do promotor de beta-actina de galinha (scAAV9.CB.hSMN) (AVXS-101).

Métodos

[00438] Paciente e Procedimentos do Estudo: Para os propósitos do estudo, todos os pacientes tiveram um diagnóstico geneticamente confirmado de SMA1, deleções homozigotas do éxon 7 de *SMN1* e duas cópias de *SMN2*. Os pacientes com o modificador da doença c.859G→C no éxon 7 de *SMN2* foram excluídos. Os pacientes selecionados apresentaram início da doença desde o nascimento até os 6 meses de idade, caracterizada por hipotonia determinada por avaliação clínica acompanhada de retardo nas habilidades motoras, controle deficiente da cabeça, postura projetada do ombro e hiper mobilidade das articulações. Pacientes com infecções virais ativas (incluindo HIV ou sorologia positiva para hepatite B ou C) ou doença concomitante que criasse riscos desnecessários para a transferência de genes foram excluídos do estudo. Os pacientes que necessitavam de suporte ventilatório invasivo (traqueotomia com pressão positiva) ou oximetria de pulso <95% de saturação na visita de seleção também foram excluídos.

[00439] Os pacientes foram incluídos em duas coortes, de acordo com a dose de terapia gênica que foi administrada. Pacientes na coorte 1 receberam uma dose baixa ($6,7 \times 10^{13}$ vg por quilograma) e foram inscritos ao longo de cinco meses; aqueles da coorte 2 receberam uma dose alta ($2,0 \times 10^{14}$ vg por quilograma) e foram inscritos ao longo de

um ano. No dia 30 após a dosagem, o ensaio ELISpot de IFN- γ no Paciente 1 na coorte 1 detectou uma resposta das células T e mostrou um pico súbito na formação de células endoteliais (SFCs) por 10^6 células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMCs) que foi > 50 direcionado contra o capsídeo de AAV9 (normal, <50 SFCs por 10^6 PBMCs). A prednisolona foi iniciada a 2 mg/kg e foi mantida por 35 dias até a resposta das células T e as transaminases séricas fossem reduzidas. Como resultado, o protocolo experimental foi alterado, e os Pacientes 2 a 15 receberam prednisolona oral em uma dose de 1 mg por quilograma por dia por aproximadamente 30 dias, começando 24 horas antes da administração do vetor do gene. O tratamento foi continuado com prednisolona mantida até que as enzimas AST e ALT caíssem abaixo do nível de 120 UI/L e a resposta das células T caísse abaixo de 100 SFCs por 10^6 PBMCs, em cujo ponto a prednisolona seria reduzida com base no julgamento clínico.

[00440] O vetor foi distribuído em solução salina normal (aproximadamente 10 a 20 ml por quilograma) que foi infundido intravenosamente durante um período de aproximadamente 60 minutos. No momento da inscrição, alguns pacientes necessitaram de alimentação enteral por meio de uma gastrostomia ou sonda nasogástrica, cuja escolha foi baseada na preferência dos pais ou do médico acompanhante. Uma vez inscritos no estudo, todos os pacientes que necessitaram de suporte nutricional foram submetidos à colocação de um tubo de gastrostomia, e os tubos não foram removidos durante o estudo.

[00441] Resultados: O resultado primário foi a determinação da segurança com base em qualquer evento adverso relacionado ao tratamento de grau 3 ou superior. O resultado secundário foi o tempo até a morte ou a necessidade de assistência ventilatória permanente. Este último foi definido como pelo menos 16 horas de assistência

respiratória por dia continuamente por pelo menos 14 dias na ausência de doença aguda reversível ou estado per-operatório. Os resultados exploratórios incluíram conquistas de marcos motores (particularmente sentado sem ajuda) e escores de CHOP INTEND.

[00442] A manutenção dos escores de mais de 40 pontos foi considerada clinicamente significativa na SMA na aplicação da escala CHOP INTEND. Sentar sem auxílio foi avaliado e classificado de acordo com os seguintes critérios: sentar sem auxílio por no mínimo 5 segundos, de acordo com o item 22 do subteste motor grosseiro Bayley Scales of Infant and Toddler Development ("sentado sem auxílio"); sentado sem ajuda por pelo menos 10 segundos, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) ("sentado sem ajuda pelos critérios da OMS"); e sentado sem ajuda por pelo menos 30 segundos, de acordo com o item 26 das Escalas de Bayley mencionadas acima ("sentar funcional independente"). Marcos motores principais foram confirmados por meio de um exame de gravações de vídeo dos pacientes por um revisor independente pelo Ability Captured Through Interactive Vídeo Evaluation-mini (ACTIVE-mini). Os potenciais de ação muscular compostos (CMAP) foram registrados a partir de eletrodos de superfície no início do estudo e a cada 6 meses após a infusão. O estado patológico dos músculos foi quantificado pela Miografia Elétrica de Impedância (EIM).

[00443] Análise Estatística: Análises de segurança foram realizadas em todos os pacientes, que também foram incluídos na análise primária de sobrevida (como definido acima e no protocolo) e em análises de alterações na escala CHOP INTEND desde o início até 1 mês e 3 meses. Tais mudanças da linha de base até cada visita de estudo foram analisadas com o uso de um modelo de efeitos mistos para medidas repetidas. O modelo misto incluiu os efeitos fixos de coorte e visita e uma covariável de escore da linha de base. O cumprimento de marcos

e o suporte nutricional e ventilatório foram analisados na coorte 2. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa SAS, versão 9.4. Todas as comparações com coortes históricas foram exclusivamente descritivas.

Resultados

[00444] Pacientes: Dos 16 pacientes que foram selecionados, 1 foi excluído por causa de títulos de anticorpos anti-AAV9 persistentemente elevados ($> 1:50$). Dos 15 pacientes que foram incluídos no estudo, 3 foram incluídos na coorte de baixa dose 1 e 12 foram incluídos na coorte de alta dose 2. A idade média dos pacientes no momento do tratamento foi de 6,3 meses (variando de 5,9 a 7,2) na coorte 1 e 3,4 meses (variando de 0,9 a 7,9) na coorte 2 (Tabela 28).

Tabela 28: Características Demográficas e Clínicas dos 15 Pacientes

Característica	Coorte 1 (N=3)	Coorte 2 (N=12)
Idade média (variação) - mo	6,3 (5,9-7,2)	3,4 (0,9-7,9)
Peso médio (variação) - kg	6,6 (6,0-7,1)	5,7 (3,6-8,4)
Sexo - no. (%)		
Masculino	1 (33)	5 (42)
Feminino	2 (67)	7 (58)
Raça - no. (%)		
Branca	3 (100)	5 (42)
Outras	0	1 (8)
Idade média no início dos sintomas (variação) - mo	1,7 (1,0-3,0)	1,4 (0-3,0)
Idade média no diagnóstico genético (variação) - dias	33 (4-85)	60 (0-136)
Escore médio na escala CHOP INTEND (variação)	16 (2-27)	28 (12-50)
Pacientes com suporte clínico - no. (%)		
Nutricional	3 (100)	5 (42)
Ventilatório	3 (100)	2 (17)

[00445] Sobrevida e Ventilação Permanente: A partir do final do estudo, todos os pacientes atingiram a idade de pelo menos 20 meses e não necessitaram de ventilação mecânica permanente; a média de idade em suas últimas avaliações pulmonares foi de 30,8 meses na coorte 1 e de 25,7 meses na coorte 2. Em contraste, apenas 8% dos pacientes em uma coorte histórica não necessitaram de ventilação mecânica permanente. Aos 29 meses de idade, um paciente na coorte 1 necessitou de ventilação permanente devido à hipersalivação. Após a ligadura da glândula salivar, a necessidade de uso de ventilação não invasiva foi reduzida em 25% para 15 horas por dia.

[00446] Avaliações da Função Motora: Todos os pacientes nas coortes 1 e 2 tiveram escores aumentados a partir da linha de base na escala CHOP INTEND e mantiveram essas mudanças durante o estudo. Os pacientes da coorte 2 tiveram aumentos médios de 9,8 pontos em 1 mês e 15,4 pontos em 3 meses ($P < 0,001$ para ambas as comparações); 11 pacientes atingiram e mantiveram escores de mais de 40 pontos. No ponto de corte do estudo em 7 de agosto de 2017, os pacientes da coorte 1 tiveram um aumento médio de 7,7 pontos a partir de uma linha de base média de 16,3 pontos, e os da coorte 2 tiveram um aumento médio de 24,6 pontos a partir da linha de base média de 28,2 pontos.

[00447] Marcos Motores na Coorte 2: Um total de 11 de 12 pacientes na coorte 2 foi capaz de sentar sem ajuda por pelo menos 5 segundos, 10 por pelo menos 10 segundos e 9 por pelo menos 30 segundos (Tabela 31). Um total de 11 alcançou o controle da cabeça, 9 conseguiram rolar e 2 foram capazes de engatinhar, puxar para ficar de pé, ficar de pé independentemente e andar de forma independente. Onze pacientes atingiram a capacidade de falar. Nenhum paciente nas coortes históricas alcançou nenhum desses marcos motores e raramente conseguiu a habilidade de falar.

Tabela 29: Sobrevida sem Eventos e Marcos Motores e Outros

entre os 12 Pacientes da Coorte 2

Variável	Idade na Entrada no Estudo	Sobrevida Eventual	Marcos Motores							Outras Realizações			
			Leva a mão à boca	Controla a cabeça	Rola	Senta com Auxílio	Senta sem Auxílio			Fala	Deglute	Sem Uso de NIV	Sem Suporte Nutricional
	mo						≥ 5 seg	≥ 10 seg	≥ 30 seg				
Paciente no.													
4	5,6	31,1	+	+	+	+	+			+	+		
5	4,2	28,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1,9	26,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	3,6	28,1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
8	7,9	32,4	+										
9	4,9	28,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0,9	25,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	2,3	23,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
12	2,6	23,9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	0,9	22,1	+	+		+	+	+	+	+	+		
14	4,1	22,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	2,1	20,6	+	+		+	+	+	+	+	+		
Pacientes com resultado (%)													
Este Estudo		100	100	92	75	92	92	83	75	92	92	58	50
Estudos Histórica Natural		8 por 20 mo	NA	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA	8 por 20 mo

[00448] Estado Pulmonar e Nutricional na Coorte 2: Entre os 12 pacientes na coorte 2, 10 não necessitaram de ventilação não invasiva no início do estudo, em comparação com 7 que eram independentes da assistência ventilatória na última consulta de acompanhamento (Tabela 29). No início do estudo, 7 pacientes não necessitaram de alimentação enteral, incluindo 1 que mais tarde precisou de colocação de um tubo de gastrostomia após a terapia de substituição de gene, possivelmente em associação com a cirurgia de escoliose. Dos 5 pacientes que haviam recebido alimentação enteral antes da terapia de substituição de gene, no último acompanhamento, 11 dos 12 pacientes haviam alcançado ou retido a capacidade de engolir de forma independente e 4 foram capazes de se alimentar por via oral.

[00449] Segurança: No final do estudo, um total de 56 eventos adversos graves foram observados em 13 pacientes nas duas coortes. Destes eventos, os investigadores determinaram que 2 eventos eram eventos de grau 4 relacionados ao tratamento com base em valores laboratoriais, de acordo com os Critérios de Terminologia Comum para Eventos Adversos (Tabela 30). O paciente 1 na coorte 1 tinha elevações nos níveis séricos de aminotransferase (31 vezes o limite superior da faixa normal para alanina aminotransferase (ALT) e 14 vezes o limite superior para aspartato aminotransferase (AST)) sem outras anormalidades da função hepática (ou seja, bilirrubina total e indireta e fosfatase alcalina) e sem manifestações clínicas. Como descrito acima, essas elevações foram atenuadas pelo tratamento com prednisolona, que foi posteriormente administrada nos demais pacientes. Um paciente na coorte 2 necessitou de prednisolona adicional para atenuar os níveis séricos elevados de ALT e AST (35 vezes o limite superior do intervalo normal para ALT e 37 vezes para AST). Dos 241 eventos adversos não graves, 3 foram considerados como relacionados ao tratamento e consistiram em elevações assintomáticas nos níveis séricos de

aminotransferase em 2 pacientes (ALT e AST, ambas menos de 10 vezes o limite superior da faixa normal), que foram resolvidos sem adicional tratamento com prednisolona (Tabela 30). Não houve outras anormalidades no teste da função hepática. Dos 15 pacientes, 14 tinham doenças respiratórias, que em crianças com SMA1 frequentemente resultam em morte ou necessidade de traqueostomia.

Tabela 30: Eventos Adversos

Evento	Coorte 1 (N=3)		Coorte 2 (N=12)		Todos os Pacientes (N=15)	
	Eventos	Pacientes	Eventos	Pacientes	Eventos	Pacientes
	no.	no. (%)	no.	no. (%)	no.	no. (%)
Qualquer evento adverso	44	3 (100)	253	12 (100)	297	15 (100)
Qualquer evento adverso grave	7	3 (100)	49	10 (83)	56	13 (87)
Evento adverso associado com tratamento	1	1 (33)	4	3 (25)	5	4 (27)
Evento adverso comum						
Infecção trato respiratório superior	3	1 (33)	26	10 (83)	29	11 (73)
Vômito	0	0	11	8 (67)	11	8 (53)
Constipação	4	4 (33)	9	7 (58)	10	8 (53)
Pirexia	1	1 (33)	10	6 (50)	11	7 (47)
Congestão nasal	0	0	8	6 (50)	8	6 (40)
Refluxo gastro-esofágico	1	1 (33)	6	5 (42)	7	6 (40)
Infecção por Enterovirus	1	1 (33)	7	4 (33)	8	5 (33)
Pneumonia	0	0	11	5 (42)	9	5 (33)
Infecção por Rhinovirus	1	1 (33)	10	4 (33)	11	5 (33)
Tosse	0	0	9	5 (42)	9	5 (33)
Otite média	6	2 (67)	3	2 (17)	9	4 (27)
Nível elevado de aminotransferase	1	1 (33)	3	3 (25)	4	4 (27)

Evento	Coorte 1 (N=3)		Coorte 2 (N=12)		Todos os Pacientes (N=15)	
	Eventos	Pacientes	Eventos	Pacientes	Eventos	Pacientes
	no.	no. (%)	no.	no. (%)	no.	no. (%)
Insuficiência respiratória	1	1 (33)	5	3 (25)	6	4 (27)
Infecção por vírus Parainfluenza	1	1 (33)	4	3 (25)	5	4 (27)
Exantema	0	0	5	4 (33)	5	4 (27)
Atelectasia	0	0	4	4 (33)	4	4 (27)
Gastroenterite iral	0	0	4	4 (33)	4	4 (27)
Rinorreia	0	0	4	3 (25)	4	3 (20)
Bronquiolite	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Diarreia	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Infecção do ouvido	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Lesão por queda	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Rinovírus humano	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)
Faringite estreptocócica	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Vírus sincicial respiratório						
Pneumonia	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Bronquiolite	1	1 (33)	2	2 (17)	3	3 (20)
Infecção trato respiratório superior	0	0	3	3 (25)	3	3 (20)

[00450] Uma única infusão intravenosa de vetor viral adenoassociado contendo DNA que codifica SMN em pacientes com SMA1 resultou em maior sobrevida do que em coortes históricas com esta doença. Todos os 15 pacientes ultrapassaram a média da idade de sobrevida sem ventilação permanente de 10,5 meses para pacientes com SMA1 com duas cópias de *SMN2*. Todos os pacientes ultrapassaram o valor de referência de 20 meses, tempo em que apenas

8% dos pacientes com essa doença normalmente sobrevivem sem ventilação permanente. 4 dos 12 pacientes da coorte 2, todos, exceto 1, atingiram metas de função motora que não tinham sido relatadas em coortes históricas. A função motora atingida era clinicamente significativa, como refletida pela alimentação (mão a boca), sentar e falar. A maioria dos pacientes que não necessitaram de cuidados de suporte no momento da inclusão estavam livres de suporte nutricional (6 de 7 pacientes) e suporte ventilatório (7 de 10 pacientes) na última consulta de acompanhamento. Nas duas coortes, os pacientes tiveram aumentos na pontuação na escala CHOP INTEND a partir da linha de base. Dentro do primeiro mês na coorte 2, o aumento médio foi de 9,8 pontos, em contraste com um declínio de uma média de mais de 10 pontos entre 6 e 12 meses de idade na coorte histórica no estudo NeuroNEXT.

[00451] Os estudos pré-clínicos da terapia de substituição do gene *SMN* no modelo de camundongo *SMN Δ 7* mostraram melhorias na sobrevivência e na função motora com o tratamento precoce, presumivelmente em um momento em que os neurônios motores ainda estão intactos. Os achados clínicos em nosso estudo de tratamento precoce refletiram a direção daqueles nos estudos pré-clínicos. Dois pacientes foram capazes de engatinhar, ficar em pé e andar sem apoio após o tratamento precoce. Ambos os pacientes tinham história familiar de SMA, o que provavelmente contribuiu para o diagnóstico precoce. Embora todos os pacientes das duas coortes em nosso estudo tenham continuado a apresentar melhorias na função motora, os dados pré-clínicos e clínicos sugerem um benefício para o tratamento precoce e o rastreamento neonatal para a SMA.

[00452] Os eventos adversos graves causados pela terapia de substituição do gene de AAV limitaram-se a níveis séricos elevados de aminotransferase sem outras anormalidades de enzimas hepáticas

aproximadamente três semanas após o tratamento em dois pacientes; dois outros pacientes tiveram elevações que não atingiram o ponto de corte para a definição de eventos adversos graves (isto é, > 10 vezes da variação normal). Elevações nas enzimas hepáticas foram atenuadas pelo tratamento com prednisolona. Um paciente passou no rastreamento devido à presença de anticorpo anti-AAV9, o que é consistente com estudos populacionais que sugerem uma baixa taxa de soropositividade anti-AAV9 entre crianças e adultos jovens e taxas crescentes de soropositividade anti-AAV9 entre pessoas com mais de 40 anos de idade. No entanto, a presença de anticorpos para o vírus pode ser uma limitação da terapia de substituição do gene AAV.

[00453] Este estudo utilizou um projeto de grupo único com uma coorte histórica como controle, que tem um de um número limitado de opções quando a história natural de uma doença é bem caracterizada e letal. A fim de selecionar uma amostra homogênea que fosse similar àquela em estudos históricos publicados, restringimos a inclusão para incluir apenas pacientes sintomáticos com SMA1 que apresentavam mutações bialélicas de *SMN1* e duas cópias de *SMN2* e não incluímos pacientes com o modificador genético c.859G→C no éxon 7 de *SMN2*, já que modificador genético prevê um fenótipo mais suave da doença. No entanto, esta terapia de substituição de genes não precisa ser limitada a pacientes sintomáticos, ou pacientes com um subtipo genômico específico.

[00454] Em conclusão, uma infusão intravenosa única de uma dose alta de vetor viral adenoassociado que contém o DNA que codifica SMN em pacientes com SMA1 resultou em sobrevida prolongada, melhorou a função motora e aumentou os escores na escala CHOP INTEND para níveis que não tinham sido previamente observado nesta doença. Tais melhorias resultaram em um percentual menor de pacientes que necessitavam de cuidados de suporte do que aqueles em estudos

históricos. Em acompanhamentos de até 2 anos, nenhum declínio de efeito ou regressão clínica na função motora havia sido relatado. Vários pacientes tiveram elevações transitórias e assintomáticas nos níveis de aminotransferase. Mais estudos são necessários para avaliar a segurança em longo prazo e a durabilidade da terapia de substituição de gene em pacientes com SMA1.

Exemplo 15: Farmacocinética de scAAV9.CB.hSMN

[00455] Estudos farmacocinéticos clínicos convencionais não são aplicáveis a produtos de terapia de substituição de genes. No entanto, os estudos de eliminação do vetor scAAV9CB.hSMN que avaliam a quantidade de vetor eliminada do corpo através de fluidos e resíduos, são uma medida que pode ser usada em vez de estudos farmacocinéticos convencionais para terapias de substituição de genes.

[00456] A eliminação do vetor após a infusão com scAAV9CB.hSMN foi investigada em vários pontos de tempo durante o estudo clínico. Amostras de saliva, urina e fezes foram coletadas semanalmente até o dia 30 e depois mensalmente até o Mês 12 e a cada 3 meses a partir de então. Amostras de 5 pacientes foram usadas para a análise de supressão do vetor scAAV9CB.hSMN pela reação em cadeia da polimerase digital droplet até a visita do Mês 18. Todos os 5 pacientes analisados quanto a eliminação do vetor scAAV9CB.hSMN foram tratados com a dose terapêutica de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg.

[00457] scAAV9.CB.hSMN foi detectável em amostras eliminadas após a infusão. As concentrações de scAAV9.CB.hSMN na urina e saliva foram de 0,1% a 0,01% da concentração inicial no corpo no dia 1 após a infusão, após o que as concentrações caíram abaixo do limite de quantificação. Nas fezes, níveis de 10% a 30% da concentração inicial no corpo foram detectáveis no dia 1 depois da infusão. Um paciente apresentou um pico de concentração nas fezes no dia 14 após a infusão de 280% da concentração inicial no corpo. Em contraste, 3 pacientes

para os quais os dados estavam disponíveis mostraram uma concentração de <1% da concentração inicial no corpo no dia 14 após a infusão, com as concentrações diminuindo aproximadamente 4 logs (10.000 vezes) ao longo de 30 dias após a infusão. Em geral, scAAV9.CB.hSMN foi primeiramente eliminado do corpo pelas fezes e no dia 60 após a fusão foi abaixo do limite de quantificação nas fezes.

Exemplo 16: Testes toxicológicos não clínicos

[00458] Farmacologia Animal: Após a infusão do vetor scAAV9.CB.hSMN em um modelo de camundongo SMA delta 7 (camundongos SMNΔ7), o peso corporal aumentado, comportamento de endireitamento melhorado, sobrevida significativamente prolongada de maneira dose dependente e déficits cardíacos relacionados à SMA voltaram ao normal em comparação com camundongos SMNΔ7 não tratados

[00459] Toxicologia animal: Após a infusão intravenosa camundongo, o vetor e o transgene foram amplamente distribuídos com a expressão mais elevada geralmente observada no coração e no fígado e expressão substancial no cérebro e na medula espinal. Nos estudos toxicológicos em camundongo com duração de 3 meses, em conformidade com as Boas Práticas de Laboratório (GLP), os principais órgãos-alvo da toxicidade foram o coração e o fígado. Os achados relacionados ao vetor scAAV9.CB.hSMN nos ventrículos do coração eram compostos por inflamação, edema e fibrose relacionados à dose, e no átrio, inflamação e trombose. Os achados hepáticos foram compostos por hipertrofia hepatocelular, ativação de células de Kupffer e necrose hepatocelular dispersa. Nenhum Nível Sem Efeitos Adversos (NoAEL) foi identificado para os achados cardíacos e hepáticos relacionados ao vetor scAAV9.CB.hSMN no camundongo e a Dose Máxima Tolerada foi definidos como $1,5 \times 10^{14}$ vg/kg, fornecendo uma margem de segurança de aproximadamente 1,4 vezes em relação à

dose terapêutica recomendada de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg. A traduzibilidade dos achados observados em camundongos para primatas não é conhecida no momento.

Exemplo 17: Atrofia Muscular Espinhal em Pacientes Pediátricos

[00460] Este ensaio foi um estudo de Fase 1 que avalia a segurança e a eficácia de do vetor scAAV9.CB.hSMN em pacientes com SMA Tipo 1 testados geneticamente para confirmar deleções bialélicas de *SMN1*, 2 cópias de neurônio motor de sobrevivência 2 (*SMN2*), achados negativos para a modificação de c.859G>C no éxon 7 e com o início de sintomas clínicos antes dos 6 meses de idade. O vetor scAAV9.CB.hSMN foi administrado por via intravenosa durante uma infusão de dose única em pacientes de 0,9 a 7,9 meses de idade. Duas coortes foram tratadas: a Coorte 1 (n = 3) recebeu a dose baixa usada neste estudo e a Coorte 2 (n = 12) recebeu a dose alta (dose terapêutica: $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg) usada neste estudo. Os resultados relatados do estudo refletem a Coorte 2 e incluem o acompanhamento de todos os pacientes até 24 meses após a infusão do vetor scAAV9.CB.hSMN.

Mortalidade e Sobrevida Livre de Eventos

[00461] Análises de sobrevida e de tempo até um evento apoiam a eficácia do vetor scAAV9.CB.hSMN. Na Coorte 2, todos os 12 pacientes (100%) tinham mais de 24 meses de idade e eram livres de eventos, ao contrário de apenas 8% dos pacientes em um estudo de história natural. Isto indica um aumento significativo e clinicamente significativo na sobrevida global para pacientes infundidos com o vetor scAAV9.CB.hSMN quando comparados a pacientes não tratados. Aos 2 anos após a infusão, não foram relatados óbitos de pacientes.

Desenvolvimento de Marcos Motores

[00462] O desenvolvimento de marcos motores foi examinado; as avaliações para todos os 15 pacientes foram gravadas em vídeo para

permitir a confirmação da obtenção do desenvolvimento de marcos motores. Pacientes na Coorte 2 consistentemente atingiram e mantiveram os principais marcos motores do desenvolvimento. Aos 24 meses de acompanhamento pós-dose, 11 pacientes (91,7%) foram capazes de manter a cabeça ereta por ≥ 3 segundos e sentar e permanecer sem apoio por ≥ 5 segundos, 10 pacientes (83,3%) foram capazes de se sentar sem apoio por ≥ 10 segundos, 9 pacientes (75,0%) foram capazes de sentar sem apoio por ≥ 30 segundos e 2 pacientes cada (16,7%) conseguiram ficar de pé sozinhos, andar com auxílio e andar sozinhos. Os pacientes da Coorte 2 que estão atualmente arrolados em um acompanhamento observacional contínuo a longo prazo deste estudo mantiveram o desenvolvimento de seus marcos motores, com alguns atingindo marcos motores adicionais.

Tabela 31: Pacientes que desenvolveram marcos importantes da função motora com base na revisão central independente com 24 meses de acompanhamento pós-dose (conjunto de análise completa)

	Vetor scAAV9.CB.hSMN Coorte 2 (N = 12) n (%)
Rolando (de costas para ambos os lados)	9 (75,0)
Mantem a cabeça ereta ≥ 3 segundos, sem apoio	11 (91,7)
Senta sem apoio, sentar não independente	11 (91,7)
Senta sem apoio ≥ 5 segundos	11 (91,7)
Senta sem apoio ≥ 10 segundos	10 (83,3)
Senta sem apoio ≥ 30 segundos	9 (75,0)
De pé com auxílio	2 (16,7)
De pé sozinho	2 (16,7)
Anda com auxílio	2 (16,7)
Anda sozinho	2 (16,7)

Pulmonar

[00463] Dos 10 pacientes na Coorte 2 que não estavam usando ventilação não invasiva (NIV) no início do estudo, 7 estavam livres de uso diário de NIV com 24 meses de acompanhamento. Quase todos os pacientes experimentaram doenças respiratórias comuns na infância que, em crianças com SMA tipo 1, geralmente resultam em traqueostomia ou morte. Todos os pacientes sobreviveram a internações respiratórias sem traqueostomia ou necessidade de ventilação permanente.

Nutricional

[00464] Ganhos nutricionais também foram observados. Na Coorte 2, sete pacientes não receberam nutrição enteral antes da terapia de substituição de gene. Um (1) desses 7 pacientes teve suporte nutricional para auxiliar a cicatrização de feridas após uma difícil recuperação da cirurgia de escoliose, mas também estava se alimentando por via oral. Quatro (4) dos 5 pacientes na Coorte 2 que receberam alimentação enteral antes da terapia de substituição de gene foram capazes de se alimentar por via oral no final do estudo; assim, um total de 11 dos 12 pacientes da Coorte 2 foi capaz de se alimentar por via oral, 6 exclusivamente.

Função motora (CHOP-INTEND)

[00465] Os pacientes que receberam a dose terapêutica alcançaram melhorias de função motora estatisticamente significativas no Mês 1 e no Mês 3; aumentos médios no Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP-INTEND) desde o início foram de 9,8 pontos ($n = 12$, $P < 0,001$) e 15,4 pontos ($n = 12$, $P < 0,001$), respectivamente.

[00466] Melhorias na função motora foram mantidas ao longo do tempo em pacientes infundidos com o vetor scAAV9.CB.hSMN. Onze dos doze (91,7%) pacientes da Coorte 2 obtiveram um escore ≥ 50

pontos no CHOP-INTEND aos 24 meses. Intervenção precoce e dose parecem afetar positivamente a resposta. Na prática clínica geral, crianças com SMA Tipo 1 de 6 meses de idade ou mais não tratadas não ultrapassam uma pontuação de 40 pontos no CHOP-INTEND. Além disso, um declínio médio de 10,7 pontos entre as idades de 6 e 12 meses foi relatado entre os bebês não tratados acompanhados como parte de uma história natural prospectiva.

Exemplo 18: Medida do DNA residual da célula hospedeira em vetores virais de AAV9 usando qPCR

Método

[00467] Este método foi usado para a quantificação do hcDNA residual na substância de fármaco de AAV, por exemplo, AVXS-101, e amostras em processo por qPCR. Até seis amostras foram testadas por placa. Um ensaio de qPCR foi realizado utilizando uma sonda TaqMan. A sonda TaqMan tem um corante repórter fluorogênico ligado a extremidade 5' e um supressor não fluorescente ligado a extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do supressor com o corante repórter reduz grandemente a fluorescência emitida pelo corante repórter. A clivagem da sonda separa o corante repórter e o supressor, aumentando a fluorescência do repórter.

[00468] Iniciadores a frente e reverso flanqueadores, projetados para se ligar a uma sequência repetitiva dentro do genoma humano, foram adicionados à mistura de reação e anelados para a sequência alvo presente na amostra e nos padrões. A sonda fluorogênica TaqMan emparelhada entre os sítios do iniciador. Ciclos sucessivos de desnaturação de molde, anelamento do iniciador e extensão de produto amplificaram a sequência alvo. Durante a etapa de extensão do ciclo de amplificação, a atividade de exonuclease da Taq DNA polimerase liberou o corante repórter da sonda, liberando o corante do supressor, resultando em uma emissão de fluorescência proporcional à quantidade

de molde.

[00469] A fluorescência de cada poço de uma placa de 96 poços foi medida por um instrumento de qPCR. Através de ciclos adicionais de PCR, quantidades crescentes da sequência alvo foram feitas e o resultado é que mais corante repórter foi liberado da sonda e maior fluorescência em cada ciclo de PCR sucessivo. O número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente atinja um valor limite predeterminado é medido. Este ciclo é referido como o ciclo limite ou valor CT. Quanto maior a concentração inicial de DNA na amostra ou no poço padronizado, menor o número de ciclos de PCR necessários para atingir o nível limite de fluorescência e menor o valor de CT. A curva padrão é determinada representando em gráfico $\log_{10}$ (concentração de DNA) versus o valor de CT medido para cada ponto padrão. O valor de CT é usado para determinar a quantidade de DNA presente na amostra usando o valor CT individual para a amostra e resolvendo o valor de DNA.

[00470] As amostras foram primeiro preparadas usando um kit Wako DNA Extractor (Wako, 295-50201). Resumidamente, as amostras para teste foram bem misturadas e diluídas 1000 vezes. As amostras diluídas foram divididas em quatro tubos (500 µl cada) e 50 µl de água foram adicionados a dois dos tubos (réplicas não enriquecidas) enquanto 50 µl de 30.000 pg / mL de DNA padronizado foram adicionados aos outros dois tubos (controle enriquecido). A solubilização das proteínas foi realizada adicionando 20 µL de solução de N-Lauroil Sarcosinato de Sódio a cada tubo, centrifugando por 5 segundos e depois centrifugando rapidamente. Solução Nal contendo glicogênio e Pellet Paint (Novagen, 70748) foi preparada de tal forma que eles estavam em uma proporção de 2000:5:4 de Nal:Glicogênio:Peillet Paint. 500 µl da mistura Nal foram adicionados a cada tubo e incubados a $53^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Os tubos foram removidos do calor misturados com 900 µL de isopropanol

e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 10 000 g durante 15 min a 18°C e o sobrenadante foi decantado. O pélete remanescente foi lavado com 800 µL de Solução de Lavagem A, centrifugado e peletizado de novo duas vezes. Finalmente, o pélete foi lavado com 1500 µL de Solução de Lavagem com Isopropanol gelado contendo glicogénio, centrifugado e peletizado novamente. O pélete final foi suspenso novamente em 500 µL em água sem nucleasse.

[00471] A qPCR foi realizada utilizando um kit resDNA SEQ Human Quantitative (Applied Biosystems, A26366). Uma Mistura de Reação foi preparada pela combinação de 2x Environmental Master Mix, 10 x Mistura de Ensaio de DNA Humano e controle Negativo como instruído no kit. 20 µL da Mistura de Reação foram misturados com 10 µL de amostra preparada e adicionados a cada poço na placa de PCR. Cada amostra foi plaqueada em triplicata. A placa foi selada com filme adesivo óptico. Durante a termociclagem, uma fusão foi realizada primeiro a 95°C durante 10 min e, em seguida, as amostras foram submetidas a ciclos entre 95°C durante 15 seg e 60 C durante 1 min por 40 ciclos

[00472] Uma curva padronizada foi gerada representando em gráfico o valor de CT versus a quantidade de DNA em log ([pg / mL]). Os dados foram ajustados para uma linha reta dada pela seguinte equação:

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

onde x = concentração do padrão em pg / mL, m é a inclinação e b é o intercepto y. A concentração do DNA da célula hospedeira foi calculada de volta a partir do valor CT do poço utilizando a equação acima, depois corrigida pelo fator de diluição.

Resultados

[00473] O DNA residual da célula hospedeira medido por qPCR foi de $3,7 \times 10^5$ pg/mL para o lote anterior de vetor, $0,76 \times 10^5$ pg/ml para o lote 600156 de AVXS-101, $0,68 \times 10^5$ pg/ml para o Lote 600307 de

AVXS-101 e 3×10^5 pg/mL para AVXS-201 DS.

Exemplo 19: Medida da proteína residual da célula hospedeira (HCP) por ELISA em vetores virais de AAV9

Método

[00474] A concentração da proteína da célula hospedeira (HCP) em amostras de AVXS-101 foi medida usando um kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima comercial (ELISA). O Kit Cygnus Technologies Human Embryonic Kidney 293 HCP ELISA é um imunoenensaio enzimático de dois sítios em fase sólida. É baseado em uma técnica intercalada direta na qual dois anticorpos policlonais são direcionados contra determinantes antigênicos separados de HCP. Durante a incubação, o HCP na amostra se ligou com anticorpos anti-HCP ligados a um poço de microplaca e com anticorpos anti-HCP conjugados com peroxidase em solução.

[00475] Após o período de incubação, os poços foram lavados para remover qualquer anticorpo não ligado a enzima. Uma solução de substrato 3,3',5,5' -tetrametilbenzidina (TMB) foi então adicionada aos poços. A ligação da peroxidase conjugada catalisou uma reação de mudança de cor no substrato. A reação foi interrompida pela adição de ácido, que deu um ponto final colorimétrico que pôde ser lido espectrofotometricamente a 450 nm. A quantidade de substrato hidrolisado foi diretamente proporcional à concentração de HCP presente.

[00476] As amostras a serem testadas foram diluídas para atender a faixa do método, de 4 ng/mL a 200 ng/mL. Cada amostra foi então diluída duas vezes em SDB (110 µl de amostra e 110 µl de SDB) e misturada. Controles enriquecidos também foram feitos para verificar a consistência. Nos controles enriquecidos, 110 µL de cada amostra foram misturados com 27,5 µL de HCP padronizado 200 ng/mL e 82,5 µl de SDB. Finalmente, 50 µl de cada padrão, amostra de controle ou

teste foram adicionados a um poço na placa de 96 poços e misturados com 100 µl de anti-HEK 293 conjugado com HRP. Todas as condições foram plaqueadas em triplicata. A placa foi selada com uma fita de selagem e agitada a 400-600 rpm durante 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, as soluções nos poços foram removidas sacudindo a placa de cabeça para baixo e secando com uma toalha absorvente. Os poços foram lavados com um frasco de lavagem, absorvidos rapidamente e batidos sem deixar a solução de lavagem embeber nos poços. A lavagem foi repetida 4 vezes e deixada em repouso durante cerca de 20 segundos para drenar após a última lavagem. Finalmente, foram adicionados 100 µl de Substrato TMB a cada poço da placa e incubados durante 20-30 min em temperatura ambiente sem agitação. A reação foi extinta adicionando 100 µl de solução de extinção a cada poço. A placa foi carregada em um leitor de placas dentro de 45 min da adição da Solução de Extinção e a placa foi lida a 450 nm e 650 nm.

[00477] A absorbância média dos padrões foi representada em gráfico contra a concentração teórica de HCP dos padrões em um gráfico semilogarítmico para gerar uma curva de ajuste logístico de quatro parâmetros (4PL) com base na seguinte equação:

[00478] $Y = [(A - D) / (1 + (X / C)^B)] + D$ onde A é a assíntota inferior, B é o coeficiente de Hill, C é a concentração correspondente aos valores do ponto médio da absorbância entre as duas assíntotas (ng/mL), D é a parte superior da assíntota, X é a concentração da amostra (ng/mL) e Y é a absorbância. A curva padronizada foi então usada para determinar a concentração de HCP no controle de amostra enriquecida e as amostras de teste não enriquecidas usando SoftMax Pro Software. O teste só foi aceito se o r^2 da curva padronizada era $\geq 0,98$, a absorbância média corrigida do padrão de 200 ng/mL foi $> 1,0$ OD, a absorbância média corrigida do padrão 0 ng/mL foi $\leq 0,2$ OD e o coeficiente de

variação da absorbância corrigida de 3 poços em replicata foi $\leq 15\%$. A concentração final de HCP para cada amostra foi calculada usando a equação:

Concentração de HCP_{amostra} (ng/mL) = Fator de diluição x Concentração média de HCP medida (ng/mL).

Resultados

[00479] A proteína residual da célula hospedeira medida por ELISA estava abaixo do limite de quantificação (8 ng/mL) para o lote anterior de vetor, Lote 600156 de AVXS-101, Lote 600307 de AVXS-101 e AVXS-201 DS.

Exemplo 20: Medida da benzonase residual nos vetores virais de AAV9 por ELISA

Método

[00480] A concentração residual de benzonase no produto de AAV, por exemplo, AVXS-101, foi medida utilizando um kit de ensaio imunosorvente ligado a enzima comercial (ELISA). O Kit Merck Benzonase Endonuclease ELISA Kit II é um imunoensaio enzimático de dois sítios em fase sólida. Ele é baseado em uma técnica sanduiche direta em que dois anticorpos policlonais são direcionados contra determinantes antigénicos separados da Benzonase. Durante a incubação, a Benzonase na amostra se ligou a anticorpos anti-Benzonase ligados a um poço de microplaca e a anticorpos anti-Benzonase conjugados à peroxidase em solução.

[00481] Após o período de incubação, os poços foram lavados para remover qualquer enzima não ligada ao anticorpo conjugado. Uma solução de substrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi então adicionada aos poços. O conjugado ligado a peroxidase catalisou uma reação de mudança de cor no substrato. A reação foi interrompida pela adição de ácido, que deu um ponto final colorimétrico que pode ser lido espectrofotometricamente a 450 nm. A quantidade de substrato

hidrolisado é diretamente proporcional à concentração de benzonase presente.

[00482] Resumidamente, as amostras foram diluídas 2 vezes pela combinação de 175 µL de amostra com 175 µL de PBST. Paralelamente, foi também preparado um controla de amostra enriquecido com benzonase combinando 175 µL de amostra com 35 µL de 10 ng/mL de padrão de Benzonase e 140 µL de PBST. Tiras de ELISA pré-revestidas do kit foram montadas em um suporte de tira e 100 µL de cada mistura de teste foi carregada por poço. Para os brancos, 100 µL de PBST foram carregados ao invés da amostra. Cada condição foi carregada em triplicata. A placa foi selada e incubada em temperatura ambiente durante 2 horas $\pm$ 5 minutos com agitação em um agitador de placas (450 rpm). Após a incubação, o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada pela adição de ~ 350 µl de PBST utilizando uma immunowasher e incubada por 1 minuto, então, invertida e batida em uma toalha absorvente. Um total de 3 lavagens foram realizadas antes que 100 µL de Anticorpo Conjugado HRP diluído terem sido adicionados a cada poço. A placa foi selada e incubada em temperatura ambiente durante 1 hora $\pm$ 5 minutos com agitação em um agitador de placas (450 rpm). Após a incubação, o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada adicionando-se ~ 350 µL de PBST utilizando uma immunowasher e incubado por 1 minuto, em seguida, invertido e batido em uma toalha absorvente. Um total de 3 lavagens foram realizadas antes que 100 µL de substrato TMB foi adicionado a cada poço. A placa foi selada e o conteúdo foi incubado durante 15-40 minutos em temperatura ambiente sem agitação no escuro. A reação foi extinta adicionando-se 100 µL de H₂SO₄ Stop Solution 0,2 N a cada poço. A absorbância da placa foi medida usando um espectrofotômetro a 450 nm no prazo de 45 minutos após a adição da Stop Solution.

[00483] A absorbância média dos padrões foi representada em

gráfico contra a concentração teórica de Benzonase dos padrões em um gráfico semi-logarítmico para gerar uma curva de ajuste logístico de quatro parâmetros (4PL) com base na seguinte equação:

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

[00484] onde A é a assíntota inferior, B é o declive de Hill, C é a concentração correspondente aos valores de absorbância do ponto médio entre as duas assíntotas (ng/mL), D é a assíntota superior, X é a concentração da amostra (ng/mL) e Y é a absorbância. A curva padrão foi então usada para determinar a concentração de HCP na amostra de enriquecida e as amostras de teste não enriquecidas usando SoftMax Pro Software. O teste só foi aceito se o r^2 da curva padrão foi $\geq 0,98$, a média da absorbância corrigida de 2,5 ng/mL foi $\geq 1,0$ OD, a absorbância corrigida média do padrão de 0,10 ng/mL foi maior do que a OD média do PBST em branco, e o coeficiente de variação da absorbância corrigida ao longo de 3 poços em replicata foi $\leq 15\%$. A concentração final de HCP para cada amostra foi calculada usando a equação:

Concentração_{amostra} de benzonase (ng/mL) = Fator de diluição x Concentração de benzonase medida média (ng/mL).

Resultados

[00485] A concentração residual de benzonase medida por ELISA estava abaixo do limite de quantificação (0,2 ng / mL) para o lote anterior de vetor, Lote 600156 de AVXS-101, Lote 600307 de AVXS-101 e AVXS-201 DS.

Exemplo 21: Medida da concentração de proteína em vetores virais de AAV9 pelo Micro Ensaio BCA

Método

[00486] A quantidade de proteínas em processo, substância de fármaco e amostras do produto de fármaco, por exemplo, de AVXS-101, foi medida por ensaio de microplaca BCA, usando um padrão de

proteína de referência de Albumina de Soro Bovino 2 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, 23209) e um kit de ensaio de proteína Micro BCA (Thermo Fisher Scientific, 23235). O ensaio é baseado em uma formulação de ácido bicinchonico (BCA) compatível com detergente para detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. O BCA detecta Cu^{1+} que é formado quando o Cu^{2+} é reduzido pela proteína em um ambiente alcalino. Um produto de reação de cor púrpura é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso (Cu^{1+}), que exibe uma forte absorbância em 562 nm que é linear com concentrações crescentes de proteína.

[00487] Resumidamente, os padrões foram preparados através da realização de diluições em série de 2 mg/mL de BSA em diluente (diluição de 20 vezes do Tampão de Formulação, NaCl 200 mM, Tris 20 mM, MgCl_2 1mM, Pluronic F-68 0,001% p/v , pH 8,0). As amostras de teste de AVXS-101 foram também diluídas 20 vezes em água e diluições em série feitas em Diluente. A concentração alvo é de cerca de 7,5 $\mu\text{g/mL}$. O Reagente de Trabalho (WR) foi preparado misturando 25 partes do Reagente A de Micro BCA, 24 partes do Reagente B e 1 parte do Reagente C do kit. 150 μL de cada padrão e amostra de teste foram carregados em triplicata em uma placa de 96 poços e misturados com 150 μL de WR. A placa foi selada e agitada a 300 rpm em um agitador de placas durante 30 segundos. A placa foi então incubada sem agitação a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 1000 rpm durante 2 minutos para coletar a condensação e a placa foi resfriada durante 15-60 minutos após a incubação. A placa foi lida em um leitor de placas a 562 nm e os dados foram analisados com o SoftMax Pro.

[00488] A absorbância média dos padrões versus a concentração teórica de proteína dos padrões foi representada em um gráfico semi-logarítmico e um ajuste quadrático foi gerado. O ajuste quadrático é

baseado na equação:

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

[00489] onde A, B, C são parâmetros de ajuste de curva, x é a concentração de amostra em μL e Y é a absorbância em OD. O teste só foi aceito se o r^2 da curva padrão era $\geq 0,98$, a absorbância média do branco foi menor que a do padrão mais baixo ($1 \mu\text{g/mL}$), e o coeficiente de variação da absorbância ao longo de 3 poços em replicata de cada padrão era $\leq 10\%$. A curva padrão foi então usada para determinar a concentração de proteína nas amostras de teste. A concentração final de proteína foi calculada usando a equação:

Concentração Total de Proteína ($\mu\text{g/mL}$) = Fator de Diluição x Média da concentração de proteína medida ($\mu\text{g/mL}$).

Resultados

[00490] A concentração total de proteína medida por Micro BCA foi de $16 \mu\text{g/mL}$ por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL para o lote anterior de vetor, $179 \mu\text{g/mL}$ por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL para o Lote 600156 do AVXS-101, $176 \mu\text{g/mL}$ por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL para o AVXS 101 lote 600307, $182 \mu\text{g/mL}$ por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL para AVXS-201 DP e $418 \mu\text{g/mL}$ por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL para AVXS-301 DP.

Exemplo 22: Pureza e Especificações de Liberação de AVXS-101, AVXS-201 e AVXS-301

[00491] A Substância de Fármaco AVXS-101 e o Produto de Fármaco AVXS-101 dos Exemplos 1 a 4 foram testados quanto à sua pureza. A Tabela 32 e 33 mostra os critérios de especificação e liberação para esses produtos.

Tabela 32: Especificação de liberação para a Substancia de Fármaco AVXS-101

Impureza Relacionada ao Processo	Origem	Crítérios de Aceitação
Proteína da Célula Hospedeira (HCP)	Substrato Celular	$\leq 4 \text{ ng por } 1.0\text{E}13 \text{ vg}$

Impureza Relacionada ao Processo	Origem	Crítérios de Aceitação
DNA da Célula Hospedeira	Substrato Celular	$\leq 1.15E5$ pg por $1.0E13$ vg
Albumina Sérica Bovina (BSA)	Cultura Celular	≤ 0.22 ng por $1.0E13$ vg
Plasmídeo de DNA (pDNA)	Cultura Celular	$\leq 6.8E5$ pg por $1.0E13$ vg
Polietilenoimina (PEI)	Cultura Celular	Não testado na Liberação
Benzonase	Processamento a Jusante	≤ 0.09 ng por $1.0E13$ vg
Tween 20	Processamento a Jusante	Não testado na Liberação
Poloxâmero 188	Processamento a Jusante	20-80 ppm
Césio (Cs)	Processamento a Jusante	≤ 30 µg/g (ppm)
Etanol	Processamento a Jusante	Não testado na Liberação

Tabela 33: Especificações de liberação para o Produto de Fármaco AVXS-101

Categoria	Atributo	Crítério de Aceitação
Geral	Aparência pela USP <631> e USP <855>	Solução clara a levemente opaca, incolor a fracamente branca sem particulados visíveis
	pH pela USP <791>	7,7-8,3
	Osmolaridade pela USP <785>	390-430 mOsm/kg
	Partículas subvisíveis pela USP <787>	≤ 600 partículas ≥ 25 µm por recipiente ≤ 6000 partículas ≥ 10 µm por recipiente
Quantidade	Título Genômico por ddPCR	$1,7E13 - 2,3E13$ vg/mL
	Título Infecioso por TaqMan TCID ₅₀	$3.9E8 - 8,4E10$ IU por $1,0E13$ vg
	Proteína Total por Micro BCA	100-300 µg por $1,0E13$ vg
	Conteúdo de Pluronic F-68 por HPLC-ELSD	20-80 ppm
Potência	Teste de Funcionalidade In vivo pelo Modelo em Camundongo Δ7SMA	Sobrevida Média que representa a dose de $7,5E13$ vg/kg dose é ≥ 24 dias
	Potência Relativa In vitro pelo Ensaio baseado em Célula	70-130%
Identidade	Identidade do Genoma do Vetor por ddPCR	Confirma

Categoria	Atributo	Critério de Aceitação
	Identidade (Proteína) por SDS-PAGE	Bandas Principais de VP1, VP2, VP3 migram junto com o Padrão de Referência AVXS-101
	Identidade (Proteína) por Western Blot	Positivo para a proteína do capsídeo AAV
Pureza	% de Distribuição de Capsídeo por SV-AUC	% Vazio ≤5%
		% Pico 1 + Pico 2 ≥91,9%
		% Cheio (Pico 1) 37,4 – 70,3%
		% Cheio (Pico 2) 24,9 – 60,1%
		% Total de Outros Picos ≤5%
	% Pureza Total por SDS-PAGE	% Pureza Total (VP1, VP2, VP3) ≥95,0%
	% Impurezas Totais por SDS-PAGE	% Impurezas Totais ≤5%
		Nenhuma impureza desconhecida relacionada > 2,0%
		Impurezas conhecidas relacionadas: Valor relatado (%) para 0,1% (até LOQ) - Imp 1A (~71-73 kDa) - Imp 1 (~61-67 kDa) - Imp 2 (~56-64 kDa) - Imp 3 (~48-58 kDa) - Imp 4 (~33-38 kDa) - Imp 5 (~30-34 kDa)
Segurança	Endotoxina pela USP <85>	≤0.75 EU/mL
	Esterilidade pela USP <71>	Sem crescimento
	Integridade do Fechamento do recipiente pela USP <1207>	Passa
	Dcaimento do Vácuo	

[00492] AVXS-201 e AVXS-301 podem ser produzidos e purificados utilizando o mesmo processo descrito para AVXS-101, por exemplo, como descrito nos Exemplos 1-4. Os critérios de especificação e liberação para lotes de cada produto produzido em biorreatores são mostrados nas Tabelas 34 - 36.

Tabela 34: Substancia de Fármaco AVXS-201 Lote 283-0218-005

Descrição do Teste	Resultado
Carga Biológica	< 1 CFU/mL
pH	7,8
Aspecto pela Inspeção Visual	Solução clara. incolor
Osmolaridade pelo Ponto de depressão do Congelamento	411 mOsm/kg
Título Genômico por ddPCR	$4,0 \times 10^{13}$ vg/mL
Identidade do Genoma do Vetor por ddPCR	Confirma
Identidade do Vetor por SDS-PAGE	Bandas Principais de VP1, VP2, VP3 migram junto com AVXS-201 de controle
Pureza por SDS-PAGE	98%
% Capsídeo Vazio por AUC	TBD
Impurezas Totais por SDS-PAGE	% Total de Impurezas: 2% % Impurezas com MW: 53,2 kDa, <1.0% 36,9 kDa, <1.0% 29,9 kDa, <1.0%
BSA Residual por ELISA	< LOQ (<0,50 ng/mL)
Plasmídeo de DNA Residual por by qPCR	$1,2 \times 10^6$ pg/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL
DNA Residual da Célula Hospedeira por qPCR	$1,3 \times 10^5$ pg/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL
Benzonase Residual por ELISA	< LOQ (< 0,20 ng/mL)
Proteína da Célula Hospedeira por ELISA	< LOQ (< 8 ng/mL)

Tabela 35: Substancia de Fármaco AVXS-201 Lote 283-0218-006

Descrição do Teste	Resultado
Esterilidade	Sem Crescimento
Endotoxina	0,02 EU/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL
Replicação de AAV Competente	TBD
pH	7,8
Aspecto pela Inspeção Visual	Solução clara, incolor sem partículas visíveis
Osmolaridade pela Depressão do Ponto de Congelamento	409 mOsm/kg
Partículas Subvisíveis pelo Obscurecimento da Luz	• 0 partículas maiores do que ou iguais a 25 μm por recipiente • 0 partículas maiores do que ou iguais a 10 μm por recipiente
Título Genômico por ddPCR	$3,6 \times 10^{13}$ vg/mL
Título Infeccioso por TCID ₅₀	$8,26 \times 10^{10}$ TCID ₅₀ /mL
Proteína Total por Micro BCA	182 μ g/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL
Pluronic por HPLC-ELSD	46 ppm
Identidade do Genoma do Vetor por ddPCR	Confirma
Identidade por Western Blot	Positivo para Proteína do Capsídeo de AAV MW Banda Principal VP1: 79,0 kDa VP2: 65,0 kDa VP3: 57,7 kDa
Identidade por SDS-PAGE	Bandas Principais de VP1, VP2, VP3 migram junto com AVXS-201 de controle

Descrição do Teste	Resultado
% Capsídeos Vazios por AUC	2%
% Pureza Total por SDS-PAGE	98%
% de Impurezas Totais SDS-PAGE	% de Impurezas Totais: 2% % de Impurezas Com MW: 52,5 kDa, <1,0% 36,4 kDa, <1,0% 29,1 kDa, <1,0%
Césio por ICP-MS	28 µg/g (ppm)

Tabela 36: Pureza de um lote de teste do Produto de Fármaco AVXS-301

Descrição do Teste	Resultado
Esterilidade	Sem Crescimento
Endotoxina	0.09 EU/mL
replicação de AAV Competente	Negativa
pH	8.0
Aspecto pela Inspeção Visual	Solução clara, incolor
Osmolaridade pela Depressão do Ponto de Congelamento	408 mOsm/kg
Partículas Subvisíveis pelo Obscurecimento da Luz	• 0 partículas maiores do que ou iguais a 25 µm por recipiente • 0 partículas maiores do que ou iguais a 10 µm por recipiente
Título Genômico por ddPCR	2.5×10^{13} vg/mL
Título Infeccioso por TCID ₅₀	5.62×10^{10} TCID ₅₀ /mL

Descrição do Teste	Resultado
Proteína Total por Micro BCA	418 µg/mL
Pluronic by HPLC-ELSD	53.2 ppm
Identidade do Genoma do Vetor por ddPCR	Confirma
Identidade (Proteína) por Western Blot	Positivo para Proteína do Capsídeo de AAV
Identidade (Proteína) por SDS-PAGE	Bandas Principais de VP1, VP2, VP3 migram junto com AVXS-301 de controle
% Capsídeos Vazios por AUC	3%
% Pureza Total por SDS-PAGE	98%
% de Impurezas Totais SDS-PAGE	Impurezas Totais: 2% Impurezas com MW: - Imp 1 (~61-67 kDa): 2%
Césio por ICP-MS	Abaixo de LOQ (< 20µg/g (ppm))

[00493] A elevada pureza obtida para AVXS-201 e AVXS-301 mostra que os métodos de produção e purificação de vetores virais de AAV, tal como descritos neste pedido, apresentam ampla aplicabilidade através dos vetores virais de AAV com diferentes cargas úteis.

[00494] Tendo descrito as modalidades com referência às figuras em anexo, deve ser entendido que a descrição não está limitada às modalidades precisas e que várias alterações e modificações podem ser efetuadas por aqueles versados na técnica sem se afastar do escopo e do espírito da descrição e das modalidades como definidas nas reivindicações em anexo.

Lista de Modalidades Exemplificadoras

- [00495] 1. Uma composição farmacêutica que compreende:
- [00496] (a) entre 1 a 8×10^{13} genomas/ml de parvovírus manipulados com um transgene;
- [00497] (b) menos do que cerca de 5,0% de capsídeos vazios;
- [00498] (c) menos do que cerca de 40 ng/ml de proteína de célula hospedeira por 1×10^{13} vg/mL;
- [00499] (d) menos do que cerca de $1,2 \times 10^6$ pg/mL de DNA residual de célula hospedeira por 1×10^{13} vg/mL;
- [00500] (e) pelo menos cerca de 80% dos $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas/mL são funcionais.
- [00501] 2. A composição da reivindicação 1, em que a quantidade de plasmídeo de DNA residual compreende menos do que $1,7 \times 10^6$ pg/mL 1×10^{13} vg/mL .
- [00502] 3. A composição da reivindicação 1, em que a quantidade de genomas do vetor/ml de parvovírus compreende $1,8$ a $2,2 \times 10^{13}$ genomas do vetor/mL.
- [00503] 4. Um método de purificação de partículas de AAV a partir de uma cultura de células hospedeiras de mamífero, para formar um produto de fármaco intermediário congelado compreendendo as etapas de:
- [00504] (a) cultivar as células que tenham sido transfectadas com um vírion recombinante de AAV,
- [00505] (b) coletar das partículas virais expandidas das células após um período de cultura,
- [00506] (c) purificar as partículas virais por filtração para remover quaisquer células intactas ou resíduos celulares,
- [00507] (d) submeter o eluente da etapa (c) a filtração de fluxo tangencial e
- [00508] (e) congelar a preparação intermediária resultante de partículas virais purificadas.

[00509] 5. O método da modalidade 4, em que uma endonuclease é usada durante a etapa de coleta.

[00510] 6. O método da modalidade 5, em que uma endonuclease é a benzonase.

[00511] 7. O método da modalidade 4, em que a etapa de purificação usa a filtração em profundidade seguida pela filtração através de um filtro que remova contaminantes de molécula grande e resíduos celulares.

[00512] 8. O método da modalidade 4, em que a etapa de filtração de fluxo tangencial usa membranas de celulose.

[00513] 9. Um método de purificação de uma amostra de partículas de AAV a partir de uma cultura de células hospedeiras de mamífero, para formar um produto de fármaco compreendendo as etapas de:

[00514] (a) uma etapa de acidificação e clarificação;

[00515] (b) uma etapa de cromatografia de troca de cátion;

[00516] (c) uma etapa de filtração de fluxo tangencial;

[00517] d. uma etapa de ultracentrifugação com CsCl para remover capsídeos vazios;

[00518] (e) uma etapa de filtração de fluxo tangencial.

[00519] 10. O método da modalidade 9, em que a etapa de acidificação e clarificação compreende ajustar a amostra para pH 3,5 e as proteínas e o DNA da célula hospedeira são removidos através de floculação com detergente.

[00520] 11. O método da modalidade 9, em que a coluna de troca de cátion compreende uma resina de sulfonila.

[00521] 12. O método da modalidade 9, em que a etapa de filtração de fluxo tangencial (c) usa membranas de celulose com um ponto de corte de peso molecular de 300 kDa MW e reduz o volume do eluato da etapa de troca de cátion em pelo menos seis vezes.

[00522] 13. O método da modalidade 9, em que a etapa de

ultracentrifugação com CsCl remove pelo menos 80% dos capsídeos vazios na amostra usa a filtração em profundidade seguida pela filtração através de um filtro de 0,45 µm.

[00523] 14. O método da modalidade 9, em que a etapa de filtração de fluxo tangencial (c) usa membranas de celulose com um ponto de corte de peso molecular de 300 kDa MW.

[00524] 15. Um método de tratamento de uma doença neurológica em um paciente necessitado compreendendo a liberação intravenosa ou intratecal de uma composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 1 a 3, em que o parvovírus compreende um genoma de AVV9 autocomplementar e em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN e em que a doença é SMA.

[00525] 16. Um método de tratamento de uma doença neurológica em um paciente necessitado compreendendo a liberação intratecal de uma composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 1 a 3 com um agente de contraste, em que o parvovírus compreende um genoma de AVV9 autocomplementar e em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN e em que a doença é SMA e em que o agente de contraste é omnipaque 180.

[00526] 17. O método de qualquer uma das modalidades 15-16, em que SMA é SMA tipo II, tipo III ou tipo IV.

[00527] 18. Um método de tratamento de SMA tipo II, III ou IV em um paciente necessitado compreendendo a liberação intratecal de uma composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 1 a 3 com um agente de contraste, em que o parvovírus compreende um genoma de AVV9 autocomplementar e em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN e em que a doença é SMA e em que o agente de contraste é omnipaque 180.

[00528] 19. Um método de tratamento de SMA tipo I em um paciente necessitado compreendendo a liberação intravenosa de uma

composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 1 a 3 com um agente de contraste, em que o parvovírus compreende um genoma de AVV9 autocomplementar e em que o transgene manipulado compreende um polinucleotídeo de SMN.

[00529] 20. O método da modalidade 19, em que o paciente tem 0 a 9 meses de idade.

[00530] 21. O método da modalidade 20, em que o paciente tem 0 a 6 meses de idade.

[00531] 22. O método da modalidade 19, em que o paciente pediátrico tem até cerca de 8 kg de peso.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender:

a. entre $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas de vetores virais AAV 9/mL (vg/mL);

b. menos do que cerca de 7% de capsídeos virais vazios;

c. menos do que cerca de 100 ng/ml de proteína de célula hospedeira por 1×10^{13} vg/mL;

d. menos do que cerca de 5×10^6 pg/mL de DNA residual de célula hospedeira por 1×10^{13} vg/mL; e

em que pelo menos cerca de 80% dos $1 - 8 \times 10^{13}$ genomas/mL do 9 são funcionais.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN).

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína 2 de ligação a metil-CpG (MECP2).

4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica um RNA curto em forma de grampo (shRNA) que atinge a superóxido dismutase 1 (SOD1).

5. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada.

6. Composição de acordo com a reivindicação 2 ou 5, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo codifica a proteína SMN da SEQ ID NO: 2.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende a SEQ ID NO: 1.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de compreender entre $1,7$ a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de AAV9.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de compreender $1,9$ a $2,1 \times 10^{13}$ vg/mL de AAV9.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 2×10^{13} vg/mL de AAV9.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 5% de capsídeos vazios.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de compreender menos do que cerca de 3% de capsídeos vazios.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de compreender menos do que cerca de 1% de capsídeos vazios.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de compreender ou consistir em 1 a 2×10^{14} vg do vetor viral de AAV9.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de compreender ou consistir em $1,1 \times 10^{14}$ vg do vetor viral de AAV9.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de consistir em $1,7 \times 10^{14}$ vg do vetor viral de AAV9.

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que o percentual de genomas funcionais do vetor viral é medido utilizando um ensaio celular *in vitro* ou um modelo animal *in vivo*.

18. Formulação farmacêutica aquosa caracterizada pelo fato de compreender: um vetor viral AA9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN), um tampão Tris, cloreto de magnésio, cloreto de sódio e um poloxâmico (por exemplo, poloxâmico 188), em que a composição farmacêutica não compreende um conservante.

19. Formulação de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende ainda uma ITR modificada de AAV2, um promotor de beta actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16S tardio de SV40 modificado, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada.

20. Formulação de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo codificada a proteína SMN de SEQ ID NO: 2.

21. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende a SEQ ID NO: 1.

22. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão Tris é de cerca de 10 a 30 mM, por exemplo, cerca de 20 mM.

23. Formulação de acordo com qualquer uma das

reivindicações 18 a 22, caracterizada pelo fato de que o pH da formulação é de cerca de 7,7 a cerca de 8,3, por exemplo, cerca de pH 8,0 (por exemplo, medido por USP <791>).

24. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, caracterizada pelo fato de que a concentração de cloreto de magnésio é de cerca de 0,5-1,5 mM, por exemplo, cerca de 1 mM.

25. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, caracterizada pelo fato de que a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 100-300 mM, por exemplo, cerca de 200 mM.

26. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 0,005% p/v de poloxâmero 188.

27. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 26, caracterizada pelo fato de que a formulação tem uma osmolaridade de 390-430 mOsm/kg (por exemplo, medida por USP <785>).

28. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 27, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 está na composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

29. Método de tratamento da atrofia muscular espinal tipo I (SMA) em um paciente necessitado, caracterizado pelo fato de compreender administrar a formulação como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 28 ou a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 2 ou 5 a 17, ao paciente por via intratecal ou intravenosa, em que o paciente:

- a. tem nove meses de idade ou menos;
- b. tem um peso corporal de pelo menos cerca de 2,6 kg;

- c. tem mutações ou deleções nulas bi-alélicas de *SMN1*; e
- d. tem pelo menos uma cópia funcional de *SMN2*.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada.

31. Método de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica a proteína SMN da SEQ ID NO: 2.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV 9 compreende a SEQ ID NO: 1.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizado pelo fato de compreender administrar o vetor viral em uma dose de cerca de 1 a $2,5 \times 10^{14}$ vg/kg.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33, caracterizado pelo fato de compreender administrar o vetor viral em uma dose de cerca de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg.

35. Método de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que a quantidade de genoma do vetor viral é medida utilizando ddPCR.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 35, caracterizado pelo fato de que o paciente tem um peso corporal não superior a 8,5 kg.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 36, caracterizado pelo fato de que o paciente não tem uma substituição c.859G>C no éxon 7 de pelo menos uma cópia do gene *SMN2*.

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 37, caracterizado pelo fato de que o tratamento é administrado ao paciente antes dos 6 meses de idade.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 38, caracterizado pelo fato de que o tratamento é administrado ao paciente antes do início de um ou mais sintomas de SMA, selecionados entre hipotonia, atraso nas habilidades motoras, controle insuficiente da cabeça, postura de ombro projetado e hipermobilidade das articulações.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 39, caracterizado pelo fato de que o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 iguais ou inferiores a 1:100, como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes da administração.

41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 40, caracterizado pelo fato de que o paciente tem títulos de anticorpos anti-AAV9 iguais ou inferiores a 1:50, como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA, antes da administração.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 41, caracterizado pelo fato de que o paciente possui títulos de anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA após a administração e é monitorizado durante cerca de 1-8 semanas ou até que os títulos diminuam abaixo de 1:100.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 42, caracterizado pelo fato de que o paciente possui títulos de anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA após a administração e é monitorizado durante cerca de 1-8 semanas ou até que os títulos diminuam abaixo de 1:50.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 39, caracterizado pelo fato de que o paciente tem títulos anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes ou depois da administração e é trocado para alimentação

com fórmula, por exemplo, antes ou depois da administração.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 39, caracterizado pelo fato de que o paciente tem títulos anti-AAV9 acima de 1:50 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA antes ou depois da administração e é trocado para alimentação com fórmula, por exemplo, antes ou depois da administração.

46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 45, caracterizado pelo fato de que o paciente tem títulos anti-AAV9 acima de 1:100 como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA depois da administração e é tratado usando plasmaferese.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 46, caracterizado pelo fato de que o paciente possui títulos anti-AAV9 acima de 1:50, como determinado por um imunoensaio de ligação ELISA depois da administração e é tratado usando plasmaferese.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 47, caracterizado pelo fato de que o paciente tem contagens de plaquetas acima de cerca de 67.000 células/ml depois da administração ou abaixo de cerca de 100.000 células/ml ou abaixo de cerca de 150.000 células/ml.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 48, caracterizado pelo fato de que o paciente tem contagens de plaquetas abaixo de cerca de 67.000 células/ml depois da administração ou abaixo de cerca de 100.000 células/ml ou abaixo de cerca de 150.000 células/ml e é monitorado por cerca de 1 a 8 semanas ou até que as contagens de plaquetas aumentem para cerca de 67.000 células/ml ou acima de 100.000 células/ml ou acima de cerca de 150.000 células/ml.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 49, caracterizado pelo fato de que o paciente tem contagens de plaquetas abaixo de cerca de 67.000 células/ml depois da administração

e é tratado com uma transfusão de plaquetas.

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 50, caracterizado pelo fato de que o paciente não tem trombocitopenia antes da administração.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 51, caracterizado pelo fato de que o paciente tem trombocitopenia depois da administração e é monitorado por cerca de 1 a 8 semanas ou até que o paciente não tenha trombocitopenia.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 52, caracterizado pelo fato de que o paciente tem trombocitopenia depois da administração e é tratado com uma transfusão de plaquetas.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 53, caracterizado pelo fato de que o paciente tem níveis de troponina-I abaixo de cerca de 0,176 ug/ml antes da administração do vetor viral.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 54, caracterizado pelo fato de que os níveis de troponina-I no paciente é monitorado depois da administração do vetor viral.

56. Método de acordo com a reivindicação 54 ou reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que a monitorização cardíaca é realizada após a administração até que os níveis de troponina-I no paciente sejam menores do que cerca de 0,176 ug/ml.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 56, caracterizado pelo fato de que o paciente tem função hepática normal antes da administração.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o paciente tem níveis de transaminase hepática inferiores a cerca de 8 a 40 U/L antes da administração.

59. Método de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que a transaminase hepática é selecionada entre alanina

transaminase (AST), aspartato transaminase (ALT) e uma combinação dessas.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 59, caracterizado pelo fato de que o paciente tem níveis de bilirrubina menores do que 3,0 mg/dL, níveis de creatinina menores do que 1,8 mg/dL, níveis de Hgb entre 8 a 18 g/dL e/ou contagens de células brancas sanguíneas menores do que cerca de 20000 por mm³ antes da administração.

61. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 60, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é administrado em salina tamponada com Tris.

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 61, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é administrado em cerca de 5 a 20 mL/kg, cerca de 10 a 20 mL/kg, ou cerca de 5,5 a 6,5 mL/kg de salina tamponada com Tris.

63. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 62, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é infundido durante cerca de 45 a 75 minutos.

64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 63, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é infundido durante cerca de 60 minutos.

65. Método de acordo com a reivindicação 63 ou reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que a infusão compreende uma bomba de infusão.

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 65, caracterizado pelo fato de que o paciente é tratado com um esteroide oral pelo menos 24 horas antes da administração do vetor viral.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 66, caracterizado pelo fato de que o paciente é tratado com um

esteroide oral pelo menos 30 dias antes da administração do vetor viral.

68. Método de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o esteroide oral é administrado uma vez por dia.

69. Método de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o esteroide oral é administrado duas vezes por dia.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 69, caracterizado pelo fato de que o paciente é monitorizado quanto aos níveis elevados de ALT e/ou AST depois da administração do vetor viral e em que o esteroide oral continua a ser administrado depois de 30 dias até que os níveis de AST e/ou ALT estejam abaixo do dobro do limite superior do normal ou abaixo de cerca de 120 UI/L.

71. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 70, caracterizado pelo fato de que o paciente é tratado com um esteroide oral até que os níveis de AST e/ou ALT estejam abaixo do dobro do limite superior do normal ou abaixo de cerca de 120 IU/L.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 70, caracterizado pelo fato de que o esteroide oral é administrado em uma dose de cerca de 1 mg/kg.

73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 71, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente reduzir gradativamente a administração do esteroide oral depois que AST e ALT estejam abaixo do dobro do limite superior do normal ou abaixo de cerca de 120 IU/L.

74. Método de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a redução compreende incrementos escalonados de 0,5 mg/kg/dia durante 2 semanas seguidos por 0,25 mg/kg/dia durante mais 2 semanas.

75. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 73, caracterizado pelo fato de compreender administrar o esteroide oral durante 30 dias em uma dose de cerca de 1 mg / kg e, em seguida,

reduzir para 0,5 mg/ kg/ dia durante 2 semanas seguidas por 0,25 mg/kg/dia por mais 2 semanas.

76. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 75, caracterizado pelo fato de que o esteroide oral é a prednisolona ou um equivalente.

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 76, caracterizado pelo fato de compreender administrar um intensificador muscular ou neuroprotetor ao paciente.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 77, caracterizado pelo fato de compreender um oligonucleotídeo antissenso direcionado para *SMN* do paciente.

79. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 78, caracterizado pelo fato de compreender administrar nusinersen ao paciente.

80. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 79, caracterizado pelo fato de compreender administrar stamulumab ao paciente.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 80, caracterizado pelo fato de que a eficácia é determinada utilizando a escala CHOP-INTEND.

82. Método de tratamento de um paciente pediátrico com atrofia muscular espinhal (SMA) Tipo 1 com ou sem início da doença, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao paciente uma composição ou formulação que compreenda um vetor de vírus adenoassociado (AAV) de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 5 a 28.

83. Método de tratamento da Síndrome de Rett em um paciente necessitado, caracterizado pelo fato de compreender administrar a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 8 a 17, ao paciente por uma via intratecal ou

intravenosa.

84. Método de tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ALS) em um paciente necessitado, caracterizado pelo fato de compreender administrar a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 8 a 17, ao paciente por uma via intratecal ou intravenosa.

85. Método de tratamento de um paciente que sofre de SMA tipo I, caracterizado pelo fato de compreender:

- a. determinar o peso do paciente;
- b. obter um kit que contenha frascos de uma composição farmacêutica de um vetor viral de AAV9, em que o kit compreenda o seguinte número de frascos:

Peso do paciente (kg)	frasco 5,5 ± 0,4 mL	frasco 8,3 ± 0,4 mL	Total Frascos Por Kit
2,6 – 3,0	0	2	2
3,1 – 3,5	2	1	3
3,6 – 4,0	1	2	3
4,1 – 4,5	0	3	3
4,6 – 5,0	2	2	4
5,1 – 5,5	1	3	4
5,6 – 6,0	0	4	4
6,1 – 6,5	2	3	5
6,6 – 7,0	1	4	5
7,1 – 7,5	0	5	5
7,6 – 8,0	2	4	6
8,1 – 8,5	1	5	6

c. em que a concentração de vetor viral em cada frasco é de cerca de $2,0 \times 10^{13}$ vg/mL;

d. em que o vetor viral de AAV9 compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN; e

e. administrar o vetor viral de AAV9 a partir dos frascos para o paciente.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado

pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende uma ITR de AAV2 modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada.

87. Método de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica a proteína SMN de SEQ ID NO: 2.

88. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 87, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende a SEQ ID NO: 1.

89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 88, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV é administrado por infusão de uma dose de cerca de $1, a \times 10^{14}$ a $2,5 \times 10^{14}$ vg/kg.

90. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 89, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV é administrado por infusão de uma dose de cerca de $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg.

91. Método de acordo com a reivindicação 89 ou reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que o vetor é infundido durante cerca de 45 a 70 minutos.

92. Método de acordo com a reivindicação 89 a 91, caracterizado pelo fato de que o vetor é infundido durante cerca de 60 minutos.

93. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 89 a 92, caracterizado pelo fato de que a infusão compreende uma bomba de infusão.

94. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 93, caracterizado pelo fato de que a quantidade de genoma do vetor viral é medida usando ddPCR.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que o título da dose do vetor viral de AAV9 é medido por ddPCR.

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 95, caracterizado pelo fato de compreender administrar um volume de dose de:

Peso Médio do Paciente (kg)	Volume de Dose (mL)
2,6 – 3,0	16,5
3,1 – 3,5	19,3
3,6 – 4,0	22,0
4,1 – 4,5	24,8
4,6 – 5,0	27,5
5,1 – 5,5	30,3
5,6 – 6,0	33,0
6,1 – 6,5	35,8
6,6 – 7,0	38,5
7,1 – 7,5	41,3
7,6 – 8,0	44,0
8,1 – 8,5	46,8

97. Kit para o tratamento de um paciente que sofre de atrofia muscular espinhal tipo I (SMA), caracterizado pelo fato de compreender frascos contendo a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 2 ou 5 a 17 ou a formulação como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 28.

98. Kit caracterizado pelo fato de compreender frascos que contêm cerca de 5,5 mL ou cerca de 8,3 mL de um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN) e formulados em uma concentração de cerca de $2,0 \times 10^3$ vg/mL em Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 200 mM, 0,005% p/v de Poloxâmero 188 em pH 7,7 a 8,3, por exemplo, cerca de 8,0.

99. Kit de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende uma ITR de AAV2

modificada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2.

100. Kit de acordo com a reivindicação 98 ou reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica a proteína SMN da SEQ ID NO: 2.

101. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 100, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV9 compreende a SEQ ID NO: 1.

102. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 101, caracterizado pelo fato de que a quantidade de genoma de vetor viral é medida usando ddPCR.

103. Método de tratamento de SMA tipo I, caracterizado pelo fato de compreender administrar um volume da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 2 ou 5 a 17 ou a formulação como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 28, por infusão intravenosa a um paciente necessitado.

104. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 16,5 mL se o paciente tiver um peso corporal de 2,6 a 3,0 kg.

105. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o volume será de 19,3 mL se o paciente tiver um peso corporal de 3,1 a 3,5 kg.

106. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o volume será de 22,0 mL se o paciente tiver um peso corporal de 3,6 a 4,0 kg.

107. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 24,8 mL se o paciente tiver um peso corporal de 4,1 a 4,5 kg.

108. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 27,5 mL se o paciente tiver um peso corporal de 4,6 a 5,0 kg.

109. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 30,3 mL se o paciente tiver um peso corporal de 5,1 a 5,5 kg.

110. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 33,0 mL se o paciente tiver um peso corporal de 5,6 a 6,0 kg.

111. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 35,8 mL se o paciente tiver um peso corporal de 6,1 a 6,5 kg.

112. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 38,5 mL se o paciente tiver um peso corporal de 6,6 a 7,0 kg.

113. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 41,3 mL se o paciente tiver um peso corporal de 7,1 a 7,5 kg.

114. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 44,0 mL se o paciente tiver um peso corporal de 7,6 a 8,0 kg.

115. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o volume será de 46,8 mL se o paciente tiver um peso corporal de 8,1 a 8,5 kg.

116. Método de fabricação de um vetor viral de AAV caracterizado pelo fato de compreender:

- a. cultivar células aderentes;
- b. transfectar as células aderentes com plasmídeos para possibilitar a produção do vetor viral de AAV;
- c. lisar as células aderentes para isolar o vetor viral de AAV;

- d. acidificar e clarificar o lisado celular de (c);
- e. purificar o produto de (d) usando a cromatografia de troca de cátion (CEX);
- f. filtrar o produto de (e) utilizando filtração de fluxo tangencial (TFF);
- g. ultracentrifugação do produto de (f) em um tampão de cloreto de cério (CsCl); e
- h. coletar os vetores virais de AAV do produto de (g).

117. Método de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que o AAV é AAV9.

118. Método de acordo com a reivindicação 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que o AAV é autocomplementar (scAAV).

119. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 118, caracterizado pelo fato de que as células aderentes são células HEK293.

120. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 119, caracterizado pelo fato de que as células aderentes são selecionadas quanto a aderência antes da cultura.

121. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 120, caracterizado pelo fato de que a seleção compreende sub-cultivar as células aderentes múltiplas vezes para selecionar quanto a aderência.

122. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 121, caracterizado pelo fato de que as células aderentes são semeadas em um biorreator para cultura.

123. Método de acordo com a reivindicação 122, caracterizado pelo fato de que o biorreator é um biorreator de grande escala que pode proporcionar circulação contínua de meios de cultura de células.

124. Método de acordo com a reivindicação 122 ou 123,

caracterizado pelo fato de que o biorreator é um biorreator de 200 m² ou 333 m².

125. Método de acordo com a reivindicação 122 ou 123, caracterizado pelo fato de que o biorreator é um biorreator de 500 m².

126. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 125, caracterizado pelo fato de que as células aderentes são adicionadas aos meios em uma bolsa de recirculação de meios e circuladas através do biorreator, por exemplo, usando uma bomba peristáltica.

127. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizada pelo fato de que o bombeamento peristáltico é contínuo enquanto as células aderentes são semeadas em um biorreator para cultura.

128. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 127, caracterizado pelo fato de que a densidade da semente é de cerca de 8.000 a 12.000 células/cm².

129. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 128, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende adicionar um meio de transfecção à bolsa de recirculação de meios e circular o meio de transfecção através do biorreator, por exemplo, usando uma bomba peristáltica.

130. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 129, caracterizado pelo fato de que a circulação, por exemplo, o bombeamento peristáltico, ocorre entre 15 a 25°C.

131. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 130, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende o contato da célula aderente com um plasmídeo auxiliar de adenovírus (pHELP).

132. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 131, caracterizado pelo fato de que a etapa de

transfecção compreende contatar a célula aderente com um plasmídeo que codifica um gene rep de AAV.

133. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 132, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende colocar em contato a célula aderente com um plasmídeo que codifica um gene cap de AAV.

134. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 133, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende o contato da célula aderente com um plasmídeo que codifica um gene rep de AAV e um gene cap de AAV no mesmo plasmídeo (pAAV).

135. Método de acordo com a reivindicação 132 ou reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que o gene rep de AAV é rep2.

136. Método de acordo com a reivindicação 133 ou 134, caracterizado pelo fato de que o gene cap de AAV é cap9.

137. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116-135, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende o contato da célula aderente com o agente de transfecção é polietilenoimina (PEI).

138. Método de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a proporção de PEI para pelo menos um dos plasmídeos é menor do que 1:1 em peso.

139. Método de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a proporção de PEI para pelo menos um dos plasmídeos é de cerca de 1:1 em peso.

140. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 139, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende o contato da célula aderente com um meio de transfecção que não contém soro.

141. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 140, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende o contato da célula aderente com um meio de transfecção que não contém cálcio.

142. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 141, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção compreende o contato da célula aderente com um meio de transfecção que não contém glutamina.

143. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 142, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção é realizada durante 10 a 60 minutos.

144. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 143, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção é realizada durante 10 a 30 minutos.

145. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 144, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção é realizada durante menos de 30 minutos.

146. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 145, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção é realizada durante 20 a 30 minutos.

147. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 146, caracterizado pelo fato de que a etapa de transfecção é realizada durante 15 a 30 minutos.

148. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 147, caracterizado pelo fato de que a etapa de lise compreende a lise celular total.

149. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 148, caracterizado pelo fato de que a etapa de lise compreende o uso de um tampão de lise suplementado com uma endonuclease.

150. Método de acordo com a reivindicação 149, caracterizado pelo fato de que a endonuclease é a benzonase.

151. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 150, caracterizado pelo fato de que a etapa de lise compreende o uso de um tampão de lise suplementado com TWEEN.

152. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 151, caracterizado pelo fato de que a etapa de lise é realizada entre 15 a 25°C.

153. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 152, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente congelar o lisado celular da etapa (c) antes da etapa de acidificação de (d).

154. Método de purificação de um vetor viral de AAV a partir de um lisado de cultura de células, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- a. acidificar e clarificar o lisado celular;
- b. purificar o produto de (a) usando cromatografia de troca de cátion (CEX);
- c. filtrar o produto de (b) através de uma filtração de fluxo tangencial;
- d. ultracentrifugação do produto de (c) usando um tampão cloreto de cério 2 a 4 M (CsCl);
- e. coletar os vetores virais de AAV do produto de (d);
- f. filtrar o produto de (e) através de uma filtração de fluxo tangencial.

155. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 154, caracterizado pelo fato de que a etapa de acidificação compreende a acidificação do lisado celular para um pH de cerca de 3,0 a 4,0.

156. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 116 a 155, caracterizado pelo fato de que a etapa de acidificação compreende a acidificação do lisado celular para um pH de cerca de 3,3 a 3,7.

157. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 156, caracterizado pelo fato de que a etapa de acidificação compreende a acidificação do lisado celular para um pH de cerca de 3,4 a 3,6.

158. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 157, caracterizado pelo fato de que a etapa de acidificação compreende a acidificação do lisado celular para um pH de cerca de 3,5.

159. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 158, caracterizado pelo fato de que a ultracentrifugação é realizada entre 40.000 a 50.000 rpm.

160. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 159, caracterizado pelo fato de que a ultracentrifugação é realizada entre 43.000 a 46.000 rpm.

161. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 160, caracterizado pelo fato de que a ultracentrifugação é realizada entre 15 a 25°C.

162. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 161, caracterizado pelo fato de que a ultracentrifugação é realizada por 16 a 24 horas.

163. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 162, caracterizado pelo fato de que a ultracentrifugação é realizada por 20 a 24 horas.

164. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 168, caracterizado pelo fato de que CaCl está em uma concentração de cerca de 3M.

165. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 116 a 164, caracterizado pelo fato de que o lisado celular é incubado com Tween antes da etapa de acidificação.

166. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 165, caracterizado pelo fato de que o lisado celular é incubado com Tween por cerca de 8 a 20 horas antes da etapa de acidificação.

167. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 166, caracterizado pelo fato de que a etapa de clarificação compreende filtrar o lisado celular através de um filtro de profundidade.

168. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 167, caracterizado pelo fato de que a etapa de clarificação compreende filtrar o lisado celular através de um filtro de 0,45 micra.

169. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 168, caracterizado pelo fato de que a CEX compreende uma resina de sulfonila.

170. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 169, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma etapa de TFF compreende utilizar membranas de celulose com um ponto de corte de peso molecular de 300 kDa MW e reduz o volume do eluído da etapa de troca de cátion em pelo menos seis vezes.

171. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 170, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma etapa de TFF compreende utilizar membranas de celulose com um ponto de corte de peso molecular de cerca de 300 kDa MW.

172. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 171, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl compreende cerca de 3 M CsCl.

173. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 116 a 172, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl compreende Tris, MgCl_2 e Poloxâmero 188.

174. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 173, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl compreende cerca de 20 mM Tris.

175. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 174, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl compreende cerca de 2mM MgCl_2 .

176. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 175, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl compreende Poloxâmero 188, opcionalmente cerca de 0,2% p/v de Poloxâmero 188.

177. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 176, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl está entre cerca de pH 7,5 - 8,5.

178. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 177, caracterizado pelo fato de que o tampão de CsCl está entre cerca de pH 7,9 - 8,2.

179. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116-178, caracterizado pelo fato de que o número de capsídeos virais vazios é menor do que 7% do total de capsídeos virais depois da coleta dos vetores virais de AAV do lisado celular ultracentrifugado.

180. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 179, caracterizado pelo fato de que o número de capsídeos virais vazios é menor do que 5% do total de capsídeos virais depois da coleta dos vetores virais de AAV do lisado celular ultracentrifugado.

181. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 200, caracterizado pelo fato de que o número de

capsídeos virais vazios é menor do que 3% do total de capsídeos virais depois da coleta dos vetores virais de AAV do lisado celular ultracentrifugado.

182. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 201, caracterizado pelo fato de que o número de capsídeos virais vazios é menor do que 1% do total de capsídeos virais depois da coleta dos vetores virais de AAV do lisado celular ultracentrifugado.

183. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 201, caracterizado pelo fato de que o número de capsídeos virais vazios é medido por AUC.

184. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 183, caracterizado pelo fato de que os vetores virais de AAV são coletados a partir do lisado celular ultracentrifugado utilizando uma seringa.

185. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 184, caracterizado pelo fato de que os vetores virais de AAV coletados depois da segunda etapa de TFF são armazenados em uma solução que compreende Tris, $MgCl_2$, NaCl e Poloxâmero 188.

186. Método de acordo com a reivindicação 185, caracterizado pelo fato de que a solução compreende cerca de 20 mM de Tris.

187. Método de acordo com a reivindicação 185 ou reivindicação 186, caracterizado pelo fato de que a solução compreende cerca de 1 mM de $MgCl_2$.

188. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 187, caracterizado pelo fato de que a solução compreende cerca de 200 mM de NaCl.

189. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 185 a 188, caracterizado pelo fato de que a solução compreende cerca de 0,005% p/v de Poloxâmero 188.

190. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 189, caracterizado pelo fato de que a solução está entre cerca de pH 7,5 a 8,5.

191. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 190, caracterizado pelo fato de que a solução está entre cerca de pH 7,7 a 8,3.

192. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 191, caracterizado pelo fato de que os vetores virais de AAV coletados depois da segunda TFF contém menos do que cerca de 30 µg/g ou menos do que cerca de 20 µg/g de CsCl.

193. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 192, caracterizado pelo fato de que a concentração de vetores virais de AAV coletados depois da segunda TFF é superior ou igual a cerca de 3×10^{13} vg/ml.

194. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 193, caracterizado pelo fato de que as proteínas da célula hospedeira e/ou o DNA da célula hospedeira são removidos do lisado celular usando a floculação com um detergente.

195. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 194, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN).

196. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 195, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV compreende uma ITR de AAV2 mutada, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio de SV40 modificado, um sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH) e

uma ITR de AAV 2.

197. Método de acordo com a reivindicação 195 ou reivindicação 196, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica a proteína SMN da SEQ ID NO: 2.

198. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 196, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV compreende a SEQ ID NO: 1.

199. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 198, caracterizado pelo fato de que o plasmídeo que codifica a proteína SMN, o plasmídeo que codifica o pAAV e o plasmídeo que codifica o pHELP são transfectados em uma proporção de 1:1:1.

200. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 194, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2.

201. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 194, caracterizado pelo fato de que o vetor viral de AAV compreende um polinucleotídeo que codifica um shRNA que atinge SOD1.

202. Método de tratamento de um paciente com SMA Tipo 1 caracterizado pelo fato de ser pela administração de um vetor viral de AA9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN como preparada de acordo com o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 199.

203. Método de tratamento de um paciente que tem a Síndrome de Rett, caracterizado pelo fato de ser pela administração de um vetor viral de AA9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2 como preparada de acordo com o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 194 ou 201.

204. Método de tratamento de um paciente que tem ALS, caracterizado pelo fato de ser pela administração de um vetor viral de AA9 que compreende um polinucleotídeo que codifica um shRNA que atinge SOD1 como preparada de acordo com o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 194 ou 201.

205. Vetor viral de AAV9 caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN, fabricado de acordo com o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 199.

206. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN, fabricada de acordo com o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 199.

207. Composição farmacêutica aquosa caracterizada pelo fato de compreender um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína SMN, um tampão Tris, uma solução de cloreto de magnésio e uma solução de cloreto de sódio, em que a composição farmacêutica não compreende um conservante e em que a composição é fabricada de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 116 a 199.

208. Vetor viral de AAV9, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2, fabricada de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 116 a 194 ou 200.

209. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína MECP2, fabricada de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 116 a 194 ou 200

210. Vetor viral de AAV9, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que codifica um shRNA que atinge SOD1, fabricado de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 116 a 194 ou 201.

211. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um vetor viral de AAV9 que compreende um polinucleotídeo que codifica um shRNA tendo como alvo SOD1, fabricado de acordo como método como definido em qualquer uma das reivindicações 116-194 ou 201.

212. Método de tratamento de SMA Tipo I em um paciente necessitado, caracterizado pelo fato de ser pela administração intravenosa de uma composição farmacêutica que compreende:

a. um vetor viral de AAV9 autocomplementar que compreende uma ITR modificada de AAV2, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada;

b. Tris 20 mM a pH 8,0;

c. $MgCl_2$ 1 mM;

d. NaCl 200 mM; e

e. Poloxâmero 188 0.005%;

em que o paciente tem um peso corporal de 2,6 kg a 8,5 kg.

213. Método de acordo coma reivindicação 212, caracterizado pelo fato de que a composição não compreende um conservante.

214. Método de acordo com a reivindicação 212 ou 213, caracterizado pelo fato de que o paciente:

a. tem nove meses ou menos;

b. tem um peso corporal de pelo menos cerca de 2,6 kg;

- c. tem mutações ou deleções nulas de *SMN1* bi-alélicas; e
- d. tem pelo menos uma cópia funcional do *SMN2*.

215. Composição adequada ou fabricada para a administração intravenosa, a composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender:

- a. um vetor viral de AAV9 autocomplementar que compreende uma ITR modificada de AAV2, um promotor de beta-actina de galinha (CB), um intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV), um íntron 16s tardio modificado de SV40, um sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma ITR de AAV2 não modificada;

- b. Tris 20 mM a pH 8,0;
- c. MgCl_2 1 mM;
- d. NaCl 200 mM; e
- e. Poloxâmero 188 0.005%.

216. Composição de acordo coma reivindicação 215, caracterizada pelo fato de que a composição não compreende um conservante.

217. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 201, caracterizada pelo fato de que o método é realizado em escala industrial.

218. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 201 ou 217, caracterizado pelo fato de que o rendimento produzido de AAV é maior do que 5×10^{15} vg ou maior do que 8×10^{15} vg ou maior do que 1×10^{16} vg por lote fabricado.

219. Composição ou formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, 18 a 28, 82 a 84 ou 205 a 211, caracterizada pelo fato de que a composição ou formulação compreende pelo menos um dos seguintes:

- a. menos de cerca de 0,09 ng de benzonase por $1,0 \times 10^{13}$

vg,

- b. menos do que cerca de 30 µg/g (ppm) de césio,
- c. cerca de 20-80 ppm de Poloxâmero 188,
- d. menos do que cerca de 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- e. menos do que cerca de $6,8 \times 10^5$ pg de DNA plasmídico residual por $11,0 \times 10^{13}$ vg,
- f. menos que cerca de $1,1 \times 10^5$ pg de hcDNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- g. menos que cerca de 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- h. cerca de pH 7,7 a 8,3,
- i. cerca de 390-430 mOsm/kg,
- j. menos do que cerca de 600 partículas que têm ≥ 25 µm de tamanho por recipiente,
- k. menos de cerca de 6000 partículas que têm ≥ 10 µm de tamanho por recipiente,
- l. cerca de $1,7 \times 10^{13}$ a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genômico,
- m. título infeccioso de cerca de $3,9 \times 10^8$ a $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- n. proteína total de cerca de 100-300 µg por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- o. potência relativa de cerca de 70-130%, e
- p. menos de cerca de 5% de capsídeos vazios.

220. Composição ou formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, 18 a 28, 82 a 84 ou 205 a 211, caracterizada pelo fato de que a composição ou formulação compreende pelo menos um dos seguintes:

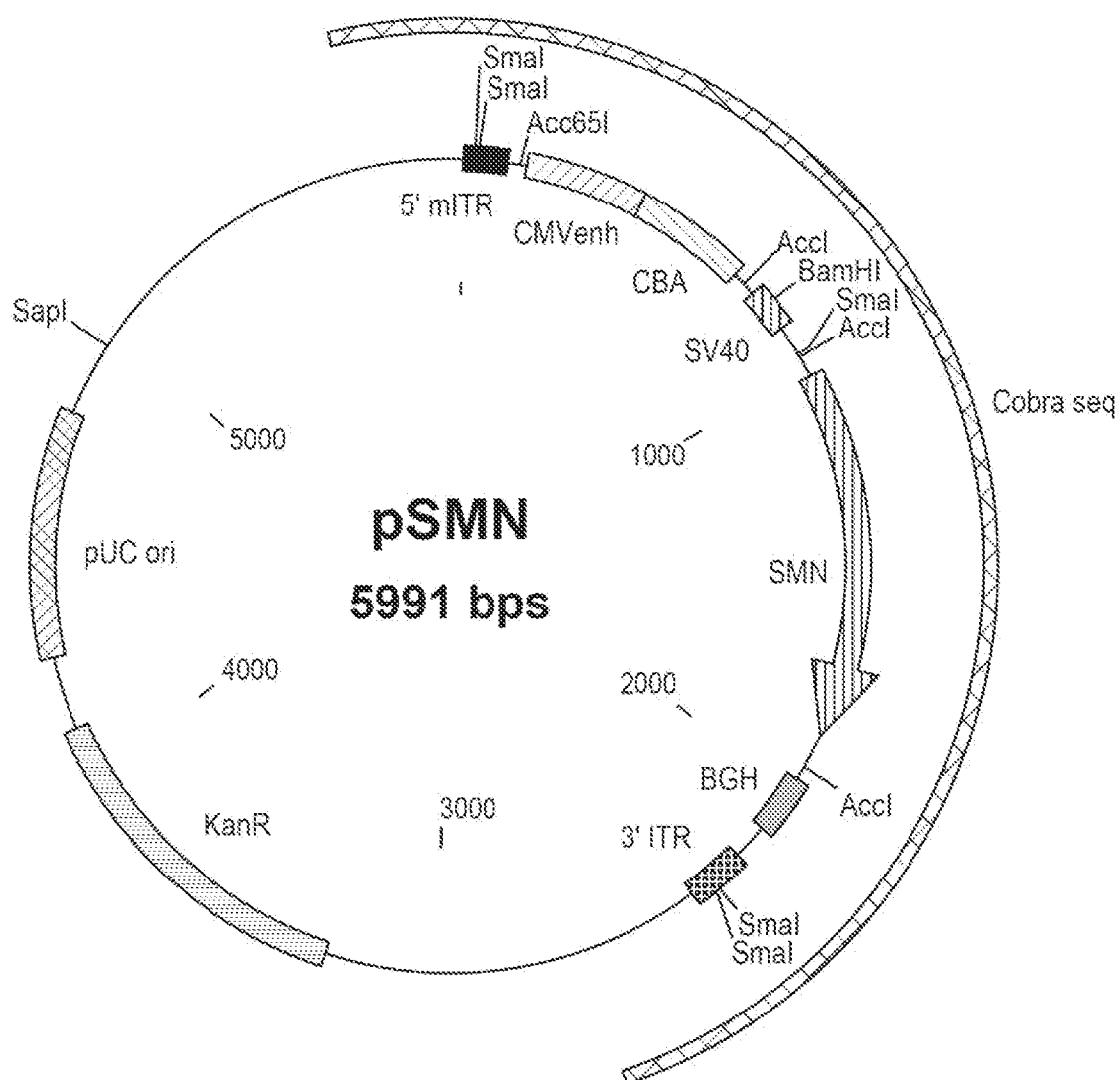
- a. cerca de pH 7,7 a 8,3,
- b. cerca de 390-430 mOsm/kg,
- c. menos do que cerca de 600 partículas que têm ≥ 25 µm de tamanho por recipiente,
- d. menos de cerca de 6000 partículas que têm ≥ 10 µm de

tamanho por recipiente,

- e. cerca de $1,7 \times 10^{13}$ a $2,3 \times 10^{13}$ vg/mL de título genômico,
- f. título infeccioso de cerca de $3,9 \times 10^8$ a $8,4 \times 10^{10}$ IU por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- g. proteína total de cerca de 100-300 µg por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- h. conteúdo de Pluronic F-68 de cerca de 20-80 ppm,
- i. potência relativa de cerca de 70-130%,
- j. sobrevida média em um modelo delta7SMN de camundongo maior ou igual a 24 dias com uma dose de $7,5 \times 10^{13}$ vg/kg,
- k. menos de cerca de 5% de capsídeos vazios,
- l. e uma pureza total maior ou igual a cerca de 95% e
- m. menos do que ou igual a cerca de 0,75 EU/mL Endotoxina.

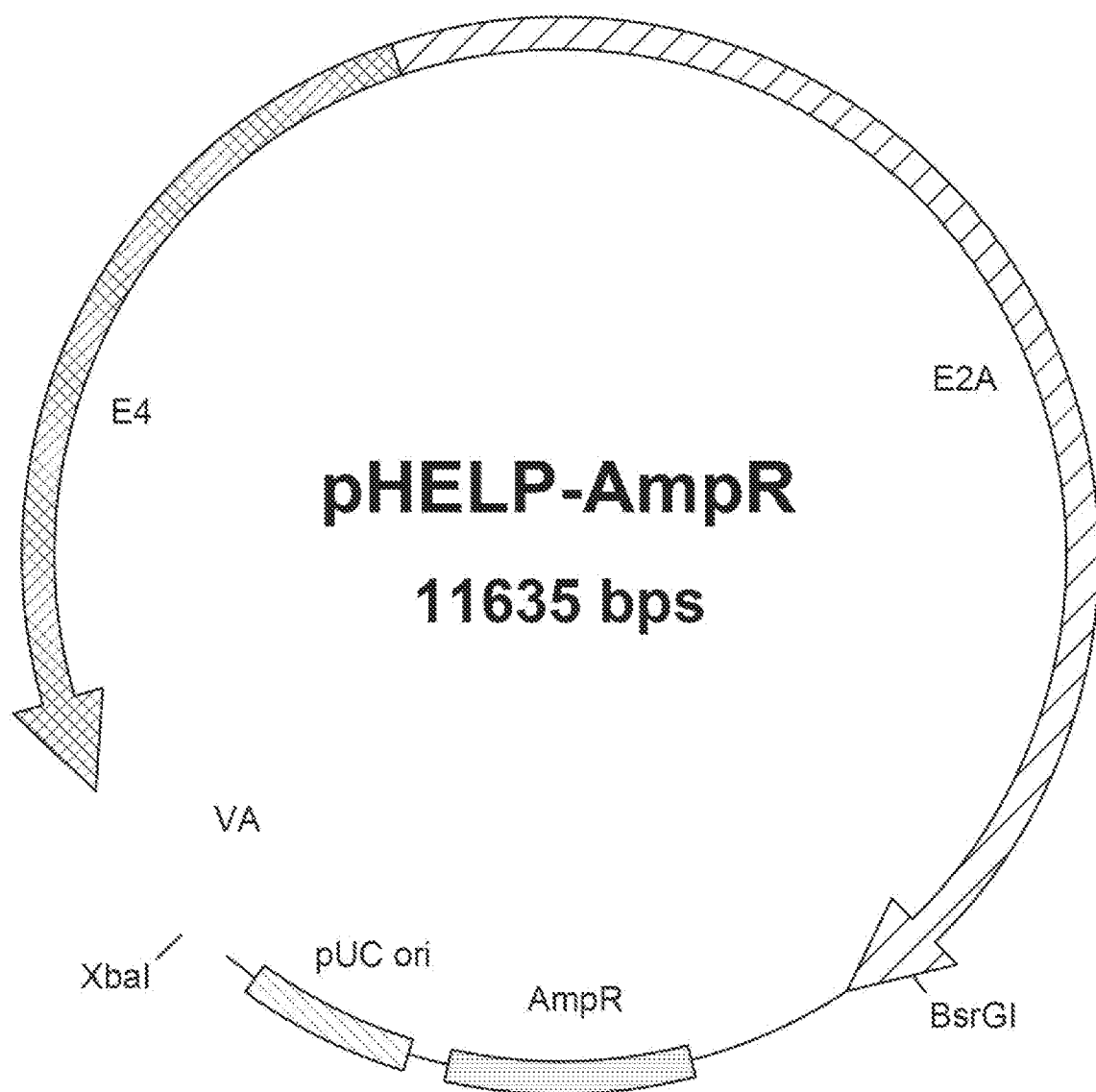
221. Composição ou formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, 18 a 28, 82 a 84 ou 205 a 211, caracterizada pelo fato de que a composição ou formulação compreende pelo menos um dos seguintes:

- a. menos de cerca de 0,09 ng de benzonase por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- b. menos do que cerca de 30 µg/g (ppm) de césio,
- c. cerca de 20-80 ppm de Poloxâmero 188,
- d. menos do que cerca de 0,22 ng de BSA por $1,0 \times 10^{13}$ vg,
- e. menos do que cerca de $6,8 \times 10^5$ pg de DNA plasmídico residual por $11,0 \times 10^{13}$ vg,
- f. menos que cerca de $1,1 \times 10^5$ pg de hcDNA residual por $1,0 \times 10^{13}$ vg, e
- g. menos que cerca de 4 ng de rHCP por $1,0 \times 10^{13}$ vg.



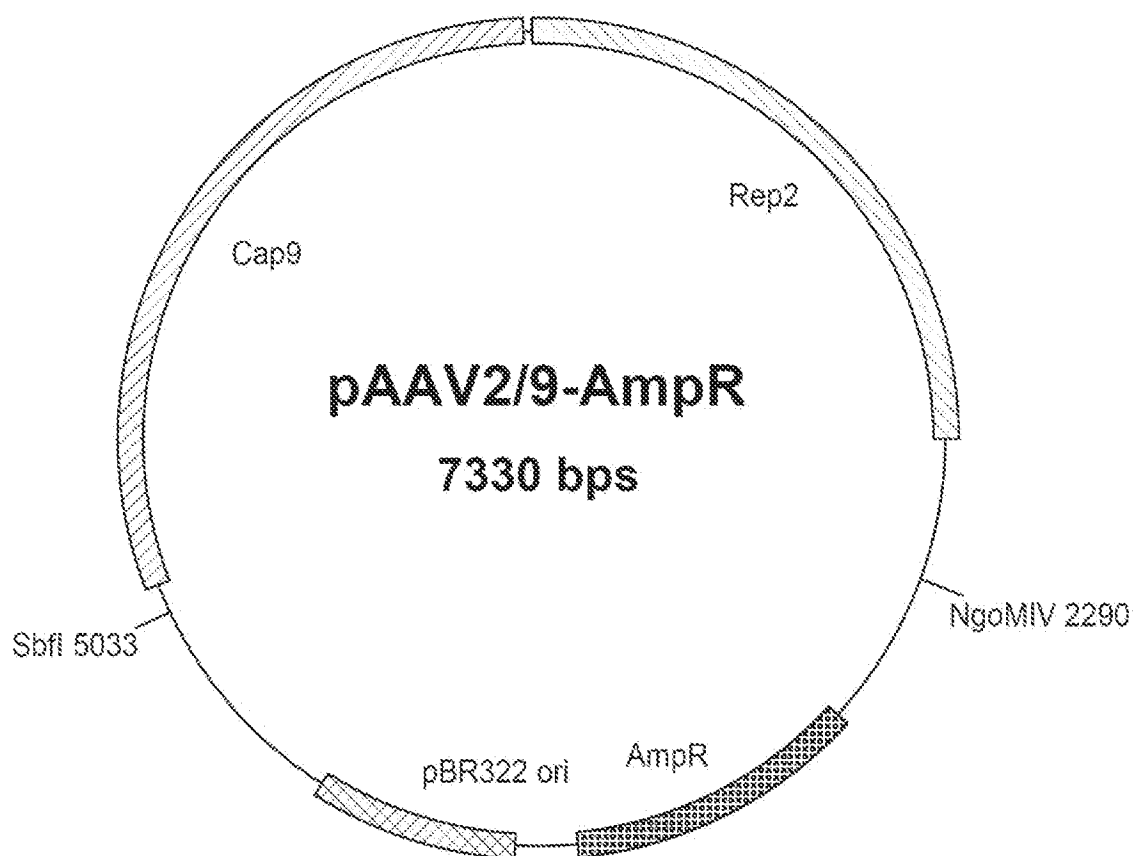
Mapa de pSMN

FIG. 1A



Mapa de pHELP

FIG. 1B



Mapa de pAAV2/9

FIG. 1C

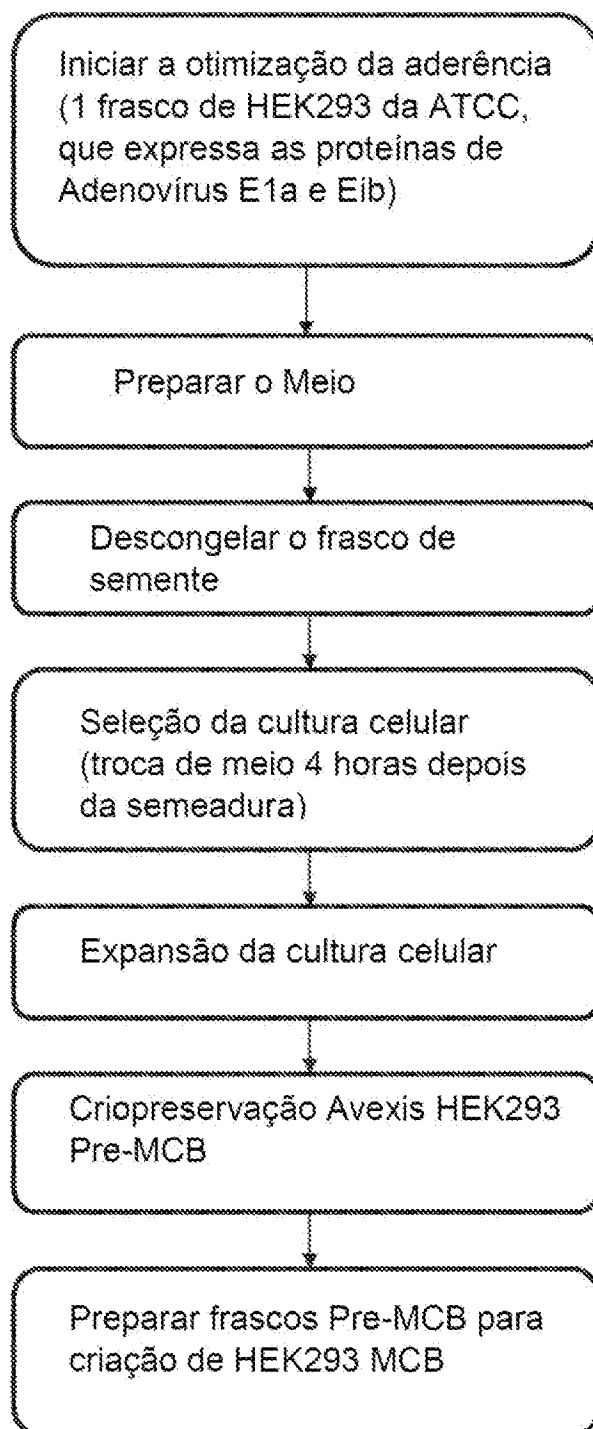


FIG. 2

Etapa/Pág. do Livro de Notas	Data	Detalhes				Notas
Descongela-mento pág. 3	22/7/2015	Frascos semeados	25	Passagem Antiga	0	células não foram contadas, mas frascos cheios da ATCC (1×10^8 células) foram plaqueadas. Quatro alterações de meio entre esta etapa e a próxima
		Densidade da semeadura	1×10^8 células	Nova Passagem	1*	
Passagem Pág. 5	27/7/2015	Frascos Semeados	75	Passagem Antiga	1	Células antes da divisão eram 95% confluentes. Etapa de seleção da aderência depois da semeadura leva a uma porção significativa de células não aderentes, perda: ~ 35% de perda celular pela inspeção visual
		Densidade da Semeadura	1:1	Nova Passagem	2	
Passagem Pág. 7	29/7/2015	Frascos Semeados	75	Passagem Antiga	2	Etapa de seleção de aderência incluída depois da semeadura
		Densidade da Semeadura	1:1	Nova Passagem	3	
Passagem Pág. 8	31/7/2015	Frascos Semeados	2x175	Passagem Antiga	3	Etapa de seleção de aderência incluída depois da semeadura com muito menos perda pronunciada de células pela inspeção visual
		Densidade da Semeadura	1:4:7	Nova Passagem	4	
Passagem Pág. 9	3/08/2015	Frascos Semeados	?x175	Passagem Antiga	4	Uma troca de meio entre esta etapa e a próxima
		Densidade da Semeadura	1:4	Nova Passagem	5	
Passagem Pág. 10	6/08/2015	Frascos Semeados	20x175	Passagem Antiga	5	Uma troca de meio entre esta etapa e a próxima
		Densidade da Semeadura	1:3 ou 1:2	Nova Passagem	6	
Coleta/Crio- preservação Págs. 11-15	9/8/2015	Concentra- ção Celular	1×10^7 células/ mL	Frascos Cheios	22	Agrupadas 2 suspensões celulares para fornecer 1×10^8 células e $1,2 \times 10^8$ células
Nota: Todas as Células Totais relatadas acima possuem a unidade de "células" e indica o total de células recuperadas. Todas as Densidades de Semeadura relatadas acima possuem a unidade de "células/cm²" Todos os frascos relatados acima possuem a unidade de "cm²" Todas as Concentrações celulares relatadas acima possuem a unidade "células/mL" *Descongelamento foi considerado uma passagem, assim as células descongeladas foram marcadas como "passagem 1".						

FIG. 3

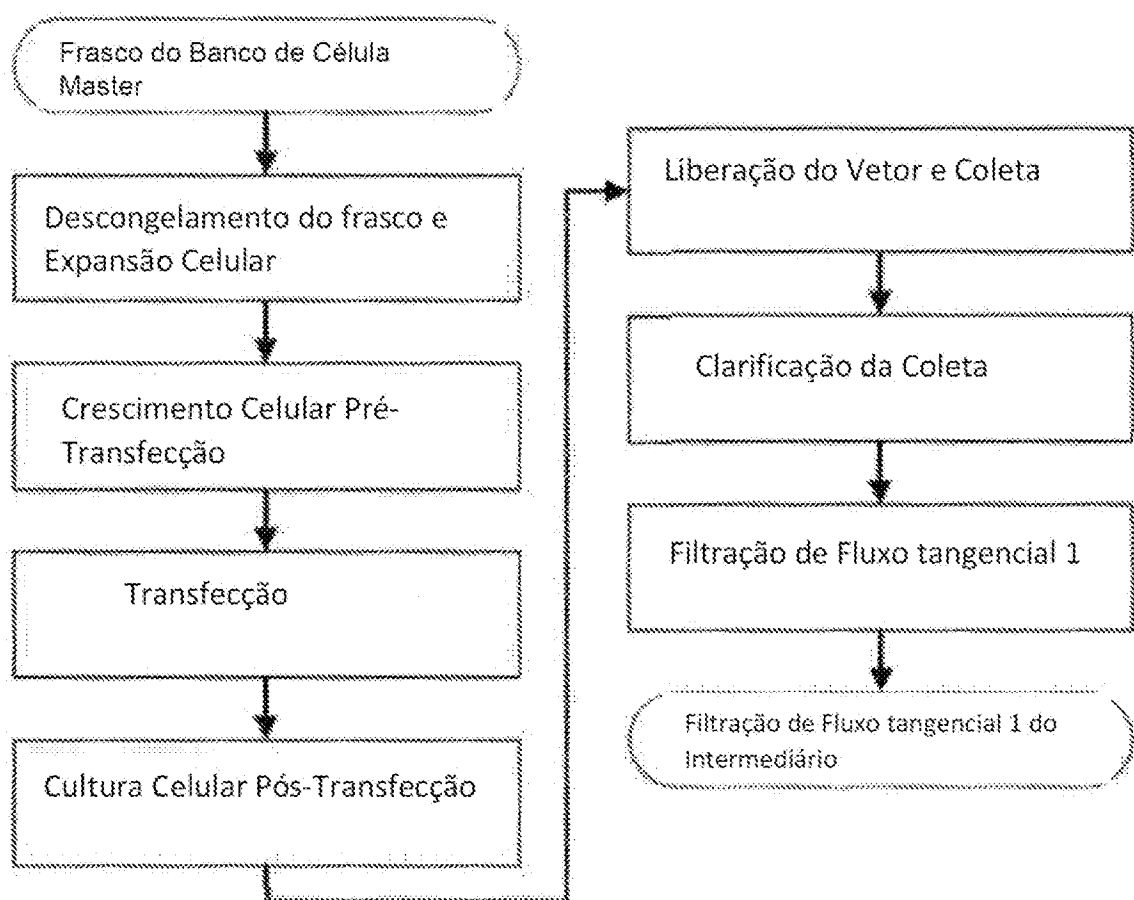


FIG. 4

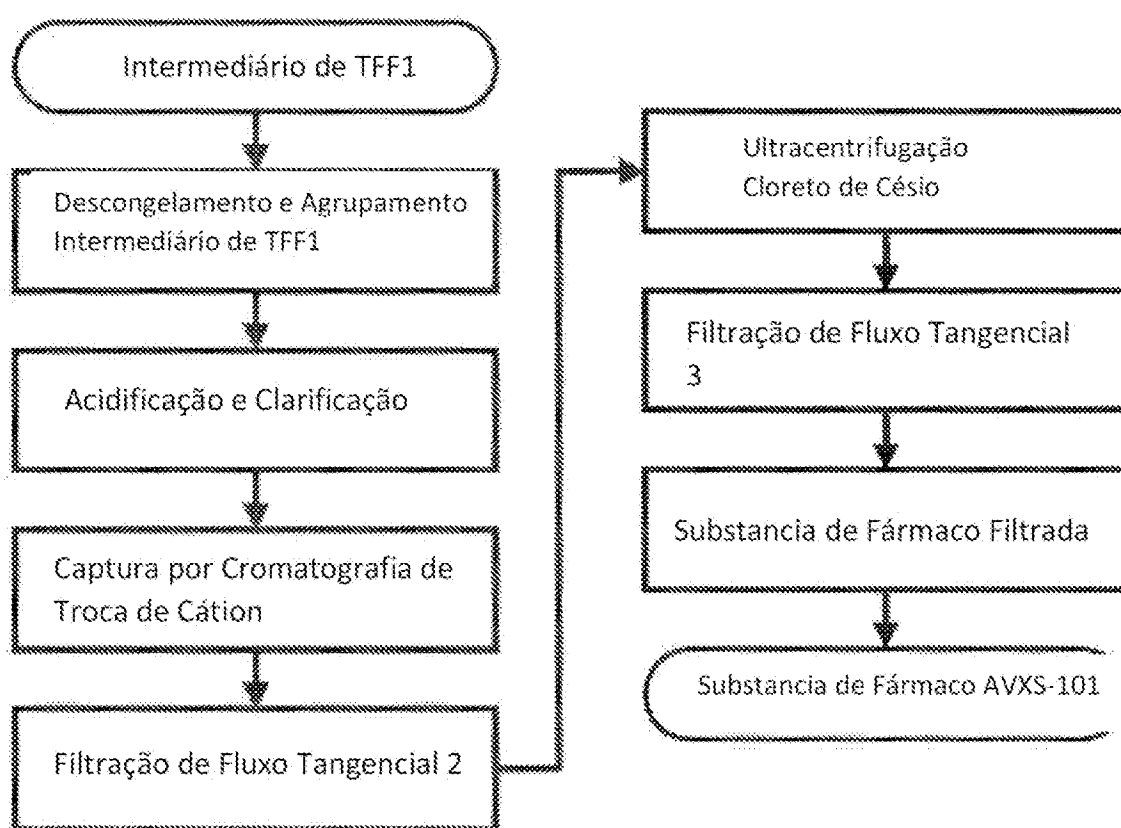


FIG. 5

Cinética de Inativação
Inativação de XMuLV por Tween 20
Estudo TXNA No. 17-159-10F4-1

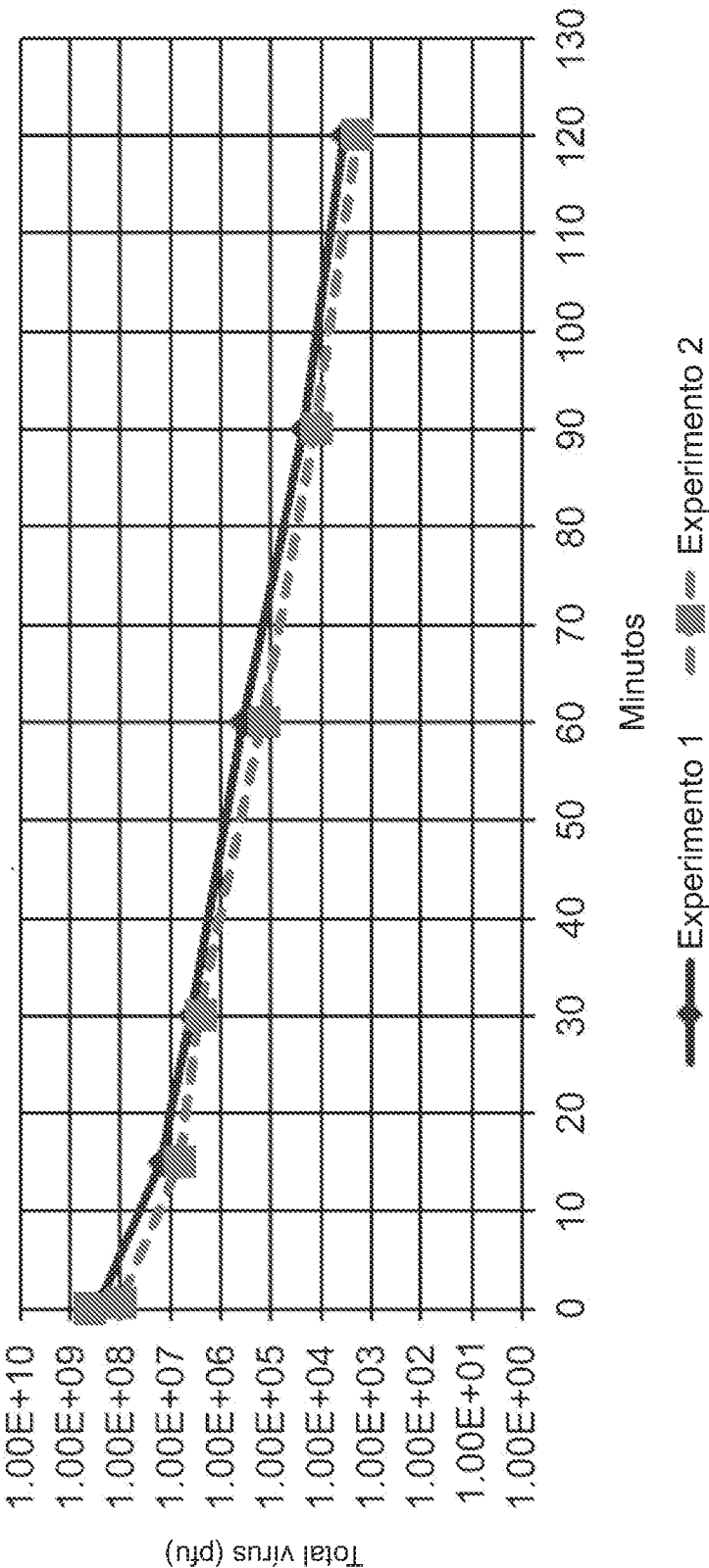


FIG. 6

Cinética de Inativação
Inativação de PRV por Tween 20
Estudo TXNA No. 17-160-40F4-1

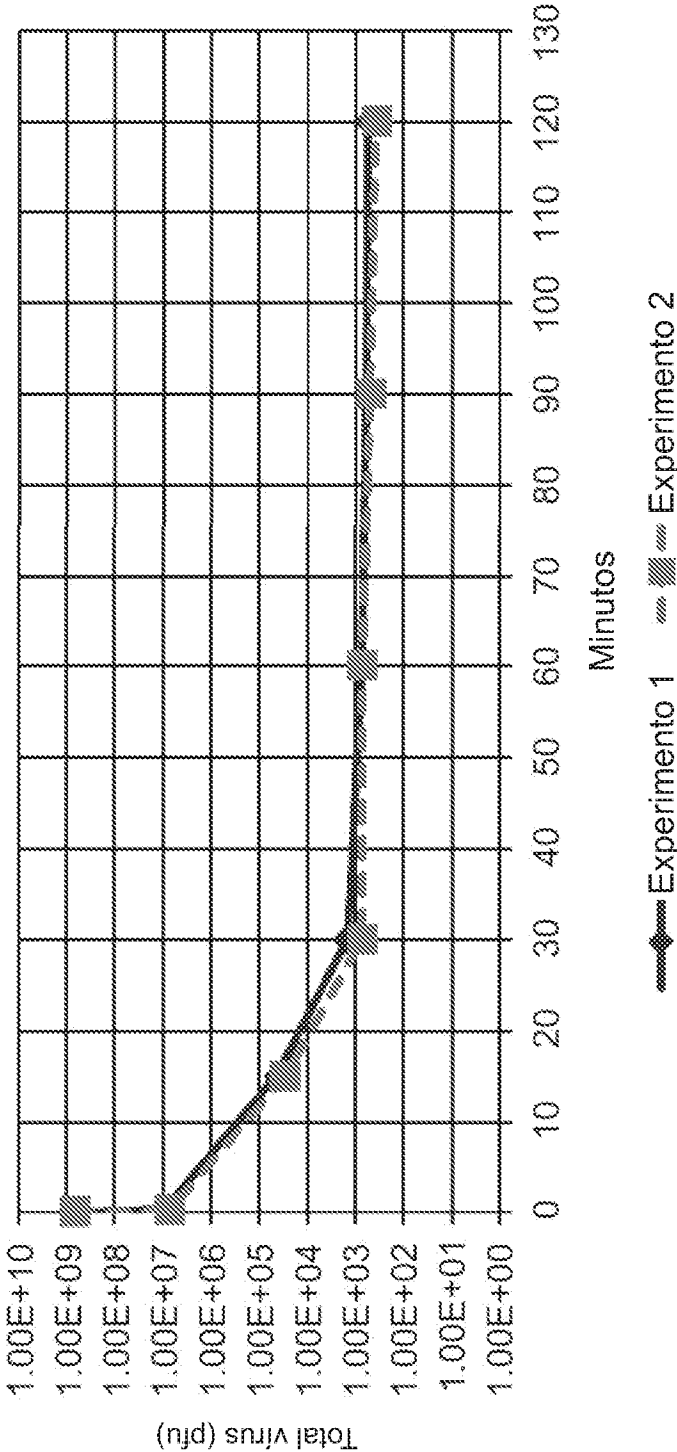


FIG. 7

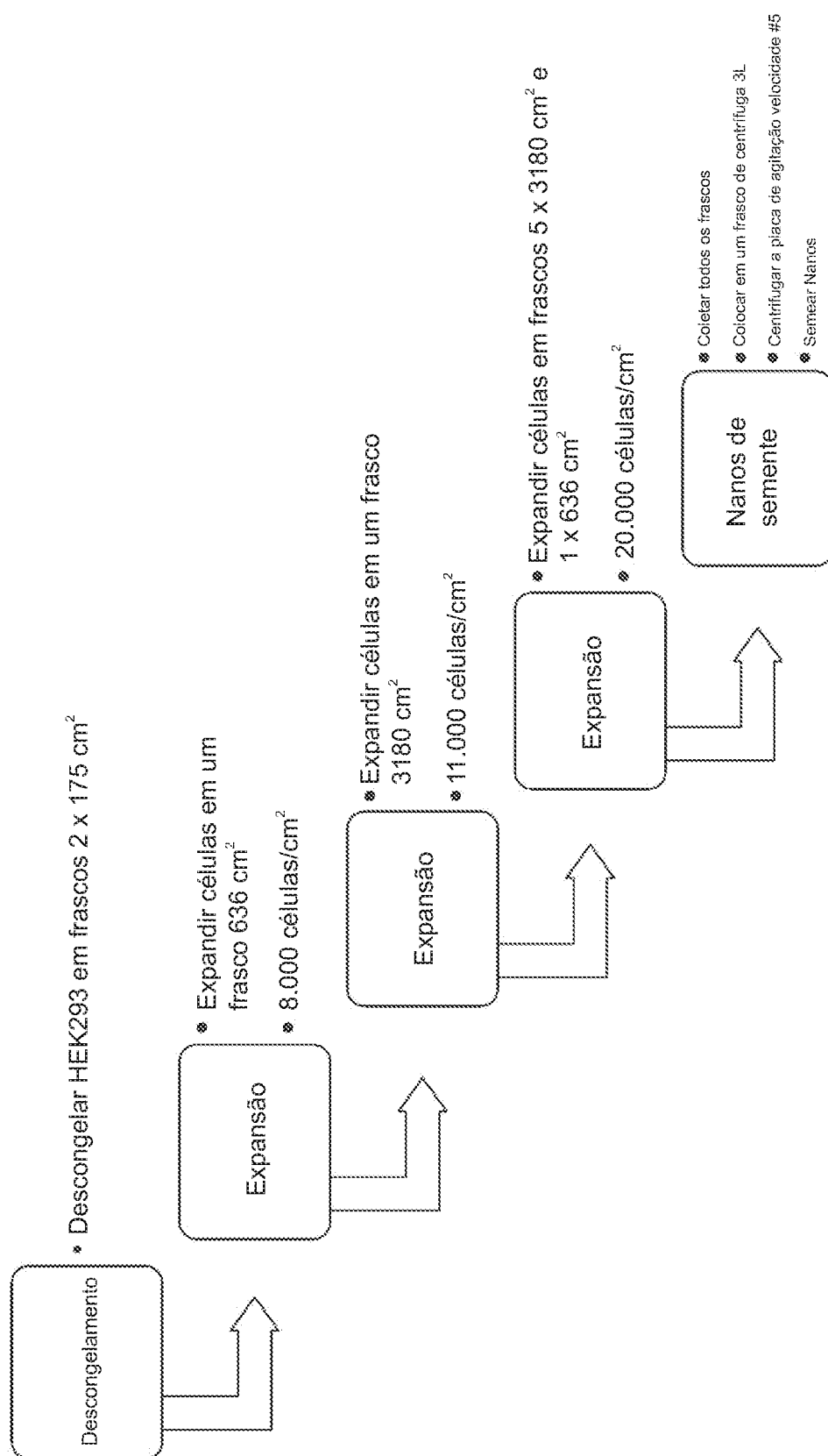


FIG. 8

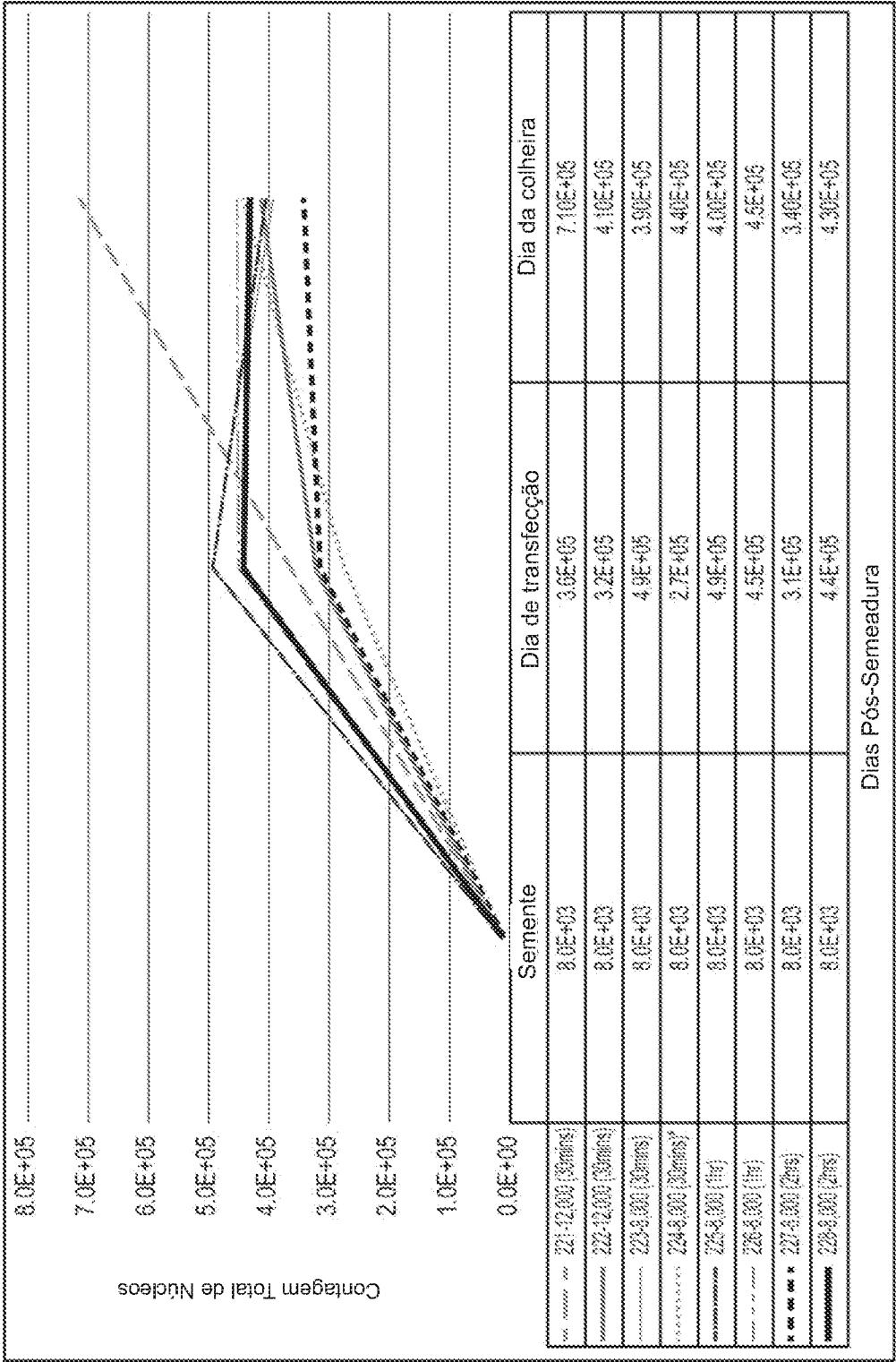


FIG. 9A

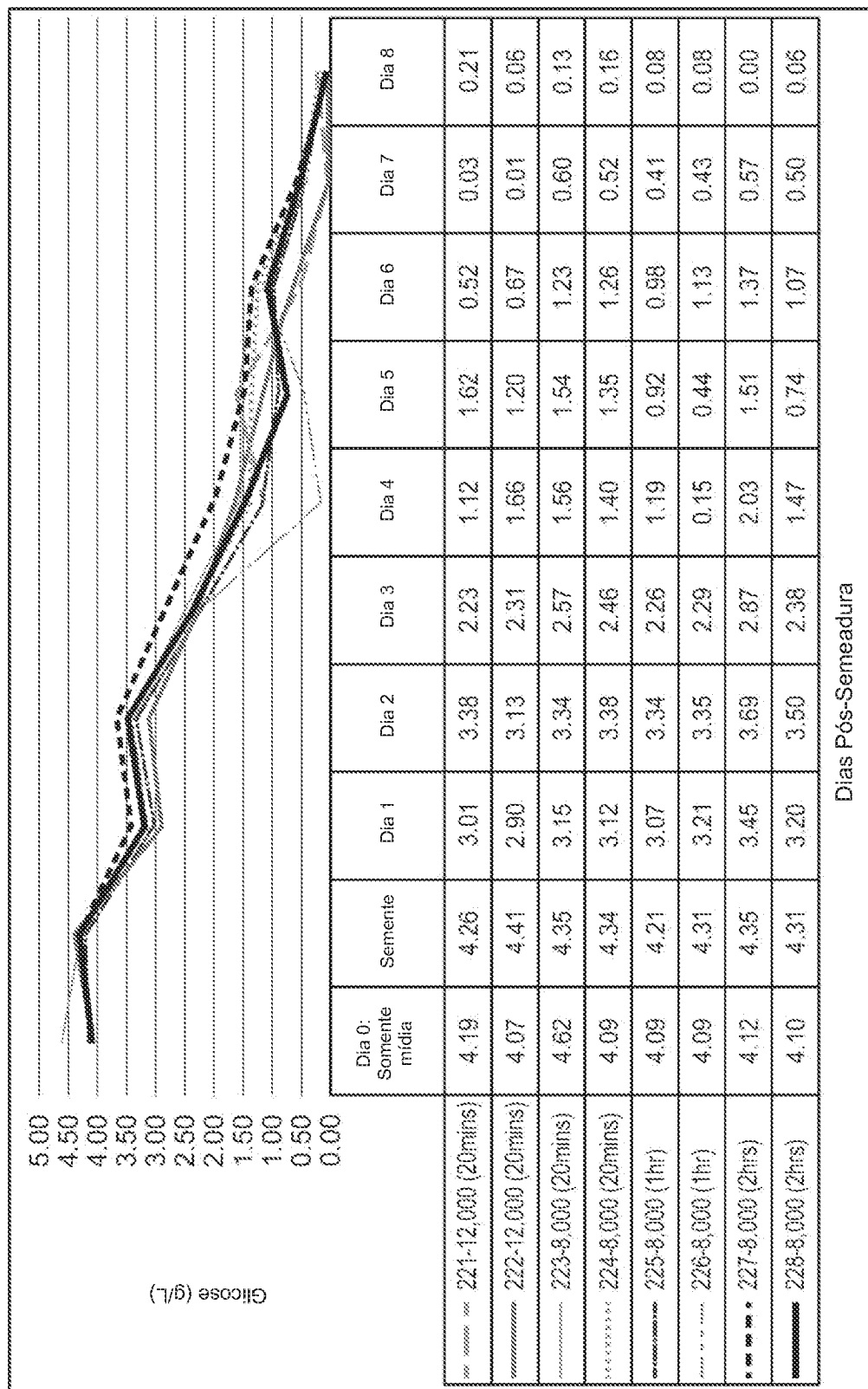


FIG. 9B

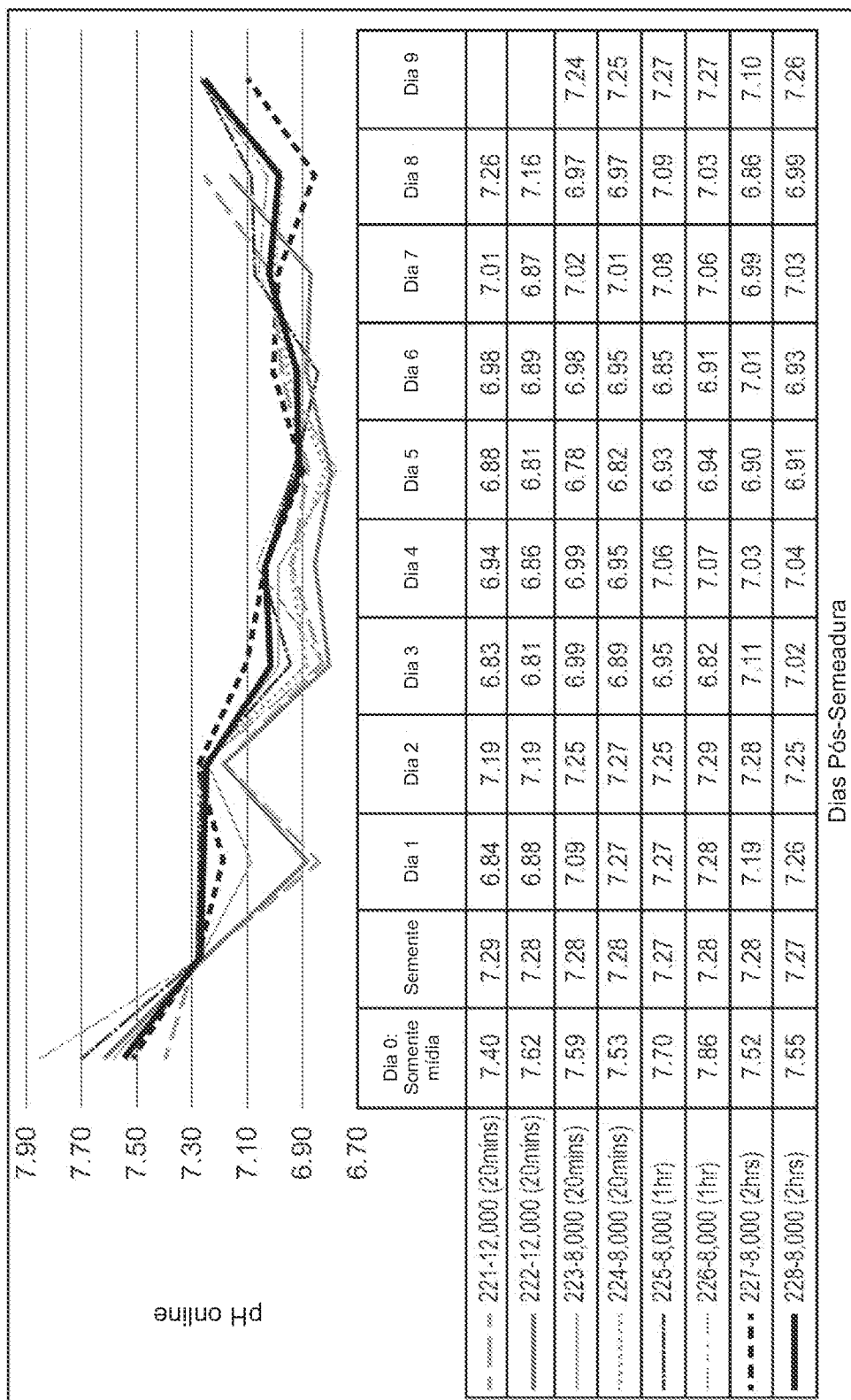


FIG. 9C

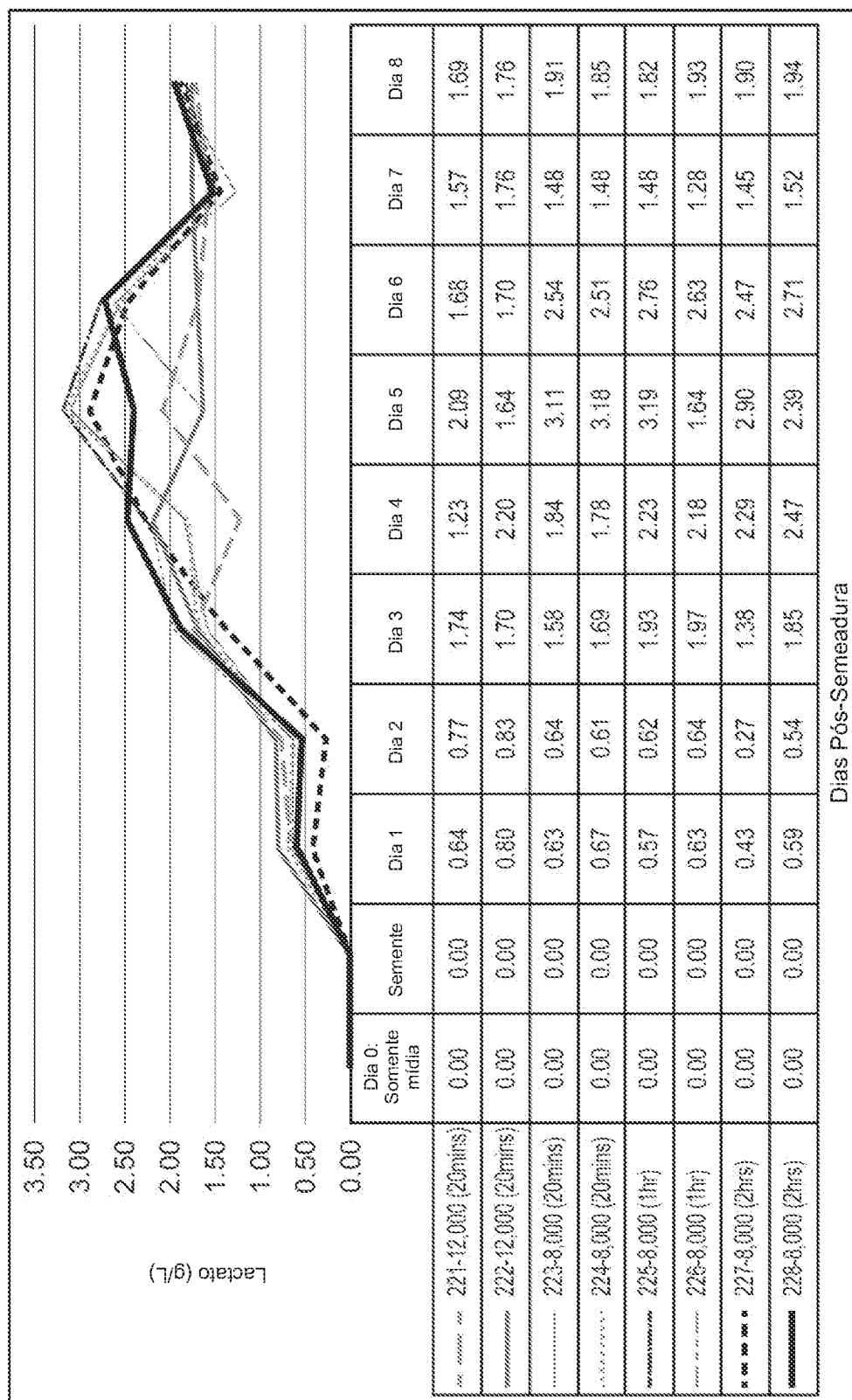


FIG. 9D

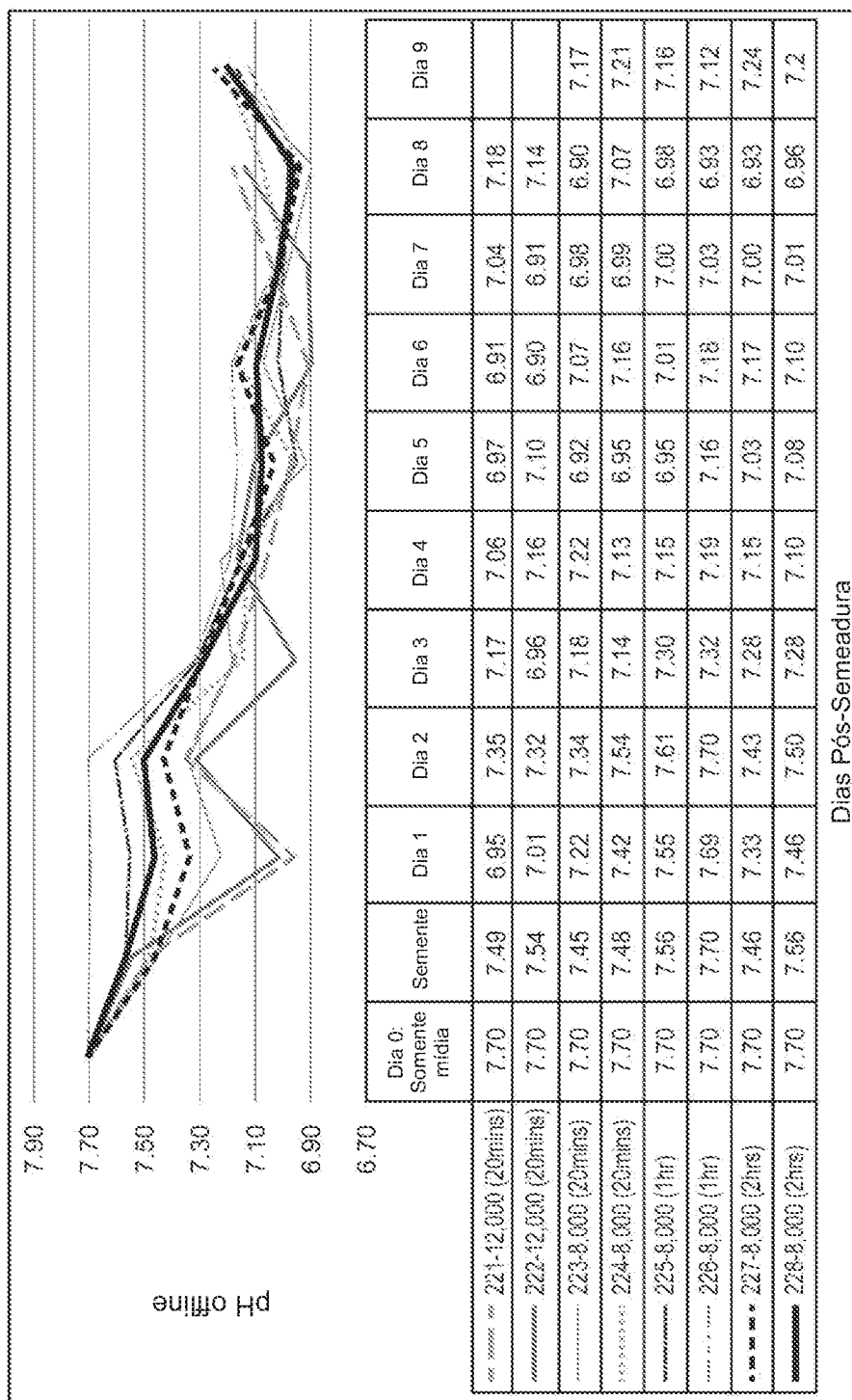


FIG. 9E

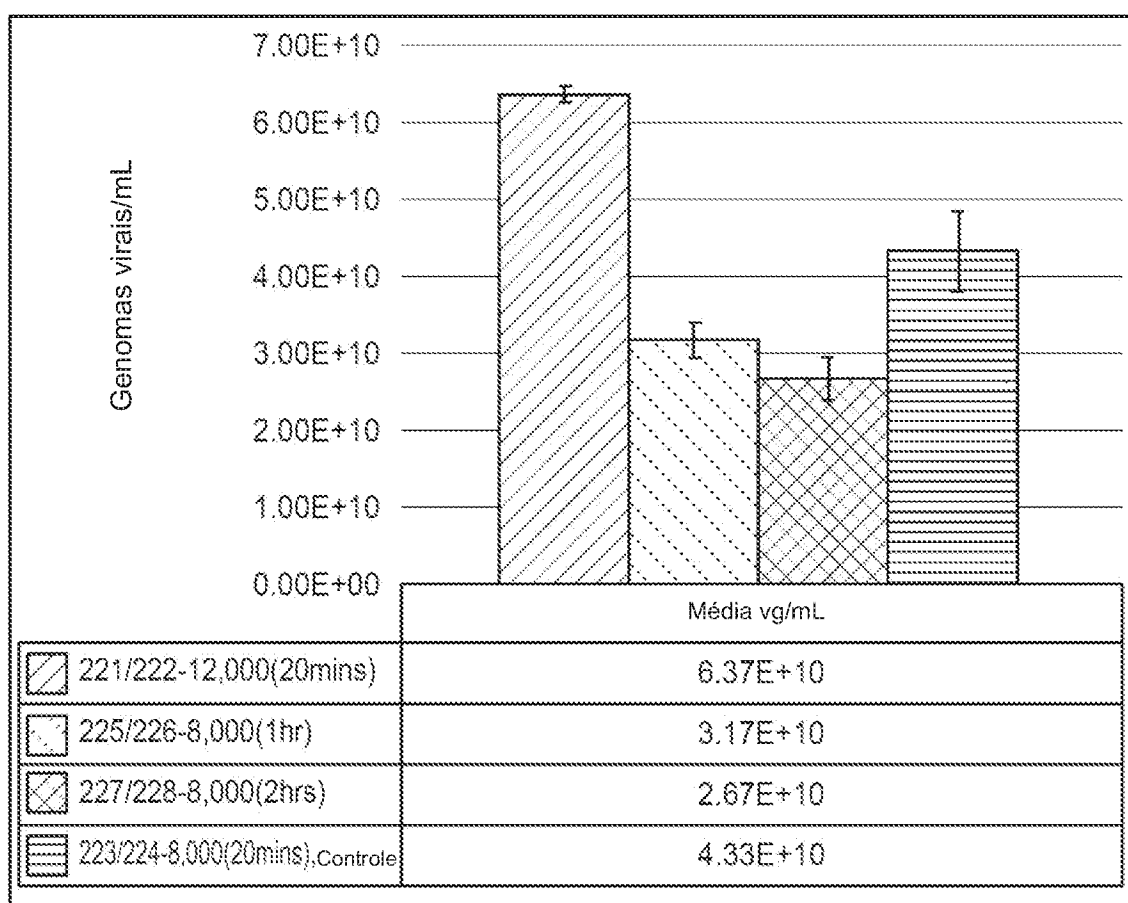


FIG. 10

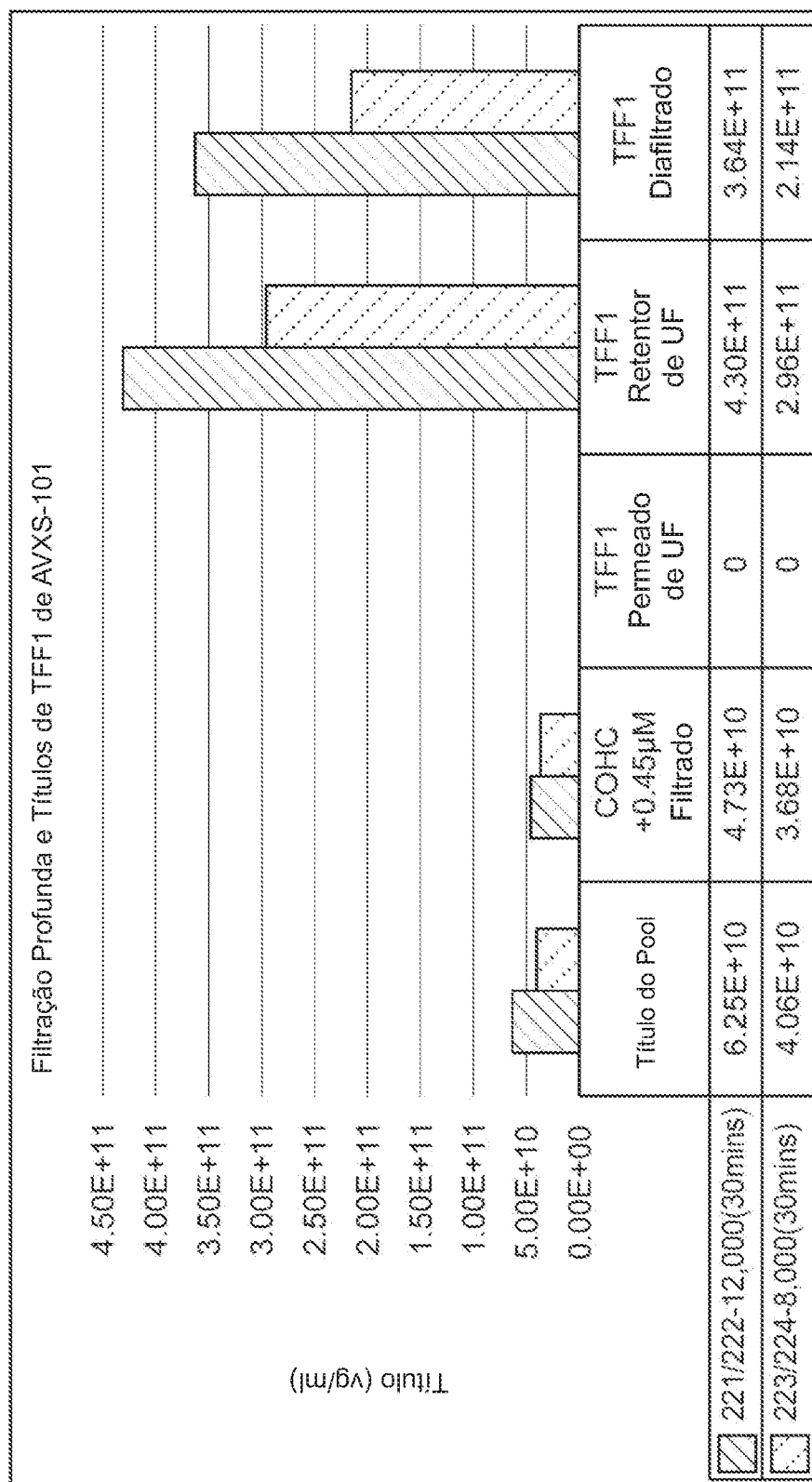


FIG. 11

8000 células/cm2, Trans D5 Coleta D9					12000 células/cm2, Trans D4 Coleta D8				
	Volume	Título	vg Total	Etapa	Recuperação total	Volume	Título	vg Total	Etapa
				Recuperação					Recuperação total
Pool Lisado	3200	4.06E+10	1.30E+14			3200	6.25E+10	2.00E+14	
P6s C0HC + 0,45	4000	3.68E+10	1.47E+14	113%	113%	4000	4.73E+10	1.89E+14	95%
Retentado UF TFF1	400	2.96E+11	1.18E+14	80%	91%	400	4.30E+11	1.72E+14	91%
Retentado DF TFF1	580	2.14E+11	1.24E+14	105%	96%	502	3.64E+11	1.83E+14	106%
Permeado UF TFF1	3600	<4E8	1.44E+12	1%		3600	<4.0E8	1.44E+12	1%

FIG. 12A

8000 células/cm2, Trans D5 Coleta D9					12000 células/cm2, Trans D4 Coleta D8						
	Volume	ug/mL	HCP Total ug	Etapa Depuração HCP	Depuração Total HCP		Volume	ug/mL	HCP Total ug	Etapa Depuração HCP	Depuração Total HCP
Pool Lisado	3200	67.52	218065	8.4%	8.42%		3200	58.38	186813	24.5%	24.53%
Pós C0HC + 0,45	4000	49.47	197862	8.4%	8.42%		4000	35.25	140988	24.5%	24.53%
Retentado UF TFF1	400	170.90	68358	65.5%	68.36%		400	120.09	48036	65.9%	74.29%
Retentado DF TFF1	580	52.17	30261	55.7%	86%		502	17.48	8775	81.7%	95%
Permeado UF TFF1	3600	29.50	106186	54%			3600	26.69	96080.4	68%	

FIG. 12B

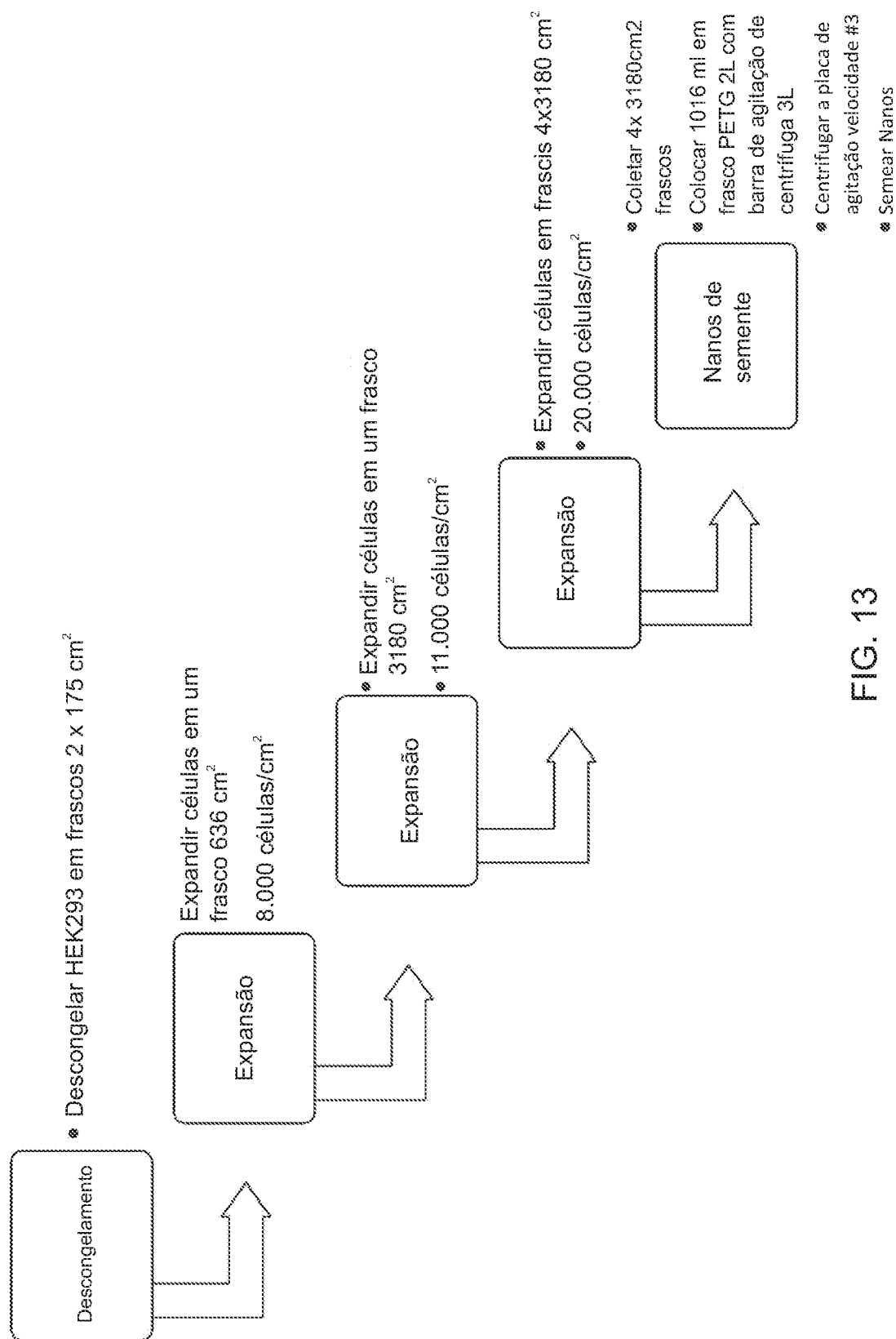
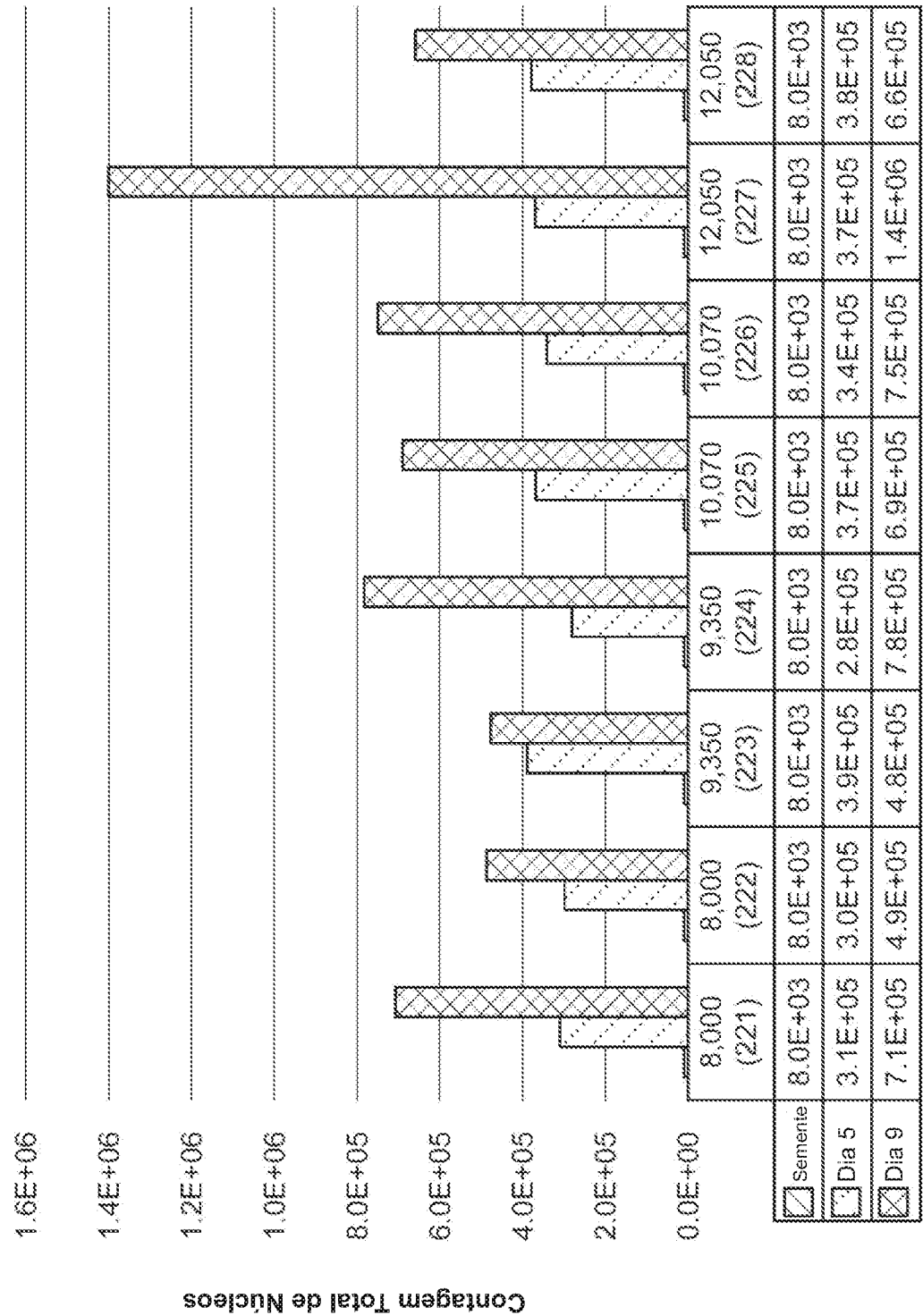


FIG. 13



Densidade da Semeadura

FIG. 14A

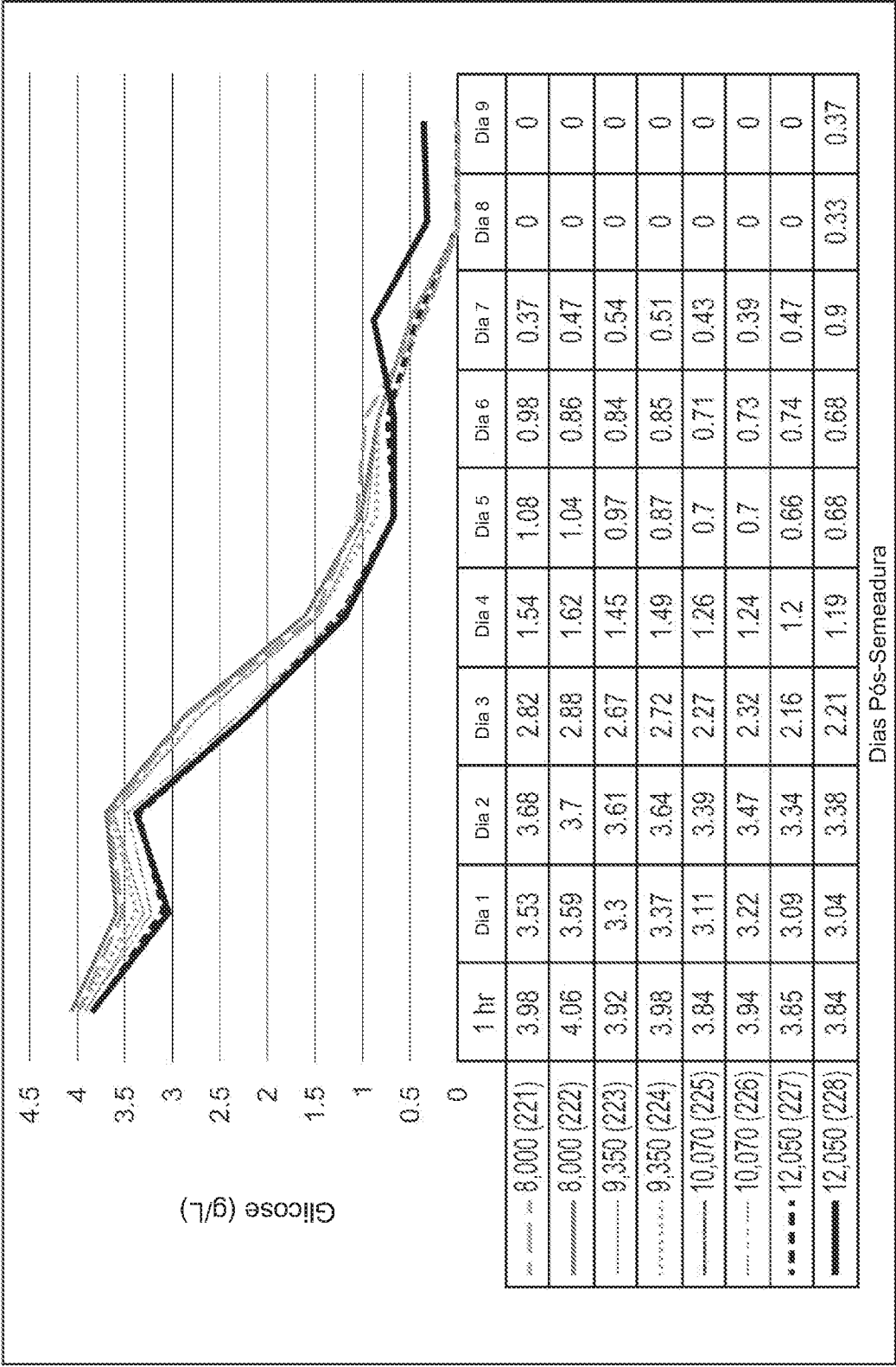
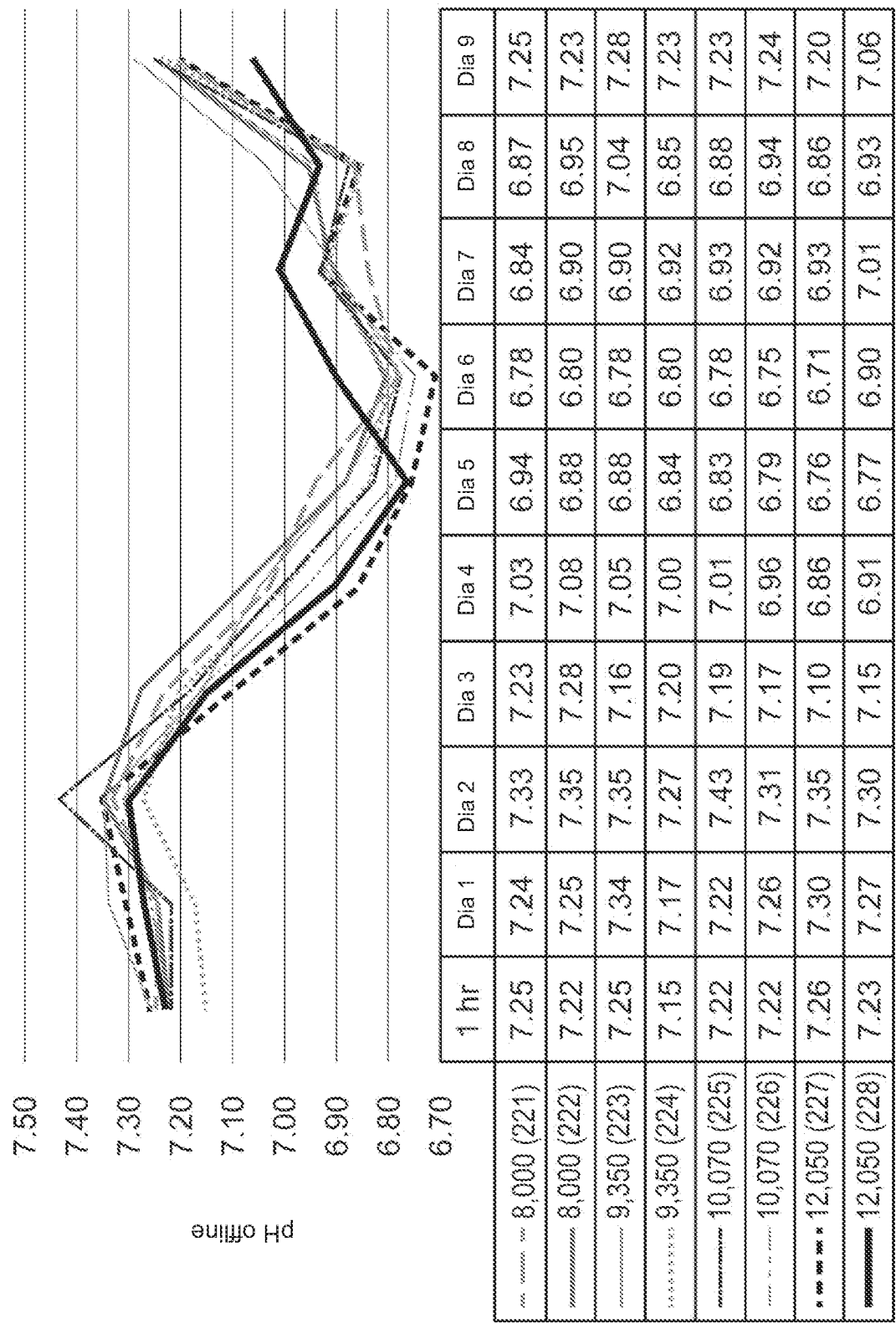


FIG. 14B



Dias Pós-Semeadura

FIG. 14C



FIG. 14D

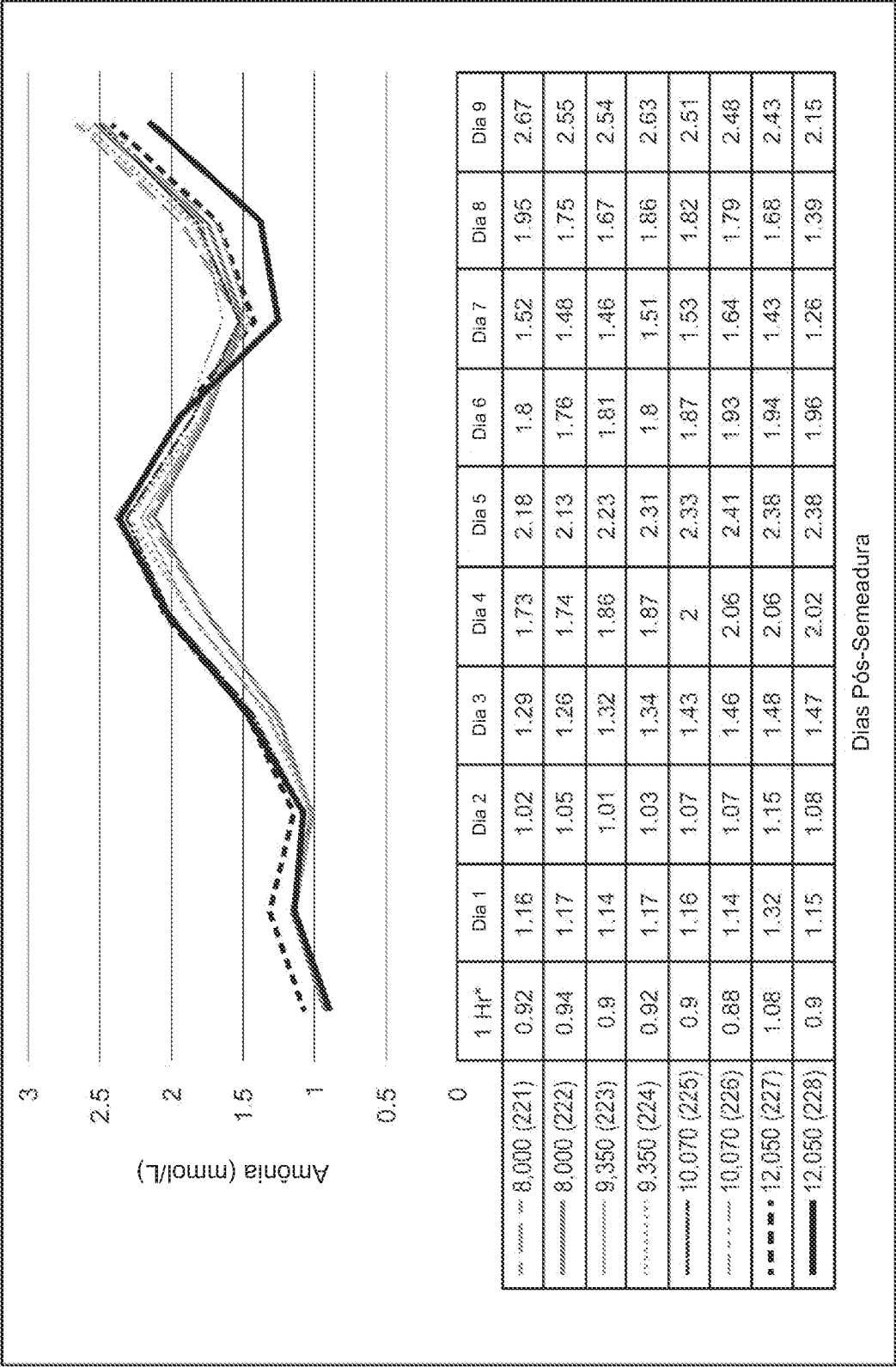


FIG. 14E

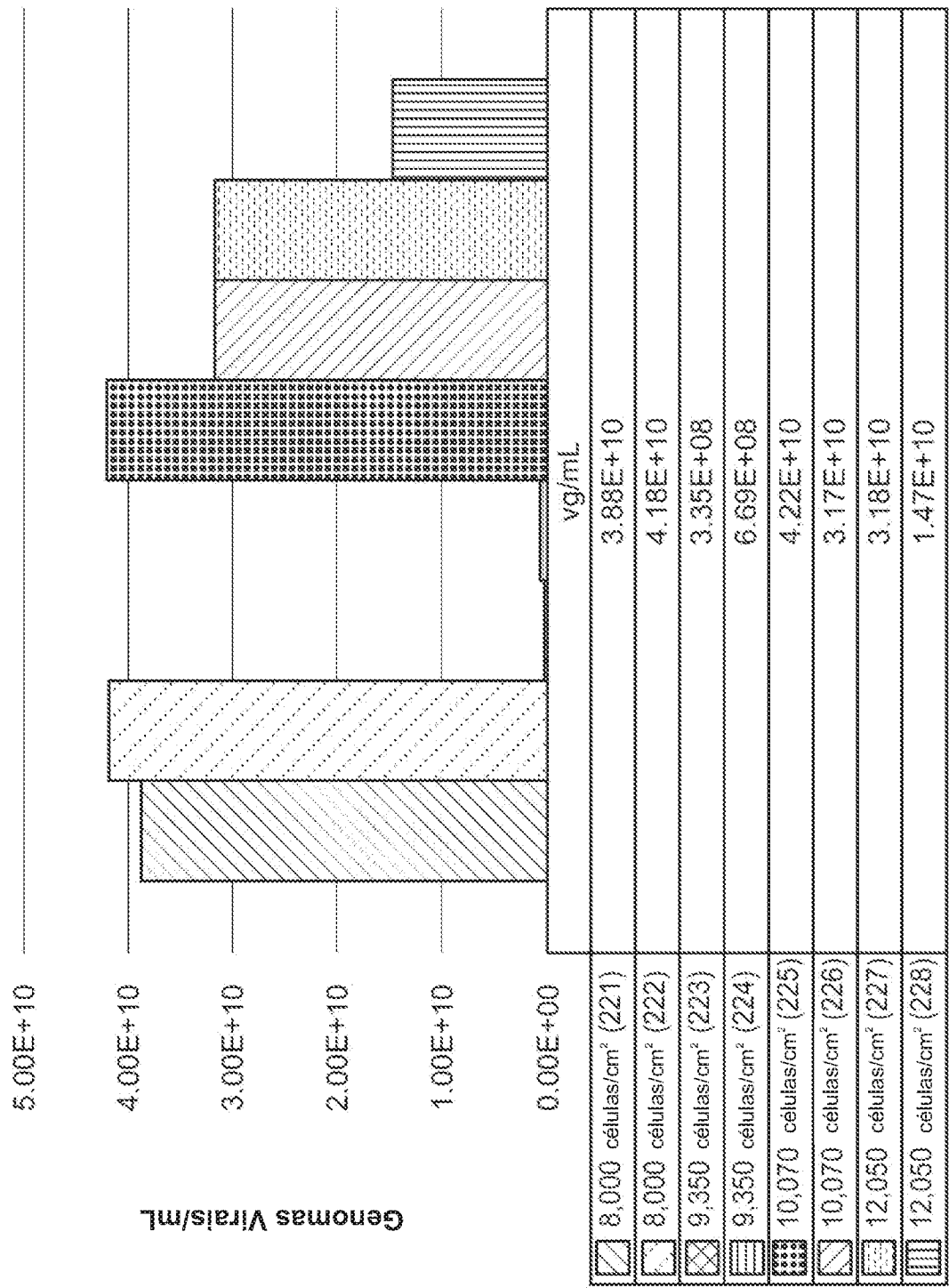


FIG. 15A

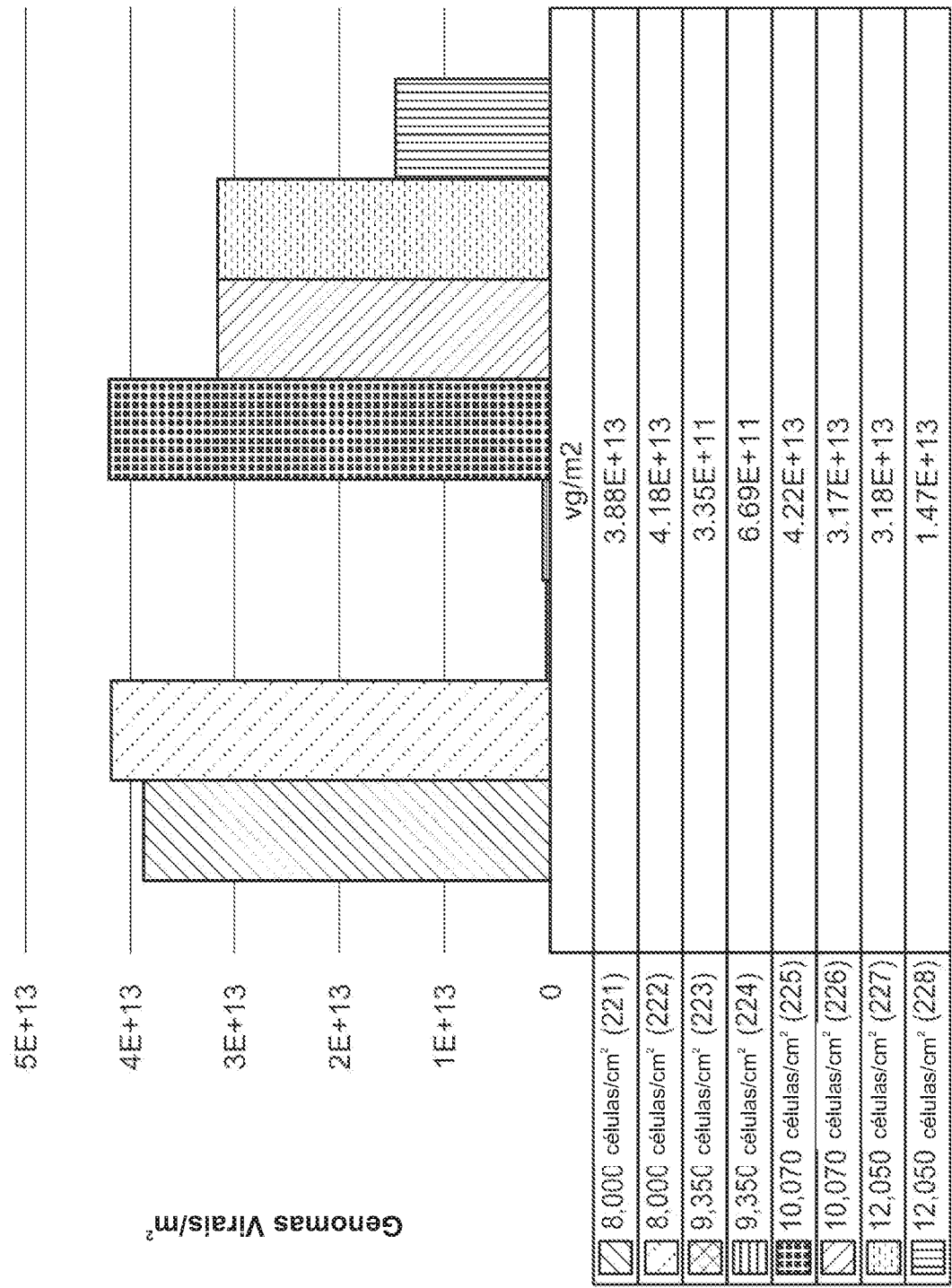


FIG. 15B

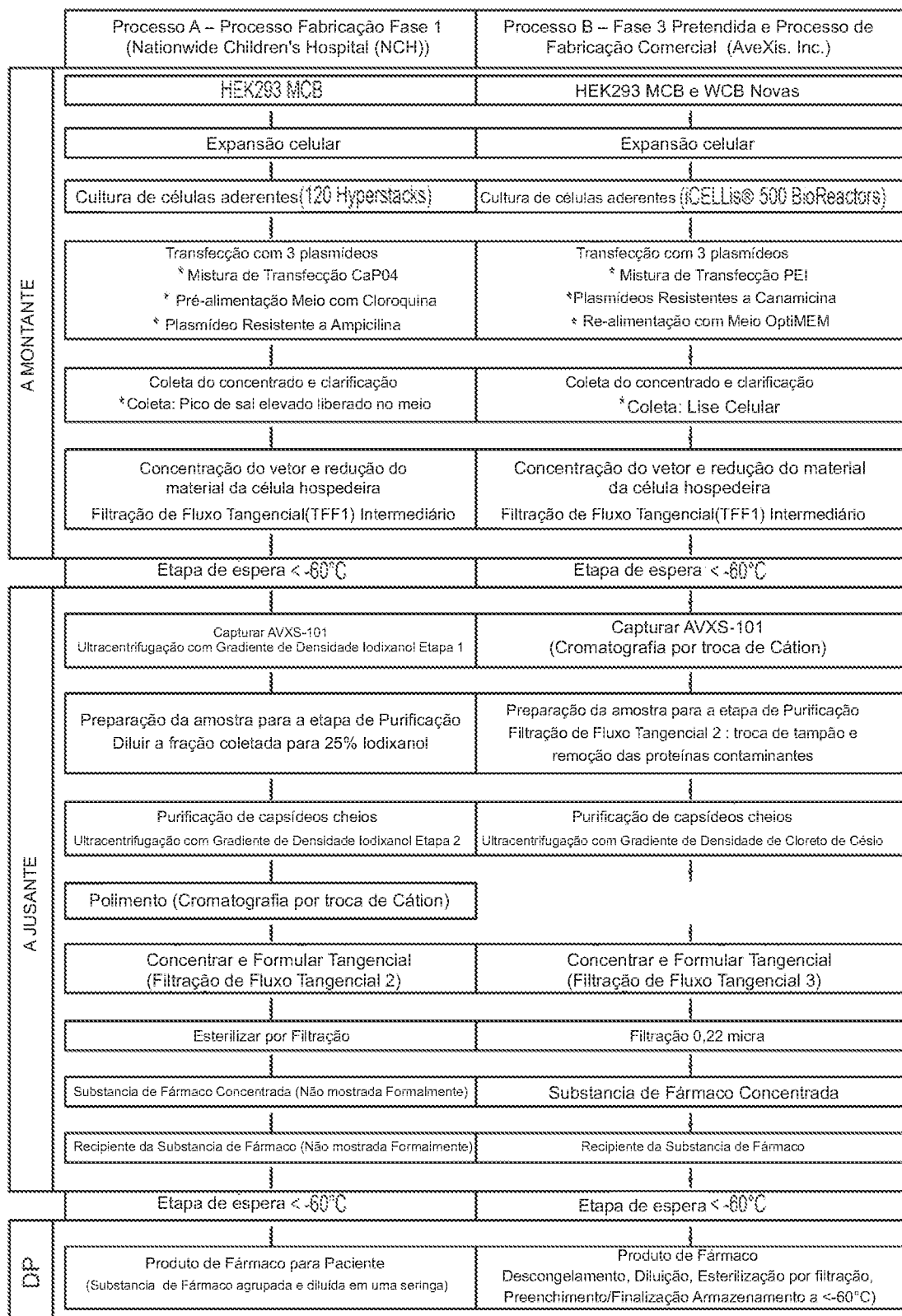


FIG. 16

Descrição do Teste	Método do Teste	Limite do Teste Proposto	NCH Fase 1 Lote NCHAAV95MN0613	AVXS-101 Lote 600156	AVXS-101 Lote 600307
			Data Fabricação: 18 Dez 2013 Data de Teste: 13 Fev 2017 a 08 Ago 2017 ⁽¹⁾	Data Fabricação: 7 Nov 2013 Data de Teste: 08 Nov 2017 a 26 Dez 2017	Data Fabricação: 4 Dez 2013 Data de Teste: 05 Dez 2017 a 30 Jan 2017
Título Genômico por qPCR	SOP-137	$2,0 \times 10^{12}$ – $6,0 \times 10^{12}$ vg/mL	$1,3 \times 10^{11}$ vg/mL (n=9) ⁽²⁾	$3,7 \times 10^{11}$ vg/mL (n=9) ⁽²⁾	$4,0 \times 10^{11}$ vg/mL (n=14) ⁽²⁾
Título Infeccioso	SOP-152	Resultados Relacionados	$5,9 \times 10^8$ IU/mL ⁽²⁾	$1,3 \times 10^{12}$ vg/mL (n=9) ⁽²⁾	$6,7 \times 10^8$ IU/mL ⁽²⁾
Partículas Subvisíveis	SOP-262	≤ 600 partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ ≤ 600 partículas $\geq 25 \mu\text{m}$	22 partic/recipient $\geq 10 \mu\text{m}$ 4 partic/recipient $\geq 25 \mu\text{m}$	119 partic/recipient $\geq 10 \mu\text{m}$ 4 partic/recipient $\geq 25 \mu\text{m}$	9 partic/recipient $\geq 10 \mu\text{m}$ 2 partic/recipient $\geq 25 \mu\text{m}$
pH	SOP-262	7,5 – 8,5	7,9	7,9	8,0
Osmolalidade	SOP-128	384-488 mOsm/kg	410 mOsm/kg	415 mOsm/kg	410 mOsm/kg
Aparência pela Inspeção Visual	SOP-164	Solução clara a levemente opaca, incolor a quase branca sem partículas visíveis	Solução clara e incolor sem partículas visíveis	Solução quase branca, levemente opaca sem partículas visíveis ⁽²⁾	Solução incolor, levemente opaca sem partículas visíveis
Proteína Total por BCA	SOP-184	128-320 $\mu\text{g/mL}$ por $1,0 \times 10^{12}$ vg/mL	167 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²⁾ (177 $\mu\text{g/mL}$) ⁽²⁾	179 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²⁾ (661 $\mu\text{g/mL}$) ⁽²⁾	176 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²⁾ (702 $\mu\text{g/mL}$) ⁽²⁾
hcDNA Residual por qPCR	SOP-190	$\leq 1,2 \times 10^5$ pg/mL por $1,0 \times 10^{12}$ vg/mL	$3,7 \times 10^5$ pg/mL ⁽²⁾ ($3,9 \times 10^5$ pg/mL) ⁽²⁾	$0,76 \times 10^5$ pg/mL ⁽²⁾ ($2,8 \times 10^5$ pg/mL) ⁽²⁾	$0,68 \times 10^5$ pg/mL ⁽²⁾ ($2,72 \times 10^5$ pg/mL) ⁽²⁾
% Capsídeo Vazio por AUC	SOP-263	$\leq 7\%$	7%	2%	4%
IO Vetor por SDS-PAGE	SOP-180	Bandas Principais de VP1, VP2 e VP3 migram junto com AVXS-101 de controle	Bandas Principais de VP1, VP2 e VP3 migram junto com AVXS-101 de controle <u>MWs Bandas Principais:</u> VP1: 84,9 a 89,5 kDa VP2: 65,9 a 69,1 kDa VP3: 57,1 a 59,0 kDa	Bandas Principais de VP1, VP2 e VP3 migram junto com AVXS-101 de controle <u>MWs Bandas Principais:</u> VP1: 83,5 a 84,4 kDa VP2: 64,6 a 65,5 kDa VP3: 56,2 a 57,2 kDa	Bandas Principais de VP1, VP2 e VP3 migram junto com AVXS-101 de controle <u>MWs Bandas Principais:</u> VP1: 82,9 a 84,9 kDa VP2: 64,3 a 65,2 kDa VP3: 56,0 a 56,7 kDa
Pureza por SDS-PAGE	SOP-180	%Pureza Total (Vp1, VP2 e VP3): $\geq 95\%$	%Pureza Total: 98% (Avg n=4 géis)	%Pureza Total: 99% (Avg n=4 géis)	%Pureza Total: 99% (Avg n=4 géis)

FIG. 17A

Descrição do Teste	Método do Teste	Limite do Teste Proposto	NCH Fase 1 Lote NCHAAV954MN0613 Data Fabricação: 18 Dez 2013 Data de Teste: 13 Fev 2017 a 08 Ago 2017 ⁽¹⁾	AVXS-101 Lote 600156 Data Fabricação: 7 Nov 2013 Data de Teste: 08 Nov 2017 a 26 Dez 2017	AVXS-101 Lote 600307 Data Fabricação: 4 Dez 2013 Data de Teste: 05 Dez 2017 a 30 Jan 2017
Impurezas Totais por SDS-PAGE	SCP-180	%Total De Impurezas ≤ 5% Impureza desconhecida > 2% <u>Impurezas Nomeadas</u> <u>Valor Relatado</u> --Imp 1A (~71-73 kDa) --Imp 1 (~61-67 kDa) --Imp 2 (~56-64 kDa) --Imp 3 (~48-58 kDa) --Imp 4 (~33-38 kDa) --Imp 5 (~30-34 kDa)	% Impureza Totais: 2% (Avg n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> <u>(Avg n=4 géis)</u> --Imp 1: 1,5% Imp 3: <LOQ (1,0%)	% Impureza Totais: 1% (Avg n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> <u>(Avg n=4 géis)</u> --Imp 1: <LOQ (1,0%) --Imp 3: <LOQ (1,0%) --Imp 4: <LOQ (1,0%)	% Impureza Totais: 1% (Avg n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> <u>(Avg n=4 géis)</u> --Imp 1: 1,0% -- Imp 4: <LOQ (1,0%)
Identidade do Vetor por Western	SCP-179	Positivo para Proteína do Capsídeo	Positivo para Proteína do Capsídeo MWs Bandas Principais: VP1: 79,7 kDa VP2: 64,1 kDa VP3: 55,7 kDa	Positivo para Proteína do Capsídeo MWs Bandas Principais: VP1: 80,2 kDa VP2: 66,2 kDa VP3: 58,2 kDa	Positivo para Proteína do Capsídeo MWs Bandas Principais: VP1: 79,1 kDa VP2: 64,8 kDa VP3: 57,5 kDa
HCP Residual por ELISA	SCP-183	≤40 ng/mL por 1×10^{11} vg/mL	<LOQ (8 ng/mL) ⁽²⁾	<LOQ (0,50 ng/mL) ⁽²⁾	<LOQ (8 ng/mL) ⁽²⁾
Identidade do Genoma do Vetor por ddPCR	SCP-137	Confirmada	Confirmada	Confirmada	Confirmada
BSA Residual por ELISA	SCP-181	≤3ng/mL por 1×10^{11} vg/mL	<LOQ (0,50 ng/mL) ⁽²⁾	<LOQ (0,50 ng/mL) ⁽²⁾	<LOQ (0,50 ng/mL) ⁽²⁾
Benzonase Residual por Elisa	SCP-182	≤1,0 ng/mL por 1×10^{11} vg/mL	<LOQ (0,20 ng/mL) ⁽²⁾	<LOQ (0,20 ng/mL) ⁽²⁾	<LOQ (0,20 ng/mL) ⁽²⁾
Potência Relativa in vivo	SCP-285	80 – 120%	100%	97%	96%

FIG. 17B

¹ NCH Lote AAV9SMN0613 Fase 1 foi fabricado antes d “Limite de Teste Proposto” atual para o título genômico por ddPCR. O valor do título genômico para esse lote foi restabelecido em agosto de 2017 usando SOP-137 aperfeiçoada (v3).

² Diferenças no Título Genômico resultante entre os lotes do Processo A e o Processo B são devidas a diferentes concentrações de fabricação. Lote NCH AAV9SMN0613 foi originalmente formulado em uma concentração de título alvo menor determinada agora como sendo $1,0 \times 10^{13}$ vg/ml pelo ensaio de ddPCR usado atualmente (SOP-137), enquanto que os Lotes 600156 e 600307 foram formulados em uma concentração de título alvo de $4,0 \times 10^{13}$ vg/ml quando medida pelo mesmo método (SOP-137).

³ Resultado ajustado para $1,0 \times 10^{13}$ vg/ml para permitir as especificações apropriadas através de uma faixa de concentrações aceitáveis entre $2,0 \times 10^{13}$ vg/ml a $6,0 \times 10^{13}$ vg/ml. Valores reais foram multiplicados pelos seguintes fatores para fornecer valores para $1,0 \times 10^{13}$ vg/ml: 1/1,06 (Lote NCH AAV9SMN0613: 1/3,7 (Lote 600156) e 1/4,0 (Lote 600307).

⁴ Diferenças na aparência entre o Processo A e o Processo B são devidas a diferentes concentrações do vetor (título genômico). Lote NCH AAV9SMN0613 tem uma concentração de vetor significativamente menor do que dos lotes do Processo B. Como resultado, o Lote NCH AAV9SMN0613 é mais diluído levando a uma solução mais clara e incolor enquanto que as observações de incolor para levemente opaco para os lotes do Processo B resulta de uma concentração próxima de 4 vezes a concentração de partículas virais em solução por mL.

⁵ Resultado real não ajustado para os resultados de $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL estão abaixo de LOQ dos respectivos métodos.

⁶ Lote NCH AAV9SMN0613 é designado como o Padrão de Referência inicial da potência para SOP-285 com o valor da potência designada de 100%. Todos os resultados gerados usando SOP-285 v5.

FIG. 17B cont.

Descrição do Teste	Limites Propostos do Teste	Comparação Pareada		
		Processo A (Fase 1)	Processo B (Fase 3)	% Diferença Relativa
Título Genômico por ddPCR	$2,0 \times 10^{13}$ vg/ml a $6,0 \times 10^{13}$ vg/ml	$1,1 \times 10^{13}$ vg/ml	$3,7 \times 10^{13}$ vg/ml	NA ⁽¹⁾
Título infeccioso	Resultados Reportados	$0,58 \times 10^{12}$ IU/ml	$1,3 \times 10^{12}$ IU/ml	120% ⁽²⁾
Partículas subvisíveis $\geq 10\mu\text{m}$	≤ 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$	22	119	441% ⁽³⁾
Partículas subvisíveis $\geq 25\mu\text{m}$	≤ 500 partículas $\geq 25\mu\text{m}$	4	4	0%
pH	7,5 – 8,5	7,9	7,9	0%
Osmolalidade	384 – 448 mOsm/kg	410 mOsm/kg	415 mOsm/kg	1%
Aparência	Solução clara a levemente opaca, incolor a quase branca sem partículas visíveis	Solução clara e incolor sem partículas visíveis	Solução quase branca, levemente opaca sem partículas visíveis ⁽⁴⁾	NA
Total Proteína por BCA	128-320 µg/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/ml	167 µg/mL	179 µg/mL	7%
hcDNA Residual por qPCR	$\leq 1,2 \times 10^6$ pg/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL	$3,7 \times 10^6$ pg/mL	$0,76 \times 10^6$ pg/mL	80%
% Capsídeo Vazio por AUC	$\leq 7\%$	7%	2%	71% ⁽²⁾
Pureza por SDS-PAGE	$\geq 95\%$	98%	99%	1%
Impurezas Totais por SDS-PAGE	$\leq 5\%$	2%	1%	50%
HCP Residual por ELISA	≤ 40 ng/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL	<LOQ (8 ng/mL)	<LOQ (8 ng/mL)	0%
BSA Residual por ELISA	$\leq 3,0$ ng/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL	<LOQ (0,50 ng/mL)	<LOQ (0,50 ng/mL)	0%
Benzonase Residual por ELISA	$\leq 1,0$ ng/mL por $1,0 \times 10^{13}$ vg/mL	<LOQ (0,52 ng/mL)	<LOQ (0,20 ng/mL)	0%
Potência Relativa in vivo	80-120%	100%	97%	3%

¹ % Diferença Relativa não aplicável já que a meta de fabricação para o título genômico foi alterada entre o Processo A e Processo B.

² Esse valor deve ser visualizado no contexto da variabilidade esperada quanto ao ensaio biológico que pode frequentemente variar entre 50% a 200% do valor verdadeiro. Dito isso, AveXis reconheceu a necessidade de melhorar e recentemente realizou o desenvolvimento adicional e o trabalho de qualificação para aperfeiçoar esse ensaio (SOP-328 e RPT-471). Deve ser notado que a eficiência de infectividade da linhagem celular HeLa RC32 pelos vetores virais baseados em AAV permanece desafiadora.

³ % diferença relativa considerável para partículas subvisíveis entre o Processo A e o Processo B é notada; entretanto, o valor absoluto para o Processo B está bem abaixo dos limites de teste propostos.

⁴ Processo B usando gradiente de CsCl é mais eficaz na remoção de capsídeos vazios quando comparado com o Processo A que usou iodixanol.

FIG. 18

Descrição do Teste	Limites Propostos do Teste	Comparação Pareada		
		Processo B (600156)	Processo B (600307)	% Diferença Relativa
Título Genômico por ddPCR	$2,0 \times 10^{12}$ vg/ml a $5,0 \times 10^{12}$ vg/ml	$3,7 \times 10^{12}$ vg/ml	4×10^{12} vg/ml	8%
Título Infeccioso	Resultados Reportados	$1,3 \times 10^{11}$ IU/ml	$0,67 \times 10^{11}$ IU/ml	48%
Partículas subvisíveis $\geq 10\mu\text{m}$	≤ 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$	119	19	92% ⁽¹⁾
Partículas subvisíveis $\geq 25\mu\text{m}$	≤ 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$	4	192	50%
pH	7,5 – 8,5	7,9	8,0	1%
Osmolalidade	384 – 448 mOsm/kg	410 mOsm/kg	415 mOsm/kg	1%
Aparência	Solução clara a levemente opaca, incolor a quase branca sem partículas visíveis	Solução clara e incolor sem partículas visíveis	incolor levemente opaca sem partículas visíveis ⁽²⁾	NA
Total Proteína por BCA	129-320 $\mu\text{g/ml}$ por $1,0 \times 10^{14}$ vg/ml	179 $\mu\text{g/ml}$	176 $\mu\text{g/ml}$	2%
hcDNA Residual por qPCR	$\leq 1,2 \times 10^6$ pg/ml por $1,0 \times 10^{13}$ vg/ml	$0,76 \times 10^6$ pg/mL	$0,68 \times 10^6$ pg/ml	11%
% Capsídeo Vazio por AUC	$\leq 7\%$	2%	4%	100% ⁽¹⁾
Pureza por SDS-PAGE	$\geq 95\%$	99%	99%	0%
Impurezas Totais por SDS-PAGE	$\leq 5\%$	1%	1%	0%
HCP Residual por ELISA	≤ 40 ng/ml por $1,0 \times 10^{12}$ vg/ml	<LOQ (8 ng/mL)	<LOQ (8 ng/mL)	0%
BSA Residual por ELISA	$\leq 3,0$ ng/ml por $1,0 \times 10^{12}$ vg/ml	<LOQ (0,50 ng/mL)	<LOQ (0,50 ng/mL)	0%
Benzonase Residual por ELISA	$\leq 1,0$ ng/ml por $1,0 \times 10^{12}$ vg/ml	<LOQ (0,20 ng/mL)	<LOQ (0,20 ng/mL)	0%
Potência Relativa in vivo	80-120%	97%	96%	1%

¹ %diferença relativa para partículas subvisíveis e % Capsídeos Vazios é de ~100% entre os dois lotes do Processo B; todos os valores estão bem abaixo dos limites de teste propostos e os lotes do Processo B são considerados como consistentes com relação a esses resultados de teste.

FIG. 19

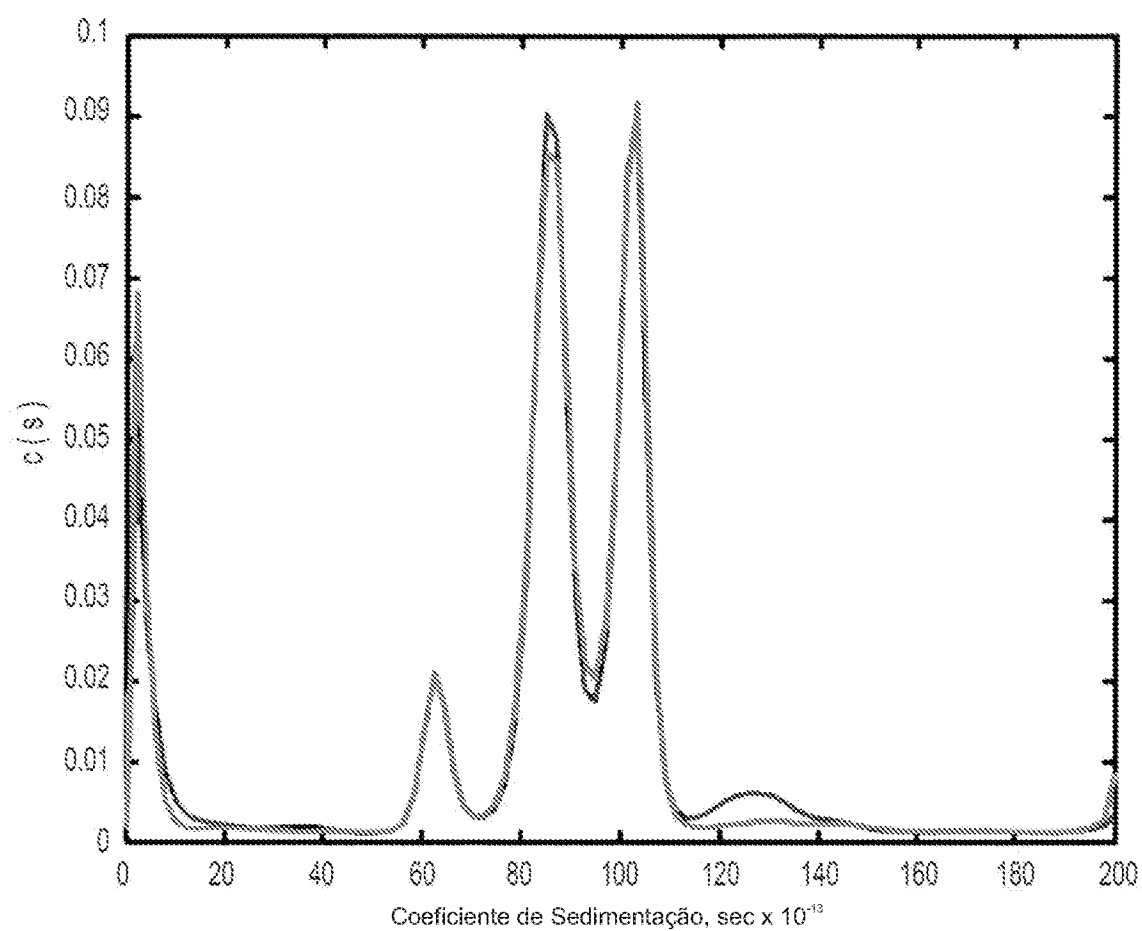
Atributo	Método	Ponto de Tempo da Estabilidade (mes)				
		0	3	6	9	12
		Fevereiro 2017	Maio 2017	Agosto 2017	Novembro 2017	Fevereiro 2018
Título Genômico por ddPCR	SOP-137 v1.0	$6,6 \times 10^{12}$ vg/mL	$6,1 \times 10^{12}$ vg/mL	$6,5 \times 10^{12}$ vg/mL	NA	NA
	SOP-137 v3.0	NA	NA	$1,1 \times 10^{13}$ vg/mL ⁽¹⁾	$8,7 \times 10^{12}$ vg/mL	Meta 26Fev2018
Potência Relativa in vivo ⁽²⁾	SOP-285	100%	92%	95%	101%	Pendente
Título Infeccioso	SOP-192	$6,3 \times 10^8$ IU/mL	$8,4 \times 10^8$ IU/mL ⁽³⁾	$1,1 \times 10^{10}$ IU/mL	$6,3 \times 10^8$ IU/mL	Pendente
Pureza por SDS-PAGE	SOP-180	%Pureza Total: 98% (n=4 géis) % Impureza Total: 2% (n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> Imp 1: 1,7% Imp 3: <LOQ (1,0%)	Pureza Total: 98% (n=4 géis) % Impureza Total: 2% (n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> Imp 1: 1,7% Imp 3: <LOQ (1,0%)	Pureza Total: 99% (n=4 géis) % Impureza Total: 1% (n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> Imp 1: 1,2%	Pureza Total: 99% (n=4 géis) % Impureza Total: 1% (n=4 géis) <u>Impurezas Individuais</u> Imp 1: 1,3%	Pendente

¹ Lote foi testado novamente usando um método aperfeiçoado, SOP-137 v3.0 por CAPA-19 em torno do ponto de tempo do mês 6. Como resultado, um novo valor do título de $1,1 \times 10^{13}$ vg/mL foi designado novamente para NCH Lote NCHAAV95MN0613. Todos os pontos de tempo de estabilidade subsequentes foram analisados usando SOP-137 v3.0.

² Lote NCHAAV95SMN0613 foi fabricado em Dezembro de 2013 e foi testado em Fevereiro de 2017 como T0. Uma potência de 100% foi designada como T0 e as potências para todos os pontos de tempo subsequentes foram calculados em relação ao valor de T0.

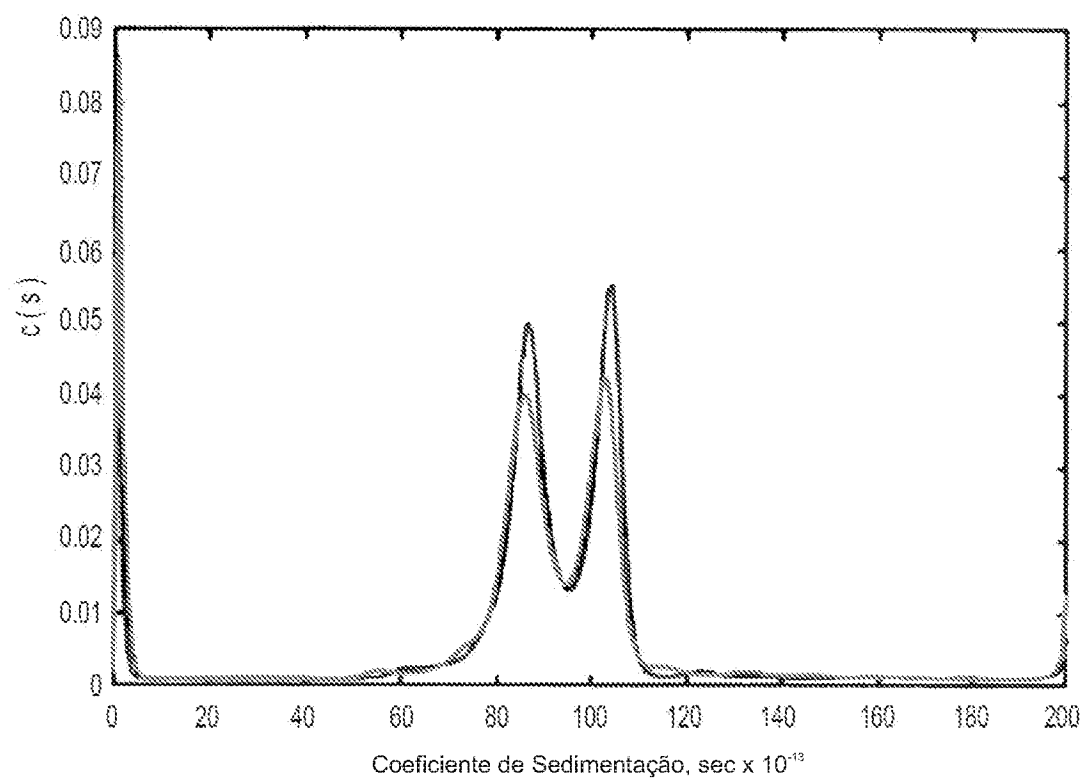
³ Teste para o Título Infeccioso foi realizado aproximadamente 4 meses depois de T0 e como tal foi adicionado ao respectivo protocolo de estabilidade em Junho de 2017.

FIG. 20



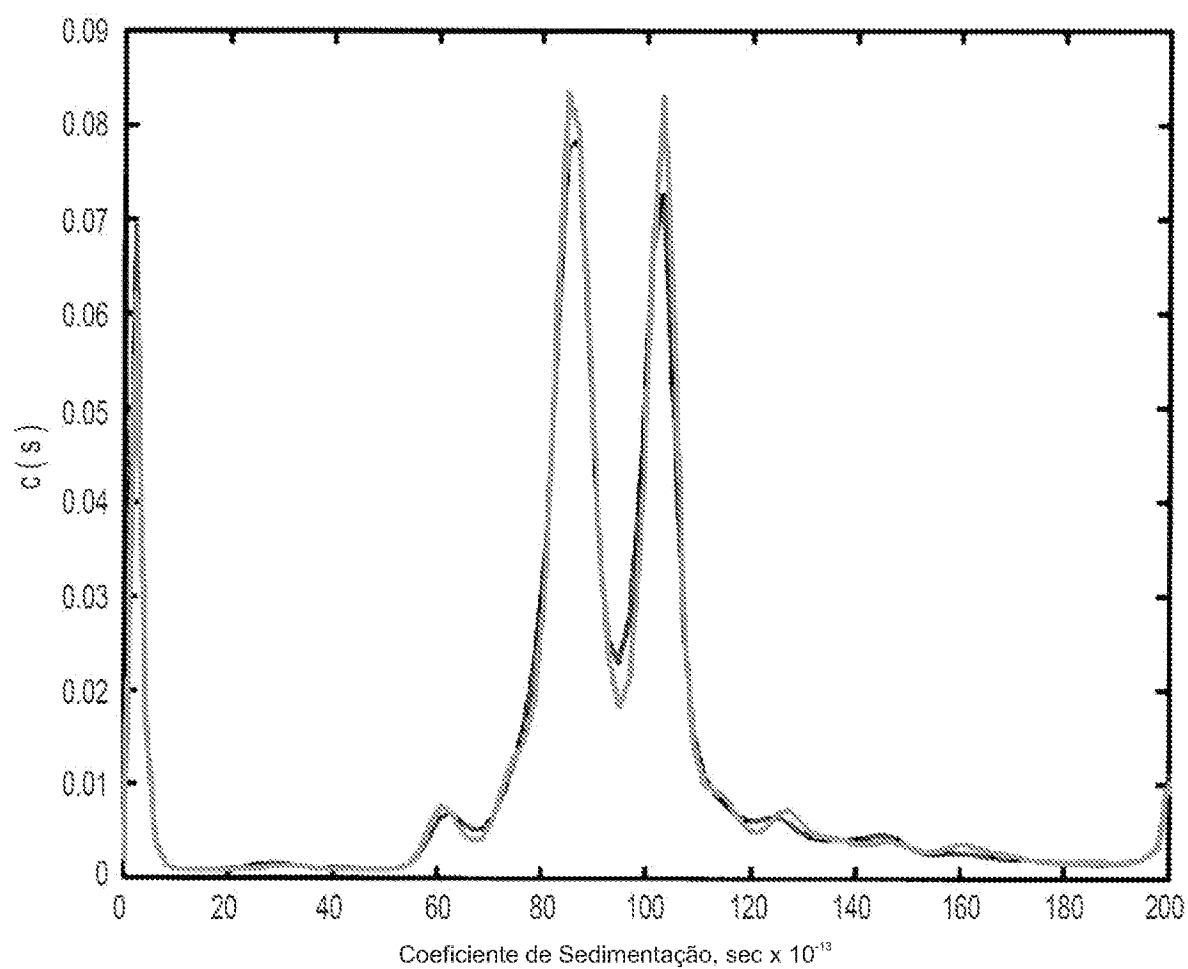
NCHAAV SMN0613	Pico vazio			Pico cheio 1			Pico cheio 2		
	s-valor	% de área	MW (MDa)	s-valor	% de área	MW (MDa)	s-valor	% de área	MW (MDa)
Rep 1 (Vermelho)	62.58	8.53	1.97	85.23	47.76	3.11	101.76	37.20	4.01
Rep 2 (Azul)	62.50	8.39	2.36	85.33	49.14	3.77	101.94	39.36	4.85
Média	62.54	8.46	2.17	85.28	48.45	3.44	101.85	38.28	4.43

FIG. 21



600156	Pico vazio			Pico cheio 1			Pico cheio 2		
	s-valor	% de área	MW (MDa)	s-valor	% de área	MW (MDa)	s-valor	% de área	MW (MDa)
Rep 1 (Vermelho)	61.80	1.29	2.77	86.74	54.23	4.62	104.12	43.72	6.06
Rep 2 (Azul)	55.52	1.83	2.97	85.89	54.95	5.55	102.86	41.80	7.31
Média	58.66	1.56	2.87	86.32	54.59	5.09	103.49	42.76	6.69

FIG. 22



600307	Pico vazio			Pico cheio 1			Pico cheio 2		
	s-valor	% de área	MW (MDa)	s-valor	% de área	MW (MDa)	s-valor	% de área	MW (MDa)
Rep 1 (Vermelho)	62.12	3.68	3.32	85.51	52.18	5.30	101.91	38.46	7.11
Rep 2 (Azul)	60.83	3.78	2.86	85.14	53.43	4.63	102.33	36.62	6.24
Média	61.48	3.73	3.09	85.33	52.81	4.97	102.12	37.54	6.68

FIG. 23

RESUMO

Patente de Invenção: **"MEIOS E MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE VETORES VIRAIS E USOS DOS MESMOS"**.

São fornecidos métodos para a preparação e purificação de partículas virais e composições e usos que compreendem as mesmas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P240867.TXT
- Data de Geração do Código: 26/06/2019
- Hora de Geração do Código: 14:40:06
- Código de Controle:
 - Campo 1: 33FA94A9EDCD8963
 - Campo 2: B3A366DC0095E490