

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292412** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.07

(51) Int. Cl. *C12N 15/10* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.19

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С
ПРИМЕНЕНИЕМ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ/ДИАФИЛЬТРАЦИИ**

(31) 62/979,687

(32) 2020.02.21

(33) US

(86) PCT/US2021/018856

(87) WO 2021/168306 2021.08.26

(71) Заявитель:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Гронке Роберт С., Иммел-Браун
Джонас П., Говиндан Гита (US)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)

(57) В изобретении описаны способы получения композиций, содержащих олигонуклеотиды. Способы по настоящему изобретению включают проведение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) водного раствора олигонуклеотида с образованием ретентата, содержащего олигонуклеотид, причем ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят с применением водного буферного раствора, содержащего одну или более солей. Также в данном документе описаны композиции, содержащие олигонуклеотиды, полученные с помощью этих способов.

202292412

A1

A1

202292412

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ/ДИАФИЛЬТРАЦИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

В данной заявке испрашивается приоритет по дате подачи в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) предварительной заявки США № 62/979687, поданной 21 февраля 2020 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Эта заявка относится к биофармацевтической технологии в целом и, более конкретно, к способам приготовления композиций олигонуклеотидов высокой чистоты с использованием способов фильтрации, позволяющих регулировать содержание солей в композициях олигонуклеотидов. Способы по данному изобретению успешно связывают применение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с лиофилизацией таким образом, чтобы избежать необходимости выполнения дополнительных стадий обработки, которые обычно используются при производстве лиофилизированных (твердых) активных фармацевтических ингредиентов (АФИ).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Олигонуклеотиды представляют собой короткие олигомеры ДНК или РНК, которые могут быть химически синтезированы для исследовательских и медицинских целей. Олигонуклеотиды, как правило, получают путем последовательного добавления нуклеотидных остатков для получения специфической последовательности. После завершения синтеза олигонуклеотида в желаемой последовательности целевой олигонуклеотид, как правило, получают в виде смеси вместе с неудачными последовательностями и другими примесями, связанными с процессом и продуктом.

Получение олигонуклеотидов для терапевтического применения, таких как коммерческие олигонуклеотиды, одобренные для использования FDA, дополнительно осложняется строгими коммерческими спецификациями и требованиями к валидации лекарственных средств. Подходящие методы очистки и получения терапевтических олигонуклеотидов должны учитывать химический состав и стабильность продукта, а также способ введения.

Терапевтические олигонуклеотиды, как правило, получают с применением либо процесса на платформе с водной основой, либо процесса на платформе с лиофилизированной АФИ, в зависимости от формы требуемого лекарственного препарата. Лиофилизированный (твердый) лекарственный препарат потенциально предпочтительнее жидкого лекарственного препарата для некоторых продуктов из-за профилей стабильности, простоты хранения и простоты обработки.

Спинраза® (нусинерсен) представляет собой препарат на основе антисмыслового олигонуклеотида (АСО), используемый для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА), редкого нервно-мышечного заболевания. Коммерческий лекарственный препарат Спинраза® представляет собой лиофилизированный АФИ, полученный в процессе с интенсивным применением растворителей. Существует необходимость интегрировать процесс на платформе с водной основой, который заканчивается получением жидкой

лекарственной субстанции, полученной с помощью ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ), с лиофилизированным АФИ с определенным содержанием соли (например, натрия и ацетата). Этот подход сведет к минимуму валидацию лекарственного препарата и будет соответствовать существующим коммерческим спецификациям без необходимости добавления каких-либо неплатформенных стадий уменьшения объема жидкости и/или оборудования.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В этом изобретении описаны способы применения ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) для концентрирования и замены буфера для олигонуклеотидов с целью получения водных растворов олигонуклеотидов, пригодных для лиофилизации, без дополнительных (промежуточных) стадий обработки. На Фиг. 1 показано, как способы по данному изобретению позволяют интегрировать процесс на платформе с водной основой с применением УФ/ДФ с процессом на платформе с лиофилизированным АФИ таким образом, что устраняется необходимость проведения осаждения на основе растворителя, которое, как правило, предшествует стадии лиофилизации.

В частности, способы, описанные в данном документе, могут регулировать содержание натрия до и после лиофилизации, а также содержание ацетата после лиофилизации в олигонуклеотидном АФИ, чтобы соответствовать заранее определенным техническим требованиям по содержанию натрия и ацетата. Это достигается путем регуляции компонентов (например, солей) в водном буферном растворе для УФ/ДФ. Описанные в данном документе способы также могут регулировать поток пермеата и концентрацию ретентата олигонуклеотида при выполнении стадии УФ/ДФ в рекомендуемых производителем условиях трансмембранного давления (TMP).

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения композиции, содержащей олигонуклеотид, где указанный способ включает проведение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) водного раствора олигонуклеотида с образованием ретентата, содержащего олигонуклеотид, и где ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят с применением водного буферного раствора, содержащего одну или более солей.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композициям, содержащим олигонуклеотид, при этом композиции получают одним из описанных в данном документе способов.

В некоторых вариантах осуществления композиция находится в форме водного раствора, содержащего олигонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления композиция находится в форме лиофилизованной композиции, содержащей олигонуклеотид.

Дополнительные объекты, преимущества и другие особенности настоящего изобретения будут частично изложены в последующем описании, а частично станут очевидными для специалистов в данной области техники, при изучении нижеследующего или могут быть получены из практики настоящего изобретения. Преимущества настоящего изобретения могут быть реализованы и получены, как конкретно указано в прилагаемой формуле изобретения. Как будет понятно, для настоящего изобретения допускаются другие и различные варианты его осуществления, и некоторые его детали допускают модификации в различных очевидных отношениях, все из которых не будут отклоняться от сути настоящего изобретения. В этом отношении приведенное в данном документе описание следует понимать как иллюстративное по своей природе, а не как ограничивающее.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** изображен пример интеграции процесса с интенсивным применением растворителя с процессом на водной основе по настоящему изобретению.

На **Фиг. 2** представлен график, иллюстрирующий снижение потока пермеата во время замены буфера, когда УФ/ДФ выполняют при различных концентрациях ацетата аммония.

На **Фиг. 3** представлен график, иллюстрирующий влияние буфера для ДФ на поток пермеата во втором равновесном состоянии при увеличении проводимости буфера для ДФ.

На **Фиг. 4** представлен график, иллюстрирующий максимальную концентрацию АСО в ретентате по сравнению с общей концентрацией ацетатных солей в буфере для УФ/ДФ.

На **Фиг. 5** представлен график, иллюстрирующий тенденции изменения содержания натрия и аммония после лиофилизации (после лиоф.).

На **Фиг. 6** представлен график, иллюстрирующий содержание натрия (Na) в ретентате после УФ/ДФ в зависимости от процентного содержания (%) ацетата натрия (NaOAc) в буферах для УФ, содержащих различное количество ацетата аммония (NH₄OAc).

На **Фиг. 7** приведено изображение типичной камеры лиофилизатора с лотками LyoGuard.

На **Фиг. 8** представлено изображение иллюстративного лиофилизованного материала АСО в лотке и пакете.

На **Фиг. 9** представлен график, иллюстрирующий снижение потока пермеата по мере увеличения концентрации олигонуклеотида в ретентате при проведении УФ/ДФ в воде.

На **Фиг. 10** представлен график, иллюстрирующий процент (%) по массе ацетата (OAc), оставшегося в твердом АФИ, в зависимости от общей концентрации ацетата (OAc) в буфере для УФ.

На **Фиг. 11** показано сравнение иллюстративного процесса на платформе с водной основой и иллюстративного процесса на платформе с лиофилизированным АФИ, включающего стадию осаждения этанолом.

На **Фиг. 12** показано, как ионы натрия (Na⁺) и ионы аммония (NH₄⁺) могут занимать различные положения противоионов вдоль отрицательно заряженного тифосфатного олигонуклеотидного остова.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны способы, которые интегрируют применение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) в процесс на платформе с лиофилизированным АФИ, который традиционно используется для получения твердой формы олигонуклеотидных активных фармацевтических ингредиентов (АФИ). Варианты осуществления этого изобретения включают способы получения олигонуклеотидов для терапевтического применения, таких как антисмысловой олигонуклеотид Спинразы® (нусинерсен).

Процесс на платформе с водной основой, как правило, включает одну или две стадии хроматографического разделения, стадию снятия защиты и завершающую стадию ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ), в которой концентрируется представляющий интерес олигонуклеотид и выполняется замена буфера на жидкий состав, пригодный для интратекального введения (и/т). Эта платформа обеспечивает доставку жидкой лекарственной субстанции из процедуры УФ/ДФ в установку заполнения парентеральных растворов для окончательного разбавления, фильтрации и наполнения. Напротив, в процессе на платформе с лиофилизированным АФИ часто используется процесс очистки на основе растворителей. На Фиг. 11 показаны различия между процессом на платформе с водной основой, используемым для приготовления готовой к розливу жидкой формы Спинразы® (нусинерсен), и процессом на платформе с лиофилизированным АФИ, используемого для приготовления лиофилизованной (твердой) формы этого продукта. Как показано на Фиг. 11, процесс на платформе с водной основой для Спинразы® включает стадию ионообменной хроматографии, за которой следует стадия ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) для получения готовой к розливу жидкой формы Спинразы® (нусинерсен). Напротив, процесс на платформе с лиофилизированным АФИ включает стадию осаждения этанолом, за которой следует лиофилизация и смешивание для получения лиофилизованной (твердой) формы лекарственного препарата.

Было бы целесообразно модифицировать процесс на платформе с лиофилизированным АФИ, который в настоящее время используется для получения коммерческого продукта Спинразы® (нусинерсен), заменив стадию осаждения этанолом на стадию УФ/ДФ, используемую в процессе на платформе с водной основой. Во-первых, как по экологическим, так и по нормативным причинам было бы выгодно отказаться от применения органических растворителей при окончательном приготовлении этого коммерческого продукта. Во-вторых, поскольку УФ/ДФ, как правило, можно использовать для точной регуляции содержания солей в подвергаемом обработке продукте, больший контроль над содержанием солей может быть достигнут при использовании УФ/ДФ вместо осаждения растворителем. Однако, как поясняется ниже, из-за практических ограничений УФ/ДФ и крупномасштабной лиофилизации ранее было невозможно успешно интегрировать эти процессы в промышленное приготовление Спинразы® без включения дополнительных стадий.

Сложность интеграции УФ/ДФ в крупномасштабную лиофилизацию возникает в основном из-за присутствия солей и/или олигонуклеотидов в водном ретентате, который получается в результате УФ/ДФ. Принимая во внимание, что Спинразы® (нусинерсен) должна иметь относительно низкое содержание солей, в том числе содержание натрия около 5% по весу в лиофилизованном продукте, при попытке провести УФ/ДФ с водным раствором, имеющим такое низкое содержание соли (и низкую проводимость) приводит к низкому потоку пермеата через мембрану. Этот низкий поток пермеата возникает отчасти из-за нежелательного «слеживания», которое образуется на ретентатной стороне мембраны для УФ/ДФ. Низкий поток пермеата приводит как к снижению скорости получения желаемого олигонуклеотида, так и к снижению концентрации олигонуклеотида в ретентате. Для успешного процесса УФ/ДФ и достижения концентраций АСО, идеально подходящих для лиофилизации, требуется минимальная проводимость буфера для УФ/ДФ. С

другой стороны, если содержание соли в буфере для УФ/ДФ увеличить до уровня, необходимого для обеспечения достаточно высокой скорости потока пермеата (что приводит к достаточно высокой концентрации олигонуклеотида в ретентате), то полученный ретентат будет содержать слишком много соли, что будет требовать дополнительных стадий для удаления нежелательных солей.

С помощью способов по настоящему изобретению эти трудности успешно преодолеваются путем регуляции концентрации соли и содержания соли в буферном растворе. В способах объединяют процесс очистки с водными растворами со стадией лиофилизации для создания твердого АФИ с заранее определенным техническим требованиям по содержанию натрия и ацетата, без добавления дополнительных стадий и/или оборудования. Успех процесса УФ/ДФ определяется как производительностью процедуры УФ/ДФ (поток и концентрация), так и составом твердого АФИ после обработки продукта после УФ/ДФ методом лиофилизации. Был разработан процесс УФ/ДФ, в котором промежуточный продукт процесса очистки, который содержит не только целевой олигонуклеотид, но и различные соединения, участвующие в процессе очистки, концентрируется и обрабатывается путем УФ/ДФ таким образом, что после лиофилизации достигается заданное содержание натрия, и после лиофилизации соблюдаются технические требования к содержанию ацетата. Процесс УФ/ДФ по настоящему изобретению обеспечивает контроль общего содержания натрия за счет регуляции среднего числа катионов натрия, занимающих положения протонированных вдоль отрицательно заряженного фосфоротиоатного или фосфородиэфирного олигонуклеотидного остова. Новые способы также способствуют производительности процесса УФ/ДФ, обеспечивая минимальный поток пермеата через мембрану и максимальную концентрацию ретентата, необходимые для крупномасштабных производственных процессов.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в соответствующей области техники. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

Если не указано иное, все проценты, части, соотношения и т. д. даны по массе.

Когда количество, концентрация или другое значение или параметр указаны в виде диапазона или перечня верхних и нижних значений, это следует понимать как конкретное раскрытие всех диапазонов, образованных из любой пары любых верхних и нижних пределов диапазона, независимо от того, раскрыты ли диапазоны отдельно. Если в данном документе указан диапазон числовых значений, если не указано иное, предполагается, что диапазон включает его конечные точки, а также все целые числа и дроби в пределах диапазона. Не предполагается, что объем настоящего изобретения должен ограничиваться конкретными значениями, указанными при определении диапазона.

Использование различных форм имени существительного для описания различных элементов и компонентов в данном документе предназначено только для удобства и для придания общего смысла изобретению. Это описание следует читать как включающее одно или по меньшей мере одно, а единственное число также включает множественное число, если не ясно, что подразумевается иное.

Когда используется указанное количество или значение, следует понимать, что оно охватывает небольшое отклонение от указанного количества или значения, которое специалист в данной области техники понимает как эквивалентное или по существу такое же, как указанное количество или значение. В некоторых вариантах осуществления указанное количество или значение составляет $\pm 10\%$ от указанного количества или значения. В некоторых вариантах осуществления указанное количество или значение составляет $\pm 5\%$ от указанного количества или значения.

Один аспект настоящего изобретения относится к способам приготовления композиций, содержащих олигонуклеотиды, такие как Спинраза® (нусинерсен). Способы включают проведение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) водного раствора олигонуклеотида с образованием ретентата, содержащего олигонуклеотид, причем ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят с применением водного буферного раствора, содержащего одну или более солей.

В некоторых вариантах осуществления одна или более солей в водном буферном растворе могут быть составлены таким образом, чтобы в конечном итоге регулировать состав ретентата. Например, в некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор может быть составлен таким образом, чтобы регулировать содержание натрия в ретентате, полученном с помощью УФ/ДФ, тем самым косвенно регулируя содержание натрия в лиофилизированном продукте. Такой контроль возможен за счет присутствия множества солей в водном буферном растворе, включая соль натрия и конкурирующую соль, имеющую катион, отличный от катиона натрия. Конкурирующие соли включают, например, соли с различными катионами, такими как аммоний, диметиламмоний, триметиламмоний, калий, литий, рубидий, медь, серебро или другие подходящие одновалентные катионы. Конкурирующая соль может быть летучей солью, нелетучей солью или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления применение по меньшей мере одной конкурирующей соли позволяет с помощью способов по настоящему изобретению регулировать среднее количество катионов натрия, занимающих положения противоионов олигонуклеотидного остова. На Фиг. 12 показано, как ионы натрия (Na^+) и ионы аммония (NH_4^+) могут занимать различные положения противоионов вдоль отрицательно заряженного тиофосфатного или фосфодиэфирного олигонуклеотидного остова. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы регуляции содержания натрия в олигонуклеотидном ретентате, полученном с помощью УФ/ДФ, путем введения одной из более конкурирующих солей в водный буферный раствор. Другими словами, способы по настоящему изобретению включают проведение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) водного раствора олигонуклеотида с образованием ретентата, содержащего олигонуклеотид, причем ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят с применением водного буферного раствора, содержащего соль натрия и конкурирующую соль. В некоторых вариантах осуществления конкурирующая соль представляет собой соль калия. В других вариантах осуществления конкурирующая соль представляет собой соль аммония.

После замены буфера для водного раствора, содержащего как катионы натрия, так и конкурирующие катионы, натрий и конкурирующие катионы достигают равновесия в положениях противоионов на олигонуклеотиде, в результате чего олигонуклеотид в растворе не полностью катионизирован натрием, т. е. положения противоионов олигонуклеотидов не полностью заняты катионами натрия. См. Фиг. 12. Это равновесное соотношение может быть выражено следующим образом:

$$\left(\frac{\text{моль конкурентного катиона}}{\text{моль натрия}} \right) \frac{1}{\text{моль олигонуклеотида}},$$

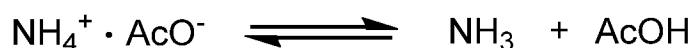
и регулируется молярным отношением конкурирующего катиона(-ов) к катиону натрия в водном буферном растворе, используемом во время процесса УФ/ДФ.

Свойства конкурирующей соли могут влиять не только на состав ретентата после процесса УФ/ДФ, но также могут влиять на конечный состав твердого продукта после лиофилизации. Например, когда конкурирующая соль представляет собой летучую соль, можно снизить общее содержание соли в

лиофилизированном продукте (по отношению к общему содержанию соли в ретентате), не влияя на содержание натрия.

В некоторых вариантах осуществления одна или более солей, содержащихся в водном буферном растворе, могут включать по меньшей мере одну летучую соль. Способы УФ/ДФ по настоящему изобретению, в которых используются летучие соли, могут обеспечить максимальную концентрацию АСО в растворах ретентата с желаемым содержанием натрия. Применение конкурирующих летучих солей для снижения общего содержания солей в лиофилизированном продукте (по отношению к общему содержанию солей ретентата) возможно благодаря кислотно-основным свойствам летучих солей. В конкурирующей летучей соли катион конкурирующей летучей соли находится в равновесии с соответствующим летучим сопряженным основанием. Летучесть конкурирующих катионных молекул (в их нейтральной форме с соответствующим сопряженным основанием) позволяет удалять их путем сублимации во время лиофилизации.

Ацетат аммония (NH_4OAc) является примером конкурирующей летучей соли, используемой в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. Как показано ниже, катион аммония (NH_4^+) находится в равновесии с аммонием (NH_3), а анион ацетат (AcO^-) находится в равновесии с уксусной кислотой (AcOH).



В равновесии, показанном выше, протонированный катион аммония служит источником протонов для превращения аниона ацетата в уксусную кислоту, которая является летучей и может быть удалена путем лиофилизации. Перенос протона от аммония к ацетату делает оба вещества нейтральными и летучими, что облегчает удаление обоих веществ во время лиофилизации.

Другие иллюстративные конкурирующие летучие соли включают, например, аммониевые соли муравьиной кислоты, пропионовой кислоты, масляной кислоты, молочной кислоты и угольной кислоты.

При использовании летучей конкурирующей соли, такой как показанный выше ацетат аммония, последующую лиофилизацию ретентата после УФ/ДФ можно проводить таким образом, чтобы удалить значительные количества конкурирующей летучей соли, сохраняя при этом содержание натрия в ретентате. Таким образом, за счет применения конкурирующей летучей соли можно получить лиофилизированную композицию олигонуклеотидов, имеющую содержание натрия, регулируемое исходя из состава водного буферного раствора, а также имеющую общее содержание соли, которое значительно меньше, чем общее содержание соли в ретентате после УФ/ДФ. Благодаря этому, способы по настоящему изобретению могут обеспечивать получение твердых олигонуклеотидных АФИ с заранее заданным содержанием натрия при удалении конкурирующей соли до следовых количеств.

В некоторых вариантах осуществления конкурирующая соль может быть нелетучей солью, которую не удаляют путем лиофилизации. Например, водный буферный раствор может включать соль натрия, такую как ацетат натрия, хлорид натрия, бромид натрия или йодид натрия, и нелетучую конкурирующую соль, такую как ацетат калия, хлорид калия, бромид калия или йодид калия. Другие конкурирующие нелетучие соли включают, например, соли калия, соли лития (например, ацетат лития, хлорид лития, бромид лития или йодид лития), соли рубидия (например, ацетат рубидия, хлорид рубидия, бромид рубидия или йодид рубидия), соли меди (например, ацетат меди, хлорид меди, бромид меди или йодид меди) и соли серебра (например, ацетат серебра, хлорид серебра, бромид серебра или йодид серебра).

В способах по настоящему изобретению состав водного буферного раствора можно регулировать для достижения широкого диапазона содержания натрия в ретентате после УФ/ДФ и в продукте после лиофилизации — от практически нулевого содержания натрия до содержания натрия, значительно превышающего эквивалент полностью катионизированного натрия АСО.

В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит по меньшей мере одну соль, выбранную из ацетата натрия, ацетата аммония и ацетата калия. В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат аммония. В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат калия. В других вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия, ацетат аммония и ацетат калия.

В некоторых вариантах осуществления содержание натрия (например, концентрацию натрия) в ретентате, содержащем олигонуклеотиды, контролируют путем регулирования доли по меньшей мере одной натриевой соли по отношению к общей концентрации солей в водном буферном растворе. В других вариантах осуществления долю катионов натрия, занимающих положения противоионов олигонуклеотида в ретентате, контролируют путем регуляции доли по меньшей мере одной соли натрия по отношению к общей концентрации солей в водном буферном растворе.

В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соли натрия к конкурирующей соли, содержащейся в водном буферном растворе, составляет от 1:100 до 100:1, или от 1:20 до 20:1, или от 1:10 до 10:1, или от 1:1 до 19:1, или от 5:1 до 19:1, или от 12:1 до 15:1, или от 5:1 до 10:1, или от 5:1 до 6:1 или от 5:1 до 6:1,8.

В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат аммония, и молярное отношение ацетата натрия к ацетату аммония в водном буферном растворе составляет от 1:100 до 100:1, или от 1:20 до 20:1, или от 1:10 до 10:1, или от 1:1 до 19:1, или от 5:1 до 19:1, или от 12:1 до 15:1, или от 5:1 до 10:1, или от 5:1 до 6:1 или от 5:1 до 6:1,8. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение ацетата натрия к ацетату аммония составляет 17:3. В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит 34 мМ ацетата натрия и 6 мМ ацетата аммония.

В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат калия, и молярное отношение ацетата натрия к ацетату калия в водном буферном растворе составляет от 1:100 до 100:1, или от 1:20 до 20:1, или от 1:10 до 10:1, или от 1:1 до 19:1, или от 5:1 до 19:1, или от 12:1 до 15:1, или от 5:1 до 10:1, или от 5:1 до 6:1 или от 5:1 до 6:1,8. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение ацетата натрия к ацетату калия составляет 17:3. В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит 34 мМ ацетата натрия и 6 мМ ацетата калия.

В некоторых вариантах рН водного буферного раствора составляет от 4,0 до 10,0, или от 4,5 до 9,5, или от 5,0 до 9,0, или от 5,0 до 8,5, или от 5,0 до 8,0, или от 5,5 до 9,0, или от 5,5 до 8,5, или от 5,5 до 8,0, или от 5,5 до 7,5, или от 6,0 до 9,0, или от 6,0 до 8,5, или от 6,0 до 7,5, или от 6,0 до 7,0, или от 6,5 до 9,0, или от 6,5 до 8,5 или от 6,5 до 8,0, или от 6,5 до 7,5, или от 6,9 до 7,5.

В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор не содержит соли натрия, так что ретентат после УФ/ДФ не содержит натрия. В других вариантах осуществления водный буферный раствор не содержит конкурирующую соль.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать стадию лиофилизации ретентата УФ/ДФ для получения лиофилизированных композиций, содержащих целевой олигонуклеотид. В результате лиофилизации могут быть удалены летучие компоненты буфера для УФ/ДФ (например, конкурирующая летучая соль, такая как ацетат аммония). Стадию лиофилизации можно проводить

как одну лиофилизацию или как множество лиофилизаций, происходящих в одном аппарате для лиофилизации или в нескольких аппаратах для лиофилизации.

В некоторых вариантах осуществления доля одной или более конкурирующих солей, содержащихся в лиофилизированной композиции, меньше, чем доля одной или более конкурирующих солей, содержащихся в ретентате после УФ/ДФ. Например, как объяснялось выше, конкурирующие летучие соли, такие как ацетат аммония, в водном буферном растворе могут быть впоследствии удалены (частично или полностью) во время лиофилизации.

Способы по настоящему изобретению могут также включать стадию регулирования рН ретентата после УФ/ДФ перед проведением лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления рН ретентата доводят до рН в диапазоне от 5,0 до 9,0, или от 5,0 до 8,5, или от 5,0 до 8,0, или от 5,5 до 9,0, или от 5,5 до 8,5, или от 5,5 до 8,0, или от 5,5 до 7,5, или от 6,0 до 9,0, или от 6,0 до 8,5, или от 6,0 до 7,5, или от 6,0 до 7,0, или от 6,5 до 9,0, или от 6,5 до 8,5, или от 6,5 до 8,0 или от 6,5 до 7,5. В одном варианте осуществления рН ретентата доводят до рН в диапазоне от 6,9 до 7,5.

Способы по настоящему изобретению позволяют с большой точностью регулировать долю натрия, содержащегося в лиофилизированных композициях. В некоторых вариантах весовой процент натрия в лиофилизированной композиции находится в диапазоне от 0% до 100%, или от 0% до 50%, или от 1% до 25%, или от 1% до 10%, или от 2% до 10%, или от 1% до 5%, или от 5% до 10%, или от 4,3% до 6,1%, или от 4,8% до 5,4%, или от 4,9% до 5,0% по отношению к общей массе лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления весовой процент натрия в лиофилизированной композиции составляет $5,2\% \pm 0,9\%$. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой нусинерсен, и весовой процент натрия в лиофилизированной композиции нусинерсена составляет $5,2\% \pm 0,9\%$.

Для способов по настоящему изобретению концентрацию олигонуклеотида в ретентате после УФ/ДФ можно регулировать косвенно, регулируя общую концентрацию солей (и, следовательно, проводимость) в водном буферном растворе. Хотя проведение УФ/ДФ с применением деионизированной воды позволит сохранить содержание натрия в полностью катионизированном натрием АСО, проведение УФ/ДФ олигонуклеотидов в чистой воде, которую можно напрямую лиофилизировать, невозможно из-за ограничений потока пермеата и максимальной концентрации ретентата. Было обнаружено, что обработка УФ/ДФ олигонуклеотидов в воде ограничена явлениями гелеобразования на поверхности мембраны или концентрационной поляризации, что приводит к уменьшению потока пермеата через мембрану и создает максимально достижимую концентрацию ретентата в пределах 30-40 г/л.

Было обнаружено, что для успешного процесса УФ/ДФ и достижения концентраций АСО, идеально подходящих для лиофилизации (т. е. не менее 50 г/л), в буфере для УФ/ДФ необходима минимальная концентрация соли (и проводимость). Влияние концентрации соли и проводимости на поток пермеата показано на Фиг. 2 и 3. Как показано в исследовании из Фиг. 2, когда была проведена серия процессов УФ/ДФ с использованием различных концентраций ацетата аммония, наблюдалось резкое снижение потока пермеата при использовании более низких концентраций ацетата аммония, и поток пермеата еще более резко снижался по мере увеличения количества диаобъемов УФ/ДФ. Как показано на Фиг. 3. Общая концентрация солей пропорциональна потоку пермеата через мембрану при данном TMP.

На основании этого наблюдения было обнаружено, что общую концентрацию соли в водном буферном растворе можно использовать для регулирования потока пермеата в процессе УФ/ДФ и концентрации олигонуклеотида в ретентате после УФ/ДФ. Как показано в исследовании из Фиг. 4, было обнаружено, что конечную концентрацию АСО в ретентате можно увеличить, увеличив концентрацию

ацетатных солей в водном буферном растворе. Поскольку увеличение общей концентрации соли в водном буферном растворе приводит к увеличению как потока пермеата, так и максимальной концентрации олигонуклеотида в ретентате, способы по настоящему изобретению можно использовать для достижения желаемого потока пермеата и достаточно высокой концентрации ретентата для обеспечения крупномасштабной лиофилизации без дополнительных стадий (например, удаления растворителя).

В некоторых вариантах осуществления общая концентрация одной или более солей в водном буферном растворе находится в диапазоне от 1 мМ до 500 мМ, или от 10 мМ до 200 мМ, или от 20 мМ до 100 мМ, или от 30 мМ до 60 мМ, или от 35 мМ до 45 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация одной или более солей в водном буферном растворе составляет 40 мМ.

Когда ацетатные соли используются в качестве компонентов водного буферного раствора, может оказаться необходимым удалить эти соли до следовых количеств во время лиофилизации. Как показано в исследовании из Фиг. 10, также было обнаружено, что содержание ацетата в твердом АФИ пропорционально общей концентрации соли (и, следовательно, общей концентрации ацетата) в водном буферном растворе. Таким образом, общее содержание ацетата в буфере для УФ/ДФ можно регулировать, чтобы снизить содержание ацетата в твердом АФИ до следовых уровней. В некоторых вариантах осуществления использование летучих ацетатных солей, таких как ацетат аммония, может дополнительно снизить конечное содержание ацетата благодаря удалению летучих ацетатных солей во время лиофилизации.

В некоторых вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат аммония, а общая концентрация ацетата натрия и ацетата аммония в водном буферном растворе находится в диапазоне от 1 мМ до 500 мМ, или от 10 мМ до 200 мМ, или от 20 мМ до 100 мМ, или от 30 мМ до 60 мМ, или от 35 мМ до 45 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация ацетата натрия и ацетата аммония в водном буферном растворе составляет 40 мМ.

В других вариантах осуществления водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат калия, а общая концентрация ацетата натрия и ацетата калия находится в диапазоне от 1 мМ до 500 мМ, или от 10 мМ до 200 мМ, или от 20 мМ до 100 мМ, или от 30 мМ до 60 мМ или от 35 мМ до 45 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация ацетата натрия и ацетата калия в водном буферном растворе составляет 40 мМ.

В некоторых вариантах осуществления весовой процент ацетата в лиофилизированной композиции составляет менее 5%, или менее 4%, или менее 3%, или менее 2%, или менее 1%, или менее более 0,8%, или менее 0,5%, или менее 0,2% по отношению к общей массе лиофилизированной композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления весовой процент ацетата в лиофилизированной композиции составляет от 5% до 0,1%, или от 5% до 0,5%, или от 5% до 1%, или от 3% до 0,5%, или от 3% до 0,2%, или от 2% до 0,5%, или от 2% до 1%, или от 1% до 0,5%, или от 1% до 0,1%, или от 0,8% до 0,1%, или от 0,5% до 0,1% или от 0,2% до 0,01% по отношению к общей массе лиофилизированной композиции.

Состав и свойства водного буферного раствора можно контролировать, чтобы максимизировать поток пермеата в процессе УФ/ДФ, см. Фиг. 2 и 3. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы регуляции потока пермеата в процессе УФ/ДФ путем регуляции общей концентрации одной или нескольких солей в водном буферном растворе или путем регуляции проводимости водного буферного раствора. В некоторых вариантах осуществления процесс УФ/ДФ проводят с потоком пермеата не менее $1 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$, или по меньшей мере $5 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$, или от $5 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ до $25 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$, или от $5 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ до $20 \text{ ч} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$, или от $5 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ до $15 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$, или от $10 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ до $25 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$, или от $8 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ до $16 \text{ л} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$.

Способы по настоящему изобретению также могут быть осуществлены таким образом, что процесс УФ/ДФ позволяет достичь высоких уровней диаобъема, см. Фиг. 2. Увеличение числа диаобъемов, прошедших через мембрану во время процесса УФ/ДФ, при сохранении приемлемых уровней потока пермеата позволяет способам по настоящему изобретению максимизировать эффективность и производительность всего процесса. В некоторых вариантах осуществления процесс УФ/ДФ проводят при диаобъеме по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или от 3 до 10, или от 5 до 10, или от 5 до 8.

Способы по настоящему изобретению значительно увеличивают концентрацию олигонуклеотида в ретентате после УФ/ДФ, что делает возможной прямую лиофилизацию ретентата после УФ/ДФ без выполнения дополнительной стадии удаления воды (т.е. концентрирования). В некоторых вариантах осуществления концентрация олигонуклеотида в ретентате составляет по меньшей мере 20 г/л, по меньшей мере 30 г/л, по меньшей мере 40 г/л, по меньшей мере 50 г/л или находится в диапазоне от 30 г/л до 150 г/л, или от 50 г/л до 150 г/л, или от 60 г/л до 125 г/л, или от 70 г/л до 125 г/л, или от 70 г/л до 100 г/л, или от 80 г/л до 90 г/л.

В способах по настоящему изобретению можно использовать любую подходящую фильтрующую мембрану для УФ/ДФ, известную в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления процесс УФ/ДФ проводят с использованием мембраны, имеющей порог отсечения по молекулярной массе (MWCO) от 1 кДа до 10 кДа, или от 1 кДа до 7 кДа, или от 1 кДа до 5 кДа, или от 2 кДа до 4 кДа. В некоторых вариантах осуществления мембрана имеет MWCO 3 кДа.

В некоторых вариантах осуществления стадию УФ/ДФ проводят с использованием тангенциальной поточной фильтрации.

Способы по настоящему изобретению могут применяться к любому олигонуклеотиду (таком как антисмысловый олигонуклеотид), содержащему от 10 до 50 нуклеотидов, от 10 до 30 нуклеотидов, от 10 до 25 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов, от 16 до 30 нуклеотидов, от 16 до 25 нуклеотидов или от 16 до 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой нусинерсен. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированная композиция олигонуклеотидов представляет собой Спинраза®.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению не ограничиваются определенными стадиями процесса или ограничиваются исключением определенных стадий процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления способ включает выполнение по меньшей мере одной ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) для получения ретентата, а затем выполнение по меньшей мере одной лиофилизации ретентата для получения лиофилизированной композиции, содержащей олигонуклеотид. В других вариантах осуществления способ состоит из выполнения одной ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) для получения ретентата, а затем выполнения по меньшей мере одной лиофилизации ретентата для получения лиофилизированной композиции, содержащей олигонуклеотид. В других вариантах осуществления способ состоит из выполнения однократной ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) для получения ретентата, а затем выполнения однократной лиофилизации ретентата для получения лиофилизированной композиции, содержащей олигонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут быть выполнены таким образом, что ретентат не подвергается (i) дополнительной фильтрации, (ii) дополнительной замене буфера, (iii) дополнительному концентрированию и/или (iv) дополнительной очистке перед проведением лиофилизации ретентата для получения лиофилизированной композиции. В других вариантах осуществления

способы по настоящему изобретению могут быть выполнены таким образом, что ретентат не подвергается какой-либо из (i) дополнительной фильтрации, (ii) дополнительной замене буфера, (iii) дополнительного концентрирования и (iv) дополнительной очистки перед проведением лиофилизации ретентата с получением лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления ретентат, полученный на стадии УФ/ДФ, лиофилизируют напрямую без каких-либо дополнительных стадий.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композициям, полученным с использованием описанных в данном документе способов. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат олигонуклеотид, такой как Спинраза® (нусинерсен). Композиции по настоящему изобретению могут быть в форме водных растворов, таких как ретентат после УФ/ДФ, содержащий олигонуклеотид, или могут быть в форме твердого или полутвердого материала, такого как лиофилизированная композиция, содержащая олигонуклеотид.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Эксперименты по УФ/ДФ проводили с использованием системы TFF KrosFlo KR2i (Spectrum Labs) и кассеты с регенерированной целлюлозной мембраной Pellicon 3 (0,11 м², 3 кДа). Лиофилизацию в лабораторных масштабах проводили с использованием LyoStar 2, а лиофилизацию в производственных масштабах проводили с использованием LyoStar 3.

ПРИМЕР 1. УФ/ДФ в воде

На Фиг. 9 приведены экспериментальные результаты исследования, проведенного для определения того, как поток пермеата типичного процесса УФ/ДФ с применением чистой воды вместо водного буферного раствора по настоящему изобретению изменяется со временем по мере увеличения концентрации олигонуклеотида в ретентате. В этом исследовании водный раствор, содержащий 10 г/л Спинраза® (нусинерсен), обозначенный как «Альфа-Син» на Фиг. 9, подвергают процессу УФ/ДФ с применением чистой воды, и измеряют как поток пермеата через мембрану, так и концентрацию олигонуклеотида в ретентате в зависимости от времени. Концентрацию олигонуклеотида измеряли с помощью спектроскопии, проведенной до и после процедуры. Поскольку общая масса АСО в системе была известна, концентрации оценивались на основе изменения оставшегося объема.

После замены буфера АСО Альфа-Син на воду был проведен эксперимент по определению максимальной концентрации АСО, которая могла быть достигнута при концентрировании ретентата с использованием буферного раствора, содержащего только воду. Концентрирование с помощью УФ/ДФ осуществляли с применением трансмембранного давления (ТМД), равного 20 фунтов на кв. дюйм, и поперечного потока 1,5 ЛММ (литры/минута/метр²). Стадия концентрирования начиналась с концентрации ретентата 10 г/л и потока пермеата 7 ЛМЧ, и по мере увеличения концентрации ретентата в ходе процесса (и уменьшения объема ретентата) поток пермеата быстро снижался (Фиг. 9). Поток пермеата был снижен до 1 ЛМЧ при концентрации АСО в ретентате приблизительно 32 г/л. Этот эксперимент показал, что концентрирование АСО до высоких концентраций (≥ 50 г/л) с использованием буфера для УФ/ДФ, содержащего только воду, невозможно.

Исследование на Фиг. 9 демонстрирует, что обработка УФ/ДФ олигонуклеотидов в воде ограничена явлениями гелеобразования на поверхности мембраны или концентрационной поляризации, что приводит к значительному снижению потока пермеата через мембрану и создает максимально достижимую

концентрацию ретентата в пределах 30-40 г/л. Поскольку концентрация 30-40 г/л недостаточна для достижения желаемой структуры осадка во время лиофилизации, олигонуклеотид после УФ/ДФ в воде, как правило, подвергают дополнительной единичной процедуре с целью уменьшения объема.

ПРИМЕР 2. Влияние концентрации соли в водном буферном растворе на поток пермеата

Результаты в Примере 1 продемонстрировали, что замена буфера на воду при идеальных концентрациях АФИ невозможна из-за явления гелеобразования на поверхности мембраны или концентрационной поляризации, приводящих к уменьшению потока пермеата через мембрану. Однако было обнаружено, что введение добавок в виде солей в водный буферный раствор может увеличить поток пермеата во время замены буфера. Эксперименты по замене буфера на воду показали, что высокая проводимость коррелирует с высоким потоком пермеата, и что добавление солей к буферу для диафильтрации является эффективным способом увеличения потока пермеата.

Ацетат аммония был выбран в качестве экспериментальной добавки для увеличения проводимости и, следовательно, потока пермеата. Молекулы как аммония, так и ацетата совместимы с процессом на платформе с лиофилизированным АФИ и, следовательно, не вносят никаких новых субстанций в общий производственный процесс, и известно, что обе молекулы являются летучими в нейтральном состоянии. Кроме того, рН ацетата аммония находится в желаемом диапазоне (6,9-7,7) в зависимости от желаемого рН продукта АФИ.

Было проведено исследование с тремя экспериментами, чтобы отобразить взаимосвязь между концентрацией ацетата аммония и потоком пермеата. Исходный материал для всех трех экспериментов включал 105 г/л АСО, 710 мМ NaCl и 25 мМ Трис при рН 7,2, и во всех трех экспериментах использовали трансмембранное давление (ТМД) 35 фунтов на кв. дюйм, поперечный поток 3 ЛММ (литры/минута/метр²), а нагрузка на мембрану 120 г/м².

В этом исследовании были приготовлены три водных буферных раствора ацетата аммония, в которых концентрация ацетата аммония была установлена на уровне 50 мМ, 100 мМ и 200 мМ, и были измерены полученные потоки пермеата для замены буфера, проведенной на водном растворе Спинразы® (нусинерсен). Результаты (Фиг. 2) демонстрируют поток пермеата в равновесном состоянии для каждого условия после приблизительно 3 диаобъемов и корреляцию между концентрацией ацетата аммония и потоком пермеата в равновесном состоянии.

Как показано на Фиг. 2, было замечено, что снижение потока пермеата, происходящее во время процесса УФ/ДФ, прямо пропорционально концентрации ацетата аммония в водном буферном растворе. Использование концентрации ацетата аммония 200 мМ позволяет процессу УФ/ДФ поддерживать поток пермеата, равный более 10 л•м⁻²•ч⁻¹, даже после прохождения через мембрану 5 диаобъемов буфера. В исследовании на Фиг. 2 показано, что регуляция концентрации солей в водном буферном растворе может позволить с помощью способов УФ/ДФ по настоящему изобретению достичь достаточно высоких концентраций олигонуклеотидов в ретентате после УФ/ДФ, при которых возможна прямая лиофилизация ретентата.

На Фиг. 3 обобщены экспериментальные результаты для связанного исследования, проведенного для определения того, как проводимость водного буферного раствора влияет на поток пермеата в процессе УФ/ДФ. Взаимосвязь между проводимостью буфера и потоком пермеата была исследована для определения минимального содержания соли, необходимого для процесса УФ/ДФ. В этом исследовании были

приготовлены три водных буферных раствора, для которых была установлена проводимость около 5,1 мСм/см, около 9,8 мСм/см и около 18,9 мСм/см, и были измерены полученные потоки пермеата для замены буфера, проведенного на водном растворе Спинразы® (нусинерсен). Проводимость измеряли с помощью Orion Versa Star Pro, усовершенствованного электрохимического измерителя.

Как показано на Фиг. 3, было обнаружено, что поток пермеата прямо пропорционален проводимости водного буферного раствора, так что увеличение потока пермеата линейно связано с увеличением проводимости буфера. Результаты этого исследования демонстрируют, что ацетат аммония является эффективным стимулятором потока пермеата в подходящем диапазоне концентраций АСО. Сравнение потоков в равновесном состоянии (Фиг. 2) и проводимости буфера (Фиг. 3) в этом исследовании показало линейную зависимость и, следовательно, возможность задавать конкретный поток (Фиг. 3), что очень важно для регуляции процедуры УФ/ДФ.

Пример 3. Корреляция между общей концентрацией солей в водном буфере и максимальной концентрацией олигонуклеотидов в ретентате

На Фиг. 4 обобщены экспериментальные результаты для исследования, проведенного для определения того, как общая концентрация солей в водном буферном растворе влияет на конечную концентрацию олигонуклеотида в ретентате после УФ/ДФ. В этом исследовании был приготовлен ряд водных буферных растворов (200 мМ ацетата аммония; 50 мМ ацетата аммония и 50 мМ ацетата натрия; 75 мМ ацетата аммония и 25 мМ ацетата натрия; 90 мМ ацетата аммония и 10 мМ ацетата натрия; 7,5 мМ ацетата аммония и 42,5 мМ ацетата натрия; 4 мМ ацетата аммония и 36 мМ ацетата натрия), в которых общая концентрация ацетатных солей была увеличена от около 4 мМ до около 200 мМ, а полученные в результате концентрации ретентата после УФ/ДФ были измерены при проведении замен буферов до 8 диаобъемов на водном растворе Спинразы® (нусинерсен). После УФ/ДФ до 8 диаобъемов выполняли конечную стадию концентрирования для уменьшения объема ретентата до тех пор, пока поток пермеата не снизился до <2 ЛМЧ.

Как показано на Фиг. 4, было замечено, что концентрация олигонуклеотида в ретентате после УФ/ДФ прямо пропорциональна общей концентрации ацетатных солей в водном буферном растворе. Хотя увеличение проводимости буфера для УФ/ДФ (общая концентрация солей) способствовало более высокому потоку пермеата, оно также способствовало более высокой максимально достижимой концентрации ретентата. Эта взаимосвязь также была линейной, демонстрируя возможность достижения максимально достижимой концентрации ретентата путем манипулирования концентрацией буферной соли для УФ/ДФ.

Исследование на Фиг. 4 неожиданно демонстрирует, что регулирование концентрации солей в водном буферном растворе может также регулировать концентрацию олигонуклеотида в ретентате, позволяя проводить процесс УФ/ДФ таким образом, который значительно увеличивает концентрацию ретентата, тем самым обеспечивая прямую лиофилизацию ретентата (без дополнительных стадий) для получения твердых АФИ.

Исследования, показанные на Фиг. 2 и 4, демонстрируют, что максимально достижимая концентрация АСО в ретентате прямо пропорциональна как общей концентрации ацетата в буфере для УФ/ДФ, так и потоку пермеата. Минимальная концентрация 80 г/л была выбрана для обеспечения приемлемого качества и плотности твердой массы, а также для соответствия существующему лиофилизатору (LyoStar3).

Общая концентрация соли в буфере регулирует поток пермеата и максимально достижимую концентрацию АСО в ретентате, при этом увеличение общего содержания соли приводит к воспроизводимому увеличению потока и максимальной концентрации ретентата. С помощью этого способа регуляции можно ориентироваться и воспроизводимо достигать желаемого потока пермеата и максимальной концентрации ретентата.

Пример 4. Способы регуляции содержания натрия в композиции олигонуклеотидов после лиофилизации

На Фиг. 5 и в таблице 1 обобщены экспериментальные результаты для исследования, проведенного для определения того, как молярное отношение ацетата натрия к ацетату аммония в водном буферном растворе влияет на количества натрия и аммония в композициях после лиофилизации. Во всех экспериментах УФ/ДФ в этом исследовании использовались следующие условия:

- ТМД 35 фунтов на кв. дюйм
- Поперечный поток 3 ЛММ
- Нагрузка на мембрану от 50 до 275 г/м².

Лиофилизацию пулов УФ/ДФ проводили в лотках LyoGuard при следующих условиях:

- Начальная температура замерзания -50 °С
- Первичная сушка при 23 °С и 100 миллиторр
- Вторичная сушка при 30°С и 100 миллиторр.

В этом исследовании была приготовлена серия водных буферных растворов (см. таблицу 1), в которых содержание ацетата натрия (NaOAc) и ацетата аммония (NH₄OAc) варьировалось таким образом, чтобы молярное отношение натрия к аммонiu увеличивалось с 0% до 100%, и были измерены весовые проценты натрия и аммония в композициях после лиофилизации.

Образцы твердых АФИ после лиофилизации были проанализированы на содержание натрия (с использованием оптической эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-OES)), аммония (с использованием набора для анализа NH₃ от Bio для анализатора Cedex BioHT) и содержания ацетата (с использованием метода ВЭЖХ-УФ (сравнение со стандартом)) (Фиг. 5). Целевой % по массе для натрия составлял 5,2 ± 0,9 %, а целевой показатель для ацетата составлял ≤ 0,8 мас.%. Технические требования по содержанию аммония отсутствовали, но было желательно максимально уменьшить количество остаточного аммония или полностью исключить его из АФИ. Было выбрано промежуточное целевое содержание аммония 0,5%, так как оно оказалось самым низким постоянно достижимым уровнем в тестируемых условиях.

Таблица 1

Экс.	Буфер (NaOAc / NH ₄ OAc) Соотношение	Буфер % NaOAc	Буфер Общее содержание ацетата (мМ)	Содержание Na после лиоф. (мас.%)	Содержание NH ₄ после лиоф. (мас.%)	Содержание Ацетата После лиоф. (мас.%)
1	200mM NH ₄ OAc	0	-	0,1	-	Н/Т

2	10мМ NaOAc, 90мМ NH ₄ OAc	10	100	0,6	4,1	2,3
3	25мМ NaOAc, 75мМ NH ₄ OAc	25	100	1,5	3,5	2,5
4	50мМ NaOAc, 50мМ NH ₄ OAc	50	100	3,1	2,2	2,2
5	42,5мМ NaOAc, 7,5мМ NH ₄ OAc	85	50	4,8	0,5	0,8
6	34мМ NaOAc, 6мМ NH ₄ OAc	85	40	4,9	0,4	0,5
7	36мМ NaOAc, 4мМ NH ₄ OAc	90	40	5,5	0,25	0,742
8	38мМ NaOAc, 2мМ NH ₄ OAc	95	40	5,9	0,14	0,597
9	40мМ NaOAc	100	40	6,3	Н/Т	Н/Т

Соотношение между натрием и аммонием было постоянным во всем диапазоне соотношений натрия и аммония в протестированных буферных системах (Фиг. 5), что демонстрирует возможность задавать конкретные концентрации натрия и аммония в конечном продукте (твердый АФИ). Во всех примерах на Фиг. 5, ретентаты УФ/ДФ концентрировали до аналогичных концентраций 80-85 г/л. Поскольку натрий, присутствующий в растворе в пуле УФ/ДФ, не был удален путем лиофилизации, итоговое содержание натрия в АФИ включает натрий, присутствующий в буфере, перенесенном в процесс лиофилизации. Если бы пул УФ/ДФ был с более низкой концентрацией АСО (большой объем), содержание натрия было бы повышено, и, наоборот, если бы пул УФ/ДФ мог быть увеличен до более высокой концентрации (меньший объем), содержание натрия было бы снижено. Любое изменение конечной концентрации АСО в ретентате УФ/ДФ необходимо учитывать при определении содержания натрия и аммония.

Как показано на Фиг. 5, было обнаружено, что отношение аммония к натрию в буфере для УФ/ДФ определяет конечное содержание натрия и аммония в композиции после лиофилизации. Лيوфилизацию пулов УФ/ДФ проводили в лотках LyoGuard, используя условия первичной сушки 23°C и 100 миллилитрр и условия вторичной сушки 30°C и 100 миллилитрр. В условиях лиофилизации в этом исследовании наблюдали, что конечное содержание натрия и аммония линейно связано с соответствующими молярными соотношениями ацетата натрия и ацетата аммония.

Как показано в соответствующем исследовании, обобщенном на Фиг. 6, точная настройка соотношения компонентов буфера для УФ/ДФ (например, соотношения аммония к натрию) обеспечивает контроль содержания натрия после лиофилизации, позволяя твердому АФИ соответствовать определенным техническим требованиям, таким как допустимое содержание натрия, равное $5,2\% \pm 0,9\%$. Результаты этого исследования показали, что содержание натрия ниже целевого значения $5,2 \pm 0,9$ мас.%, но линейный тренд позволяет прогнозировать необходимые составы буферов для УФ/ДФ (ацетата натрия и ацетата аммония), которые обеспечат содержание натрия в пределах целевого диапазона. Как показано на Фиг. 6, экстраполяция данных в центр целевого диапазона содержания натрия показала, что процедура УФ/ДФ с буфером,

состоящим из 85% ацетата натрия и 15% ацетата аммония, обеспечат содержание натрия в продукте, равным приблизительно 5,2 мас. %.

Пример 5. Корреляция содержания ацетата в композиции олигонуклеотидов после лиофилизации с общим содержанием ацетата в водном буфере

На Фиг. 10 обобщены экспериментальные результаты для исследования, проведенного для определения того, как общее содержание ацетата в водном буферном растворе влияет на количество ацетата в твердом АФИ после лиофилизации. В этом исследовании приготовили серию водных буферных растворов, в которых общая концентрация ацетата варьировалась от 40 мМ до 100 мМ (см. Примеры 2-8 в таблице 1), а массовую долю ацетата в композициях после лиофилизации измеряли. Как показано на Фиг. 10, было обнаружено, что остаточное содержание ацетата в АФИ после лиофилизации пропорционально общему содержанию солей ацетата в буфере для УФ/ДФ. Между общим содержанием ацетата в буферной матрице для УФ/ДФ и остаточным содержанием ацетата в твердом АФИ наблюдалась линейная тенденция. Буферные условия, которые соответствовали техническим требованиям по содержанию ацетата $\leq 0,8$ мас. %, причем все включали 40 мМ общего ацетата.

Было также обнаружено, что на остаточное содержание ацетата не влияет соотношение катионов аммония и натрия. Кроме того, исходя из летучести ацетата аммония в условиях лиофилизации, снижение общей концентрации ацетатной соли в водном буферном растворе позволило удалить ацетат до следовых уровней после лиофилизации.

Частично на основе экспериментальных исследований, описанных выше, было обнаружено, что оптимизация соотношения ацетата натрия и ацетата аммония в буфере для УФ/ДФ, наряду со снижением общей концентрации ацетатной соли, может успешно связать процесс выделения и очистки продукта с применением водного раствора, включая УФ/ДФ с лиофилизированным АФИ.

Пример 6. Крупномасштабное получение лиофилизированного АФИ

Крупномасштабные эксперименты проводили с использованием фиксированного молярного соотношения натриевой соли в водном буферном растворе и концентрации олигонуклеотида в ретентате после УФ/ДФ (обозначенном как «Конц. Олиго Перед Лиоф.» в Таблице 2 ниже) и измеряли содержание влаги, содержание натрия и содержание ацетата в композиции после лиофилизации. В этих экспериментах олигонуклеотид Спинраза® (нусинерсен) подвергали обработке методами УФ/ДФ по настоящему изобретению при фиксированном молярном соотношении соли натрия.

Основываясь на предыдущих экспериментах, 6 мМ ацетата аммония, 34 мМ ацетата натрия (от 85% ацетата натрия до 15% ацетата аммония, с общей концентрацией ацетата 40 мМ) были выбраны в качестве буферной матрицы, которая наилучшим образом соответствует конечным точкам для максимальной концентрации АСО в ретентате, содержания натрия и ацетата. Условия были подтверждены в лабораторных условиях, а затем повторены в производственных масштабах (MFG) (18 ммоль). Пул УФ/ДФ, полученный в процессе производства, разделяли на часть, лиофилизированную в лабораторных масштабах (обозначенную как «Лиоф. в лаб. масштабах» в таблице 2), а оставшуюся часть лиофилизировали в производственных масштабах.

Как показано в таблице 2, для натрия и ацетата после лиофилизации не наблюдалось существенных различий, что свидетельствует о масштабируемости регуляции содержания катионов путем манипуляций с буфером для УФ/ДФ. Максимально достижимые концентрации пула УФ/ДФ были одинаковыми в обоих

масштабах. Было обнаружено, что содержание воды в твердом АФИ несколько выше в производственных масштабах, что является результатом различий в оборудовании. В целом, масштабирование регуляции содержания катионов и ацетатов путем манипулирования буфером для УФ/ДФ и облегчение потока пермеата и концентрации ретентата с помощью композиции солей были успешными, демонстрируя масштабируемость процесса.

Таблица 2: Итоговые условия буфера для УФ/ДФ и результаты в лабораторных и производственных масштабах

Экс.	Матрица для УФ/ДФ	Конц. АСО в ретентате перед лиоф. (г/л)	После лиоф. Влажность, (%)	После лиоф. Натрий, (%)	После лиоф. Ацетат, (%)
10	6/34 (NH ₄ OAc/NaOAc) УФ/ДФ и лиоф. в лаб. масштабе	85	1,0	4,9	0,4
11	Техн. прогон 6/34 (NH ₄ OAc/NaOAc) УФ/ДФ в MFG масштабе, Ллиоф. в лаб. масштабе	85	1,1	4,9	0,5
12	Техн. прогон 6/34 (NH ₄ OAc/NaOAc) УФ/ДФ и лиоф. в MFG масштабе	85	2,8	4,9	0,5

Массовую лиофилизацию проводили на материалах, полученных в ходе серийного производства (экс. 12 в таблице 2), с использованием 4 лотков LyoGuard для общего объема жидкости 6 л. На Фиг. 7 показаны 4 лотка LyoGuard, содержащие лиофилизированный материал. Процесс лиофилизации был изменен, чтобы способствовать максимальному удалению летучих компонентов буфера для УФ/ДФ. Этот процесс массовой лиофилизации включал замораживание при -50°C, первичную сушку при 23°C с последующей вторичной сушкой при 30°C при давлении 150 миллиторр. Содержание влаги и летучие компоненты буфера успешно удаляли до следовых количеств, соответствующих техническим требованиям для АФИ. На Фиг. 8 показан лиофилизированный материал в лотке LyoGuard, а затем перенесенный в пакет для хранения.

Итоговый выбранный буфер представлял собой 34 мМ NaOAc и 6 мМ NH₄OAc, а условия и результаты технического прогона (пример 12 в таблице 2) приведены ниже:

- Содержание Na в твердом АФИ: 4,9–5,0 % (целевое значение 5,2% ± 0,9%)
- Концентрация после УФ/ДФ: допускается 85 г/л жидкого АФИ
- Поток пермеата: Поддерживается > 10 ЛМЧ потока
- Продолжительность процесса УФ/ДФ: технологическая процедура завершается за 1 день

- Конечное содержание ацетата: самый низкий остаточный ацетат после лиофилизации
- Стабильность композиции после лиофилизации: твердый АФИ, стабильный при 25°C в течение 31 дня

Хотя в данном документе были показаны и описаны различные варианты осуществления настоящего изобретения, очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены могут быть сделаны, не отступая от настоящего изобретения. Соответственно, предполагается, что изобретение ограничивается только сущностью и объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции, содержащей олигонуклеотид, включающий проведение ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) водного раствора олигонуклеотида с образованием ретентата, содержащего олигонуклеотид, причем ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят с применением водного буферного раствора, содержащего одну или более солей.
2. Способ по п. 1, в котором общая концентрация одной или более солей в буферном растворе находится в диапазоне от 10 мМ до 200 мМ, от 20 мМ до 100 мМ или от 30 мМ до 60 мМ.
3. Способ по п. 2, в котором общая концентрация одной или более солей в буферном растворе составляет 40 мМ.
4. Способ по любому из пп. 1–3, в котором водный буферный раствор содержит по меньшей мере одну соль, выбранную из ацетата натрия, ацетата калия и ацетата аммония.
5. Способ по п. 4, в котором водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат аммония.
6. Способ по любому из пп. 1–3, в котором водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат калия.
7. Способ по п. 5 или п. 6, в котором
водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат аммония, а общая концентрация ацетата натрия и ацетата аммония находится в диапазоне от 10 мМ до 200 мМ, или от 20 мМ до 100 мМ, или от 30 мМ до 60 мМ, или составляет 40 мМ; или
водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат калия, а общая концентрация ацетата натрия и ацетата калия находится в диапазоне от 10 мМ до 200 мМ, или от 20 мМ до 100 мМ, или от 30 мМ до 60 мМ, или составляет 40 мМ.
8. Способ по любому из пп. 5–7, в котором молярное отношение ацетата натрия к ацетату аммония или молярное отношение ацетата натрия к ацетату калия в буферном растворе составляет от 1:20 до 20:1 или от 1:1 до 19:1, или от 5:1 до 19:1, или от 5:1 до 6:1, или от 5:1 до 6:1,8, или от 12:1 до 15:1.
9. Способ по п. 8, в котором:
водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат аммония, а молярное отношение ацетата натрия к ацетату аммония в водном буферном растворе составляет 17:3; или
водный буферный раствор содержит ацетат натрия и ацетат калия, а молярное отношение ацетата натрия к ацетату калия в водном буферном растворе составляет 17:3.
10. Способ по любому из пп. 1–3, в котором водный буферный раствор содержит 34 мМ ацетата натрия и 6 мМ ацетата аммония, или водный буферный раствор содержит 34 мМ ацетата натрия и 6 мМ ацетата калия.

11. Способ по любому из пп. 1–10, в котором ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят при потоке пермеата по меньшей мере $5 \text{ л}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$.
12. Способ по п. 11, в котором ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят при потоке пермеата в диапазоне от $5 \text{ л}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$ до $25 \text{ л}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$, или от $8 \text{ л}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$ до $16 \text{ л}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{ч}^{-1}$.
13. Способ по любому из пп. 1–12, в котором ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят при диаобъеме по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или от 3 до 10.
14. Способ по любому из пп. 1–13, в котором концентрация олигонуклеотида в ретентате составляет по меньшей мере 50 г/л или находится в диапазоне от 70 г/л до 125 г/л, или от 80 г/л до 90 г/л.
15. Способ по любому из пп. 1–14, в котором ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят с использованием мембраны, имеющей отсечение по молекулярной массе (MWCO) в диапазоне от 1 кДа до 7 кДа или от 2 кДа до 4 кДа, или 3 кДа.
16. Способ по любому из пп. 1–15, в котором ультрафильтрацию/диафильтрацию (УФ/ДФ) проводят посредством тангенциальной поточной фильтрации.
17. Способ по любому из пп. 1–16, дополнительно включающий лиофилизацию ретентата с образованием лиофилизированной композиции, содержащей олигонуклеотид.
18. Способ по п. 17, в котором весовой процент натрия в лиофилизированной композиции составляет от 0% до 100%, от 0% до 50%, или от 2% до 10%, или от 4,3% до 6,1%, или от 4,8% до 5,4%.
19. Способ по п. 18, в котором весовой процент натрия в лиофилизированной композиции составляет от 4,9% до 5,0%.
20. Способ по п. 18, в котором весовой процент натрия в лиофилизированной композиции составляет $5,2\% \pm 0,9\%$.
21. Способ по любому из пп. 4–20, в котором весовой процент ацетата в лиофилизированной композиции составляет менее 3%, менее 2%, менее 1% или менее 0,8%.
22. Способ по любому из пп. 1–21, в котором олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, содержащий от 16 до 30 нуклеотидов или содержащий от 16 до 20 нуклеотидов.
23. Способ по любому из пп. 1–21, в котором олигонуклеотид представляет собой нусинерсен.
24. Композиция, содержащая олигонуклеотид, причем композиция получена с помощью способа по любому из пп. 1–23.

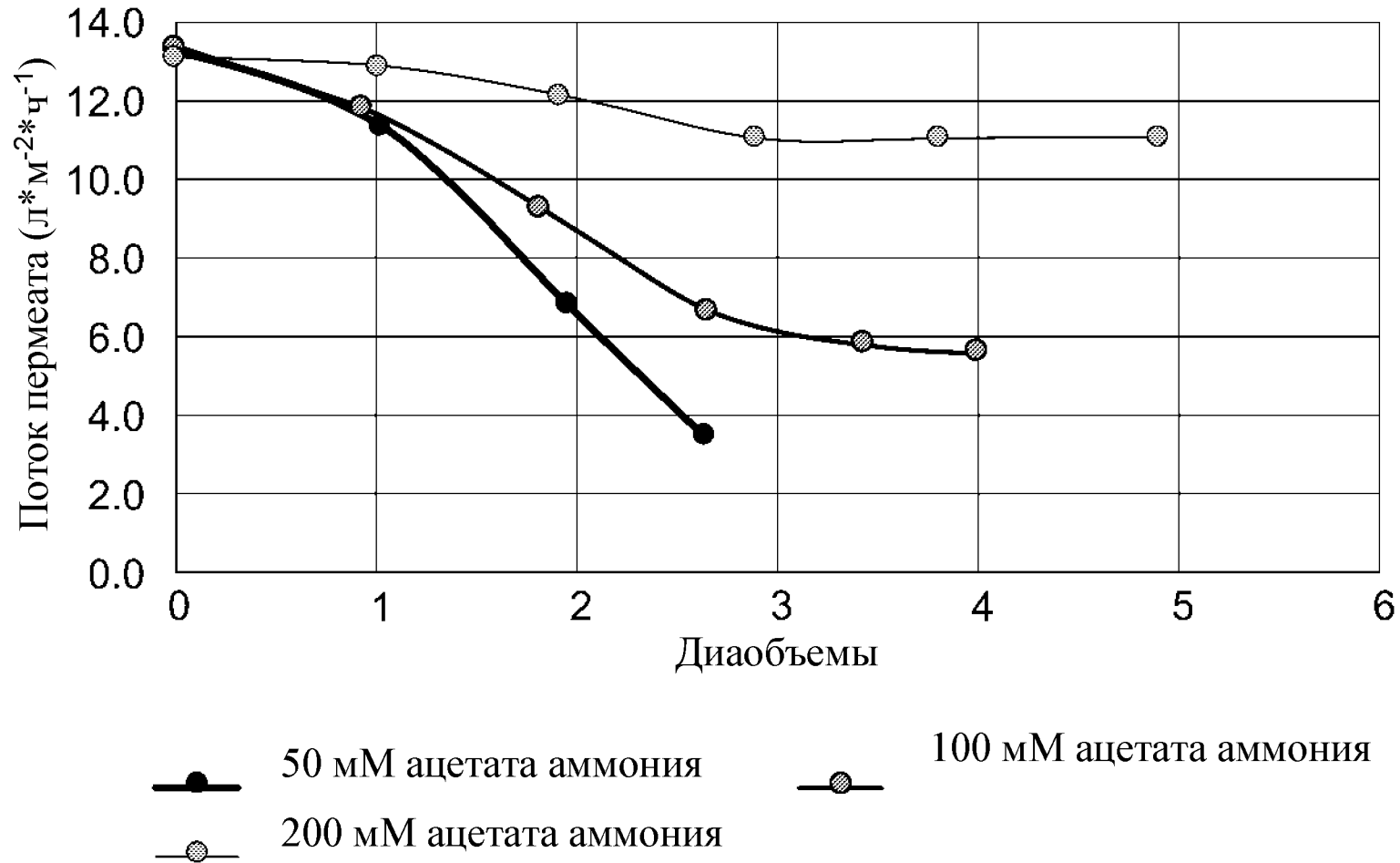
25. Композиция по п. 24, которая находится в форме водного раствора, содержащего олигонуклеотид.
26. Композиция по п. 25, которая находится в форме лиофилизированной композиции, содержащей олигонуклеотид.

Фиг. 1



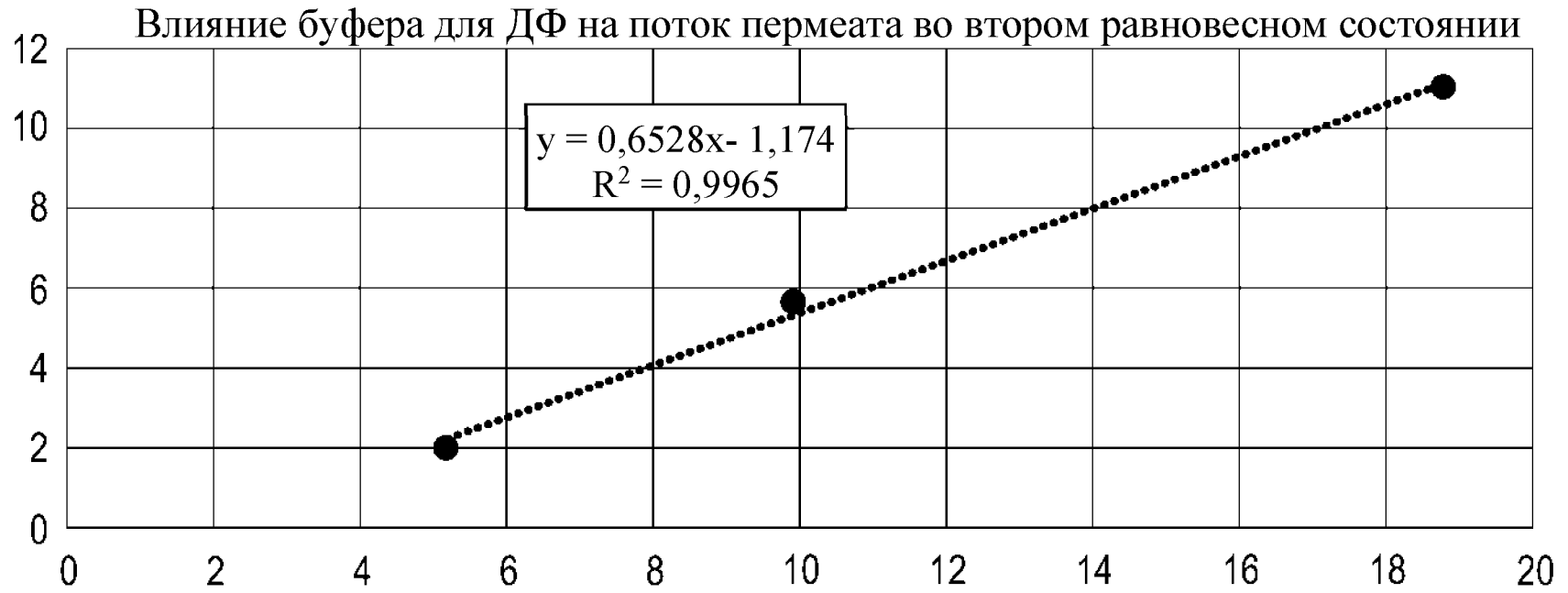
Фиг. 2

Снижение потока пермеата во время замены буфера



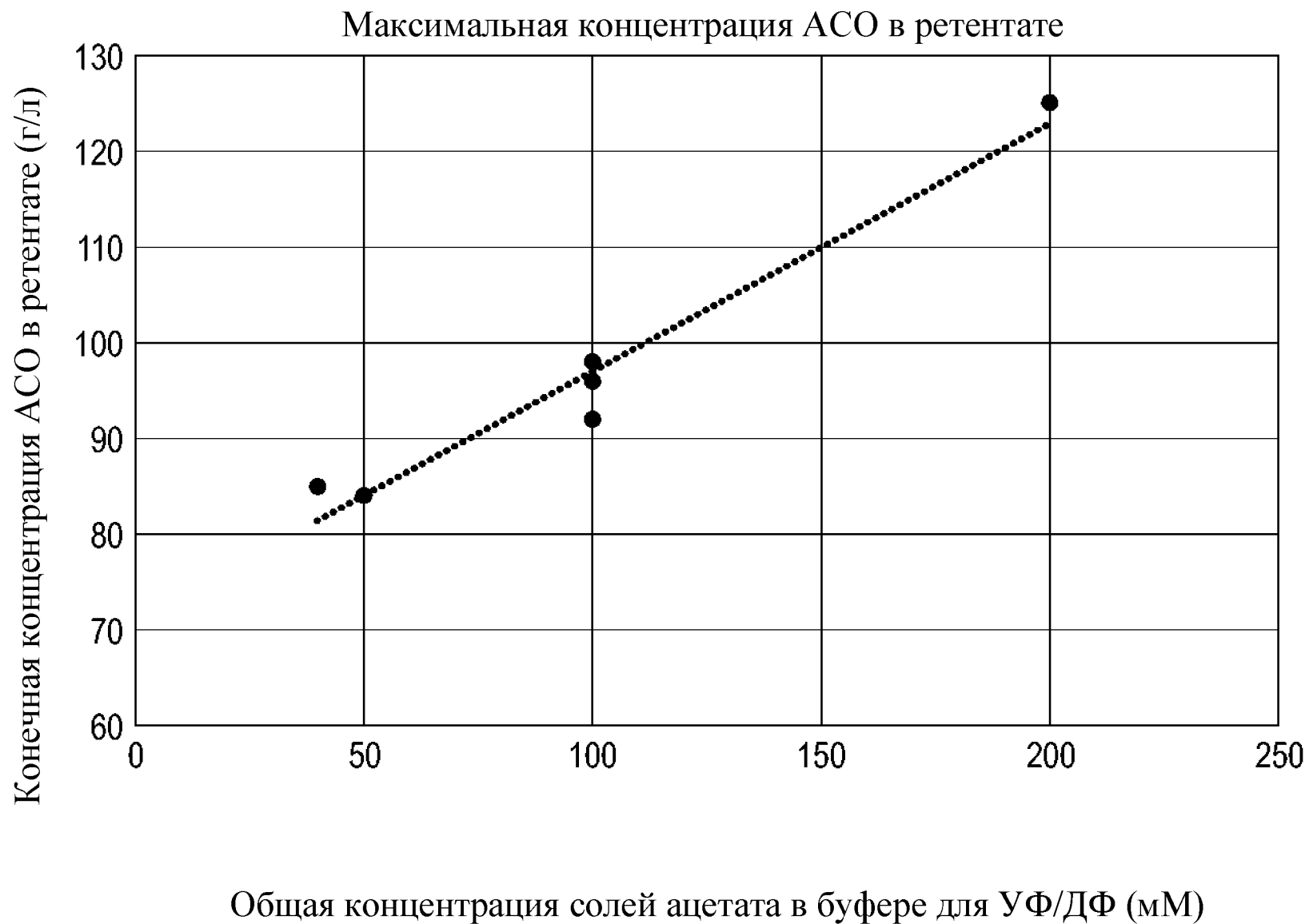
Фиг. 3

Поток пермеата во втором равновесном состоянии
($\text{л}^* \text{м}^{-2} * \text{ч}^{-1}$)



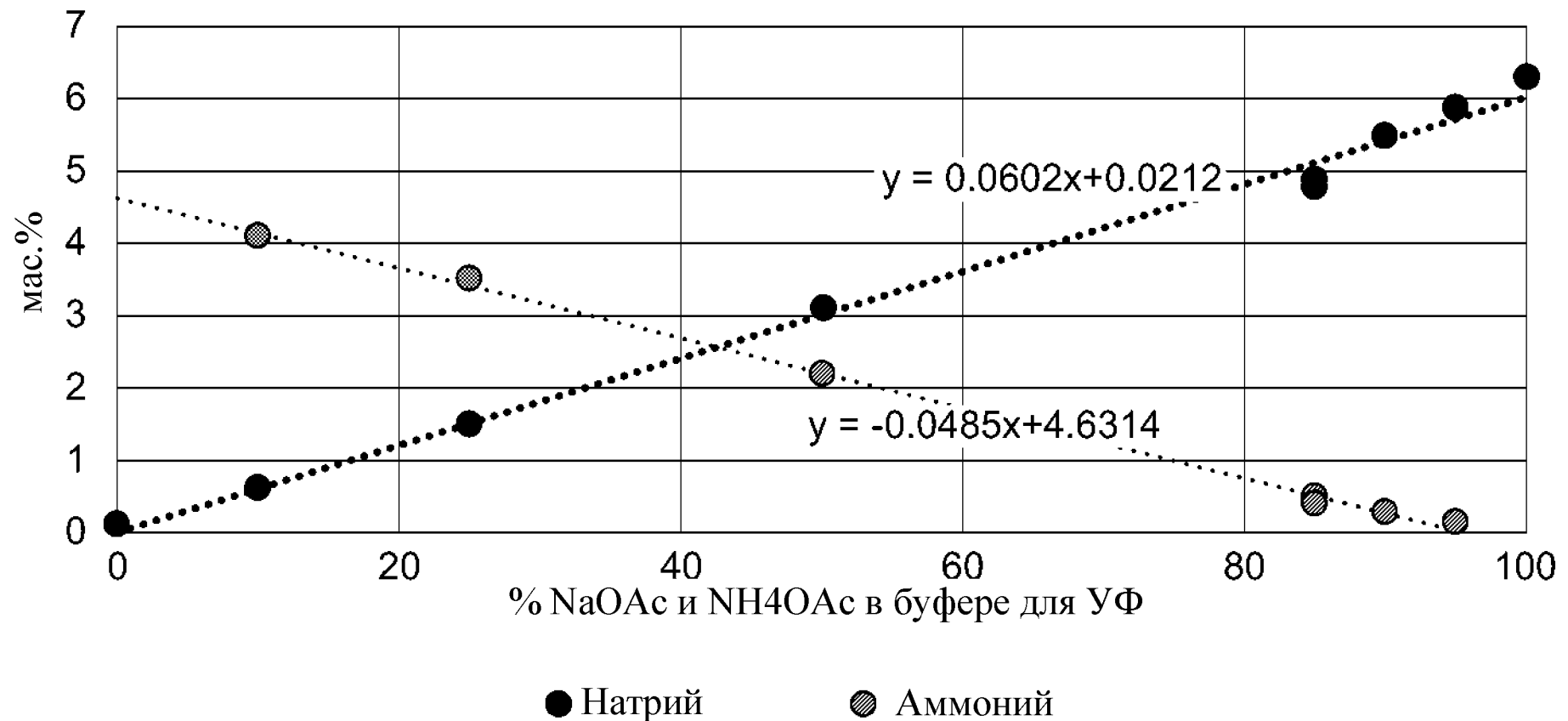
Проводимость буфера для ДФ (мСм/см)

Фиг. 4



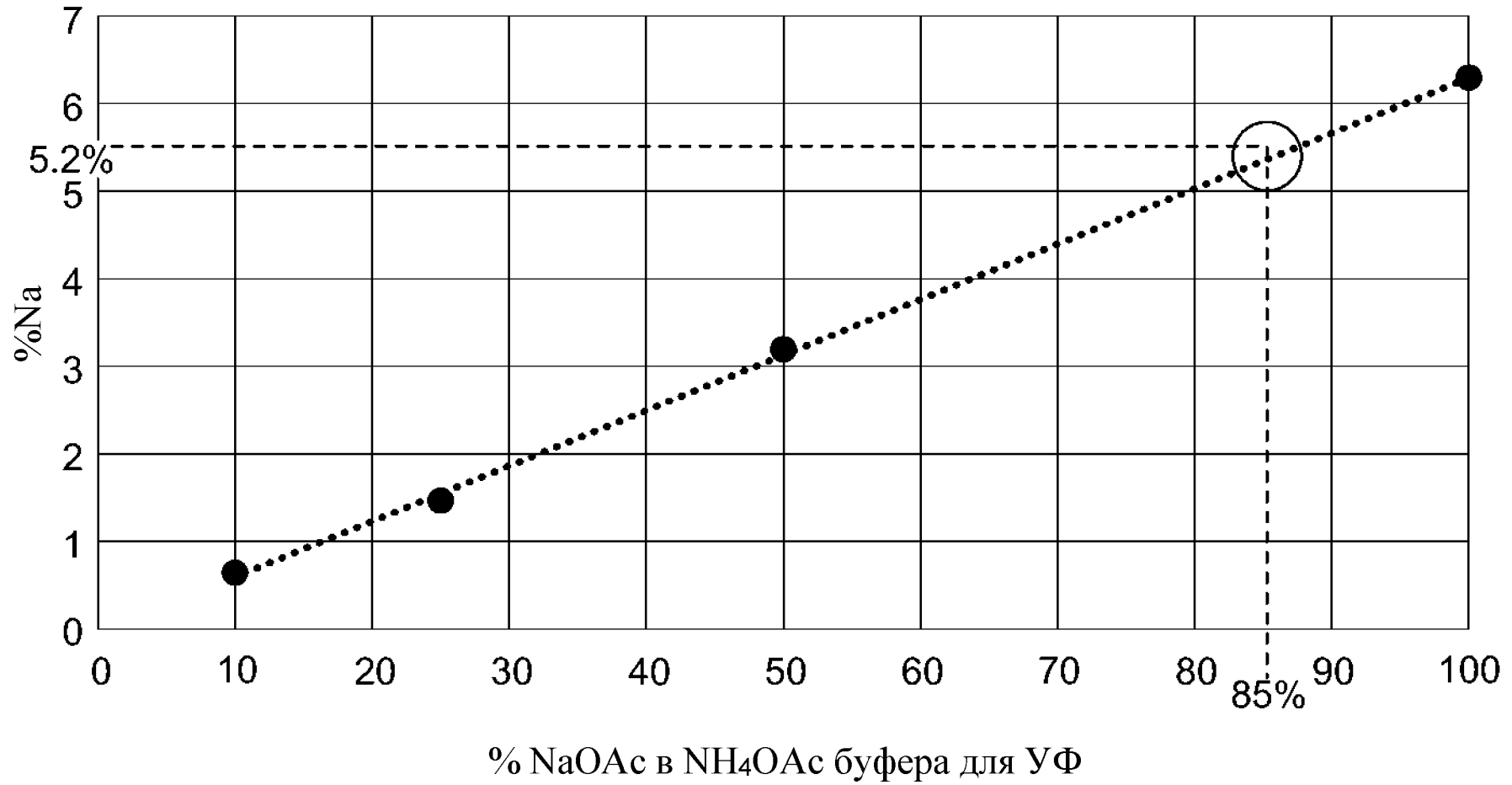
Фиг. 5

Тенденции изменения содержания натрия и аммония после лиофилизации



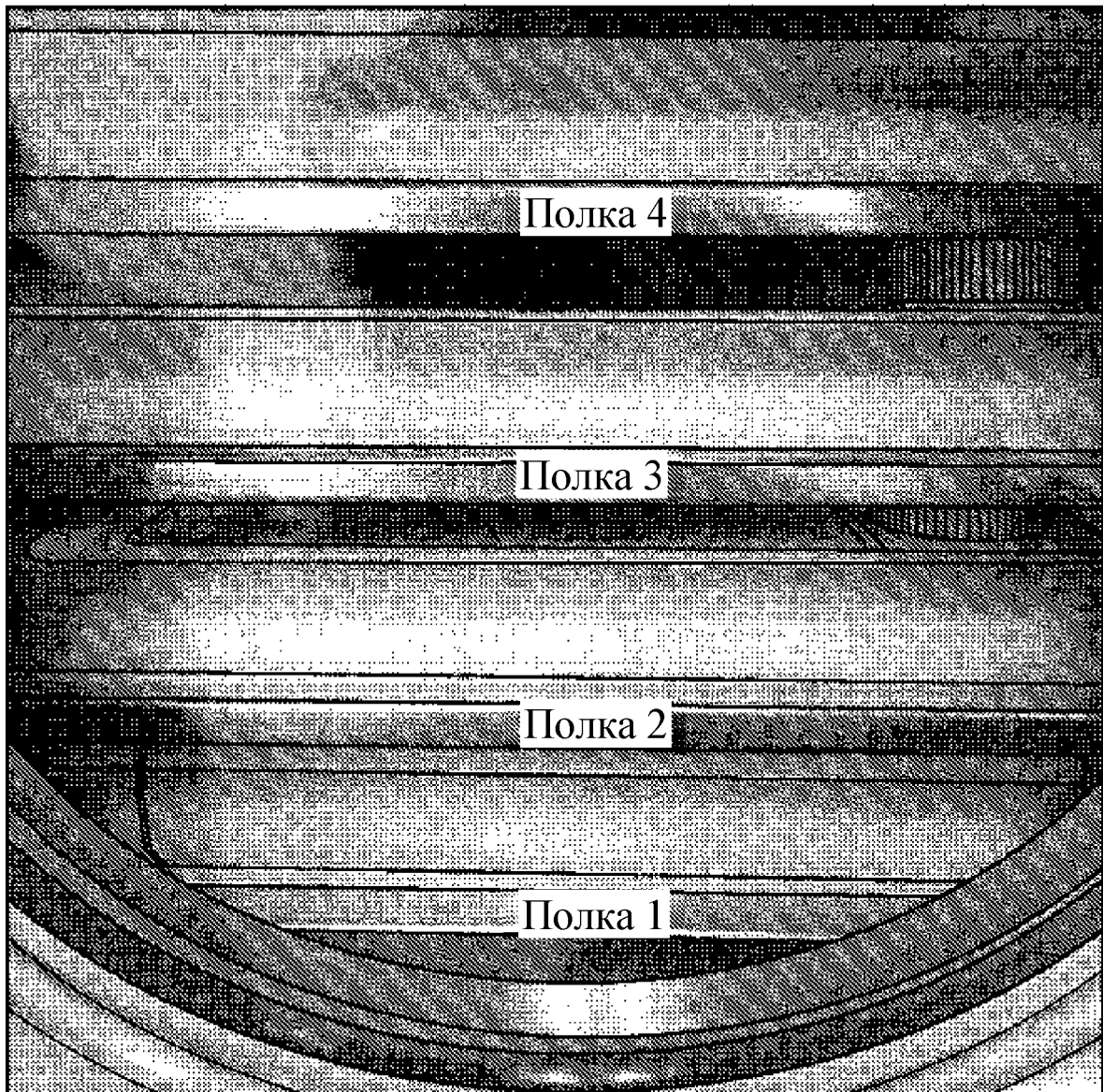
Фиг. 6

Содержание Na после УФ/ДФ



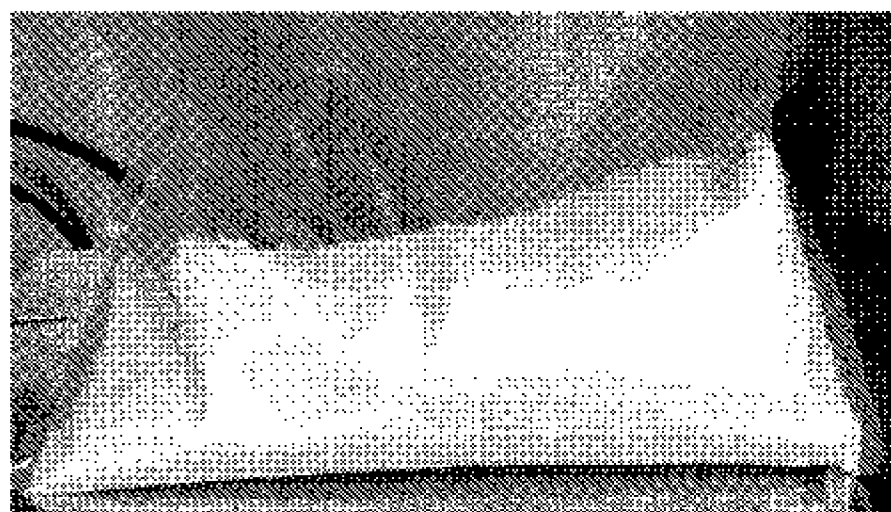
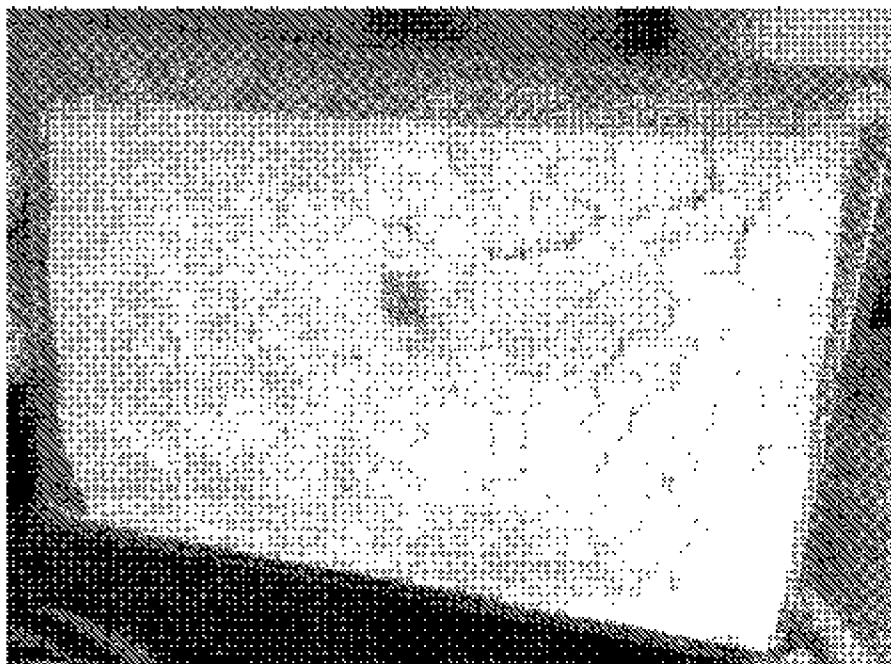
Фиг. 7

Камера лиофилизатора с лотками LyoGuard



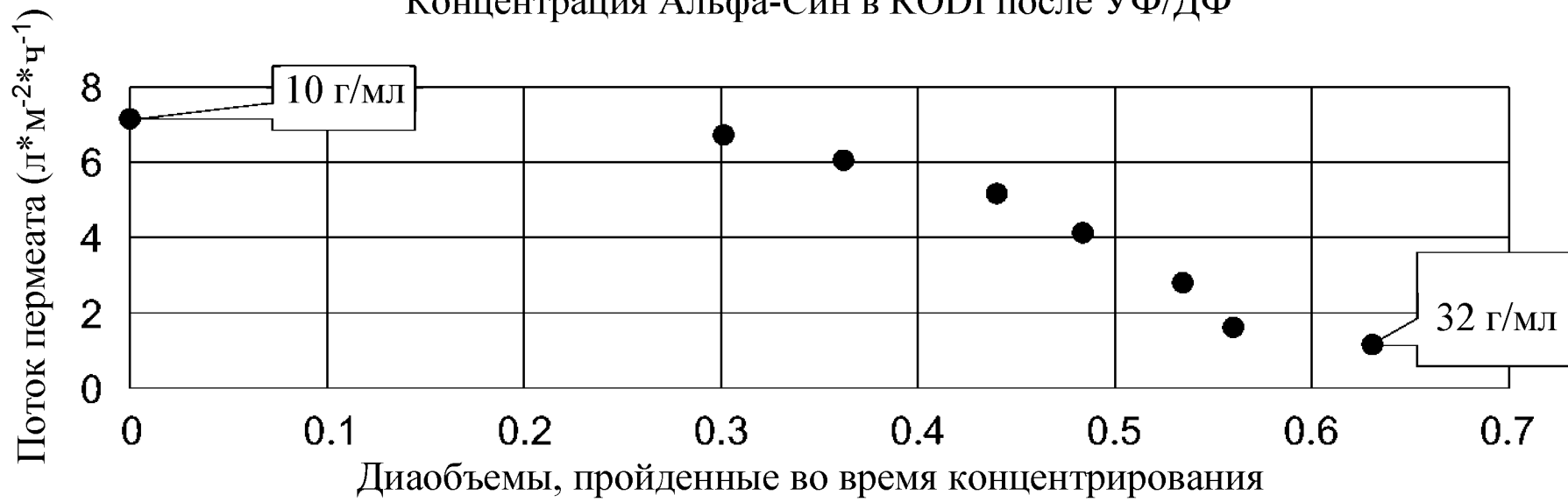
Фиг. 8

Лиофилизированный материал в лотке и пакете



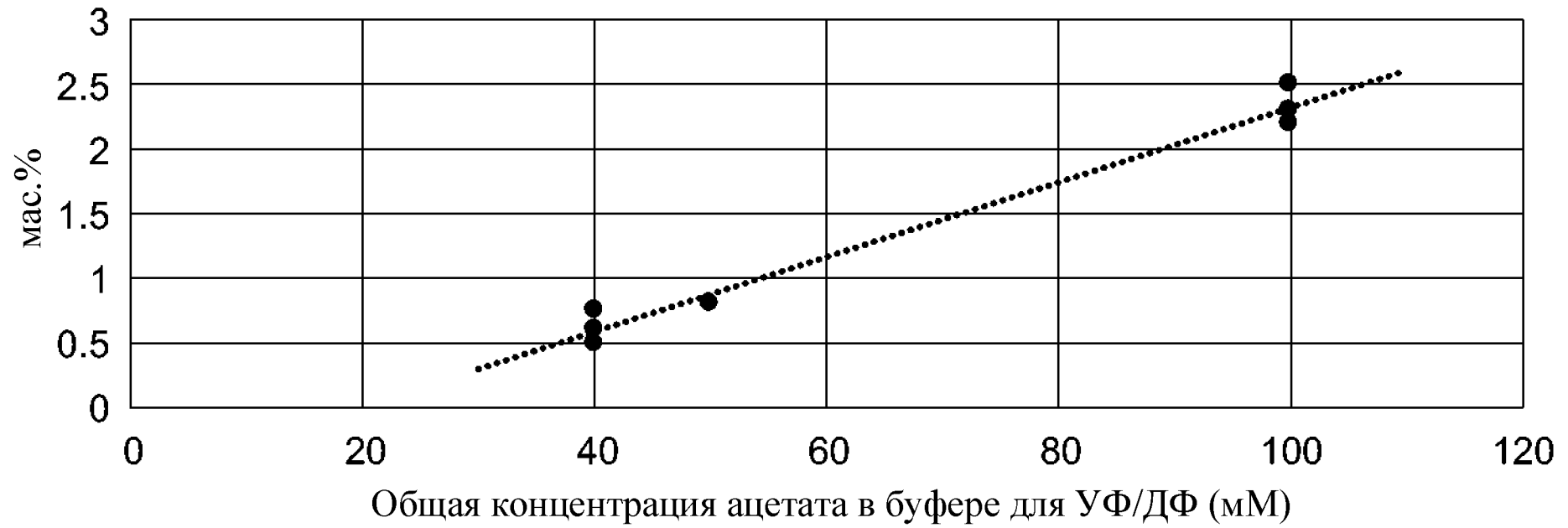
Фиг. 9

Концентрация Альфа-Син в RODI после УФ/ДФ



Фиг. 10

Тенденции изменения содержания ацетата в твердом АФИ



Фиг. 11

**Заключительные стадии
процесса на платформе
с водной основой**

АОХ

- 700 мМ NaCl
- 2-4 мг/мл



УФ/ДФ

- 150 мМ NaCl
- 20 мг/мл
- 12-16 LMH потока



ЛС

- Готовая к
наполнению ЛС

**Заключительные стадии
процесса на платформе с
лиофилизированным
АФИ**

Осаждение этанолом

- $\leq 15\%$ этанола
- 100 мг/мл
- Содержание Na^+ $5,2\% \pm 0,9\%$



Лиофилизация

- Содержание Na^+ $5,2\% \pm 0,9\%$
- $<0,80\%$ ацетата



Смешивание

- Фильтрация для снижения
биологической нагрузки
- Восстановление

Фиг. 12

