

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202092511 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.12.29(51) Int. Cl. G01N 30/86 (2006.01)  
G01N 30/88 (2006.01)  
C07K 16/24 (2006.01)  
G01N 30/89 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2019.04.19

## (54) КВАЛИФИКАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ В СПОСОБАХ ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К IL-12/IL-23

(31) 62/660,340

(72) Изобретатель:

(32) 2018.04.20

Рэндольф Пол (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/028332

Медведев В.Н. (RU)

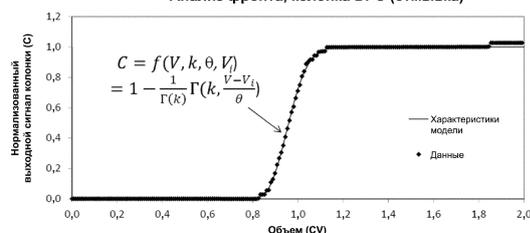
(87) WO 2019/204734 2019.10.24

(71) Заявитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к способу эксплуатации хроматографической колонки в способах производства антител к IL-12/IL-23p40, например антител к IL-12/IL-23p40 STELARA® (устекинумаб), конкретных фармацевтических композиций антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Данный способ включает получение выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время использования хроматографической колонки с набиванием колонки. Модельная кумулятивная кривая гамма-распределения определяется на основе собранного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), рассчитывают для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения и на основе рассчитанного значения НЕТР оценивают качество набивания хроматографической колонки. Если во время регулярного мониторинга колонок наблюдается неблагоприятная тенденция по НЕТР или выход за контрольные границы, для обеспечения качества продукта в данной партии следует оценить качество элюируемого продукта, эффективность процесса хроматографии на колонке и/или удаление примесей. При невыполнении любых установленных критериев по качеству продукта или характеристикам колонки перед выдачей разрешения на эксплуатацию необходимо выполнить соответствующее корректирующее действие, такое как кондиционирование, перенабивка или замена колонки, и квалификационное исследование.

Анализ фронта, колонка DPC (отмывка)



A1

202092511

202092511

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565130EA/011

### КВАЛИФИКАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ В СПОСОБАХ ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К IL-12/IL-23

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/660,340, поданной 20 апреля 2018 г., содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к способу квалификационного исследования хроматографической колонки в способах производства для получения антител к IL-12/IL-23p40, например антител к IL-12/IL-23p40 STELARA® (устекинумаб), конкретных фармацевтических композиций антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

#### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6082USNP1 Sequences, с датой создания 17 апреля 2019 г. и размером 14 кб. Перечень последовательностей, представленный с помощью EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Колоночная хроматография является важной методикой, используемой в процессах очистки с целью получения терапевтических белков. Характеристики колонок должны сохраняться при изменении масштаба процесса от настольной установки до производственных установок и на протяжении всего срока службы колонок. При увеличении диаметра колонок, количества оборудования и потребляемого буфера при масштабировании процесса могут возникать сложности, связанные с процедурами оценки колонок, потенциальными изменениями целостности набивки и логистикой.

[0005] В текущем способе квалификационной оценки хроматографической колонки рассчитывают высоту, эквивалентную теоретической тарелке (НЕТР), показатель дисперсии после импульсного нанесения посредством оценки среднего от пикового максимума и среднеквадратичного отклонения от ширины пика на половине высоты. Основное ограничение этого способа заключается в том, что он не обеспечивает точного измерения дисперсии (т. е. НЕТР), если форма пика отклоняется от гауссова распределения. Чтобы компенсировать недостаток чувствительности, для оценки деформации пика используют второй показатель - асимметрию. Этот показатель сравнивает ширину пика по переднему и заднему фронтам на уровне 10% от максимальной высоты пика. Ограничения данного подхода приводят к недостаточной чувствительности к изменениям в

характеристиках колонки, и часто результатом является проведение перенабивки или кондиционирования колонки, в то время как характеристики колонки по существу являются приемлемыми. Отмечены и другие стратегии квалификационного исследования колонок. Такие стратегии включают использование гауссова или негауссова распределений для моделирования переходов процесса (см., например, Larson, *et al.*, Use of Process Data to Assess Chromatographic Performance in Production-Scale Protein Purification Columns, *Biotechnol. Prog.* 19:485-492 (2003) и патенты США №: 9,047,438, Belousov *et al.*, и 8,410,928, Ganguly). Подходы с гауссовым распределением имеют те же ограничения чувствительности, которые отмечены ранее для способа с нанесением, а отмеченные негауссовы подходы требуют сложных вычислений.

**[0006]** Для отслеживания изменений характеристик хроматографических колонок во время повторяющейся работы и для оценки эффективности, с которой колонка будет работать в течение срока ее службы требуется улучшенная процедура квалификационного исследования с большей чувствительностью и более рационально определенными границами. Настоящее изобретение относится к устранению указанного недостатка данной области.

#### ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0007]** Варианты осуществления изобретения определены, соответственно, независимыми и зависимыми пунктами формулы изобретения, прилагаемыми к настоящему документу, которые для краткости включены в настоящий документ путем ссылки. Другие варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов изобретения очевидны из приведенного ниже подробного описания в сочетании с прилагаемыми на фигурах чертежами.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается способ эксплуатации хроматографической колонки в способах производства для получения антител к IL-12/IL-23p40, конкретных фармацевтических композиций антител и их антигенсвязывающих фрагментов, причем антитела к IL-12/IL-23p40 содержат последовательности аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из следующих: (i) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Данный способ включает получение выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования хроматографической колонки с набиванием колонки. Этот способ дополнительно включает определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного

переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для восходящего переходного фронта или формулы Ib для нисходящего переходного фронта,

$$C = 1 - \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Формула Ia}$$

или

$$C = \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Формула Ib,}$$

где  $S$  представляет собой выходной сигнал колонки для данного  $V$ ,  $V$  представляет собой накопленный поток, деленный на объем колонки, а  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$  представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для определения кривой. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), рассчитывают для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$ ,

$$НЕТР = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad \text{Формула II,}$$

где  $\mu = k\theta + V_i$ ,

$$\sigma = \sqrt{k\theta^2}, \text{ и}$$

$L$ —длина колонки.

Качество набивания хроматографической колонки оценивают на основе вычисленного значения НЕТР. На основании этой оценки хроматографическую колонку используют повторно, кондиционируют, заменяют или перенабивают.

**[0009]** Был разработан новый способ оценки целостности колонки, который в настоящем документе называется анализом гамма-распределения перехода (GDТА). В новом способе используется математическая модель для аппроксимации с помощью кривой данных по переходному фронту подвижной фазы, которые генерируются на обычных стадиях процесса работы колонок. Затем параметры модельной кривой используют для расчета дисперсии по слою колонки в качестве показателя качества колонки. Переходные фронты подвижной фазы возникают в результате отдельных стадий процесса хроматографической очистки, в котором используют технологические буферы/отмывочные растворы с различными свойствами, такими как электропроводность, рН и/или буферные компоненты. Способ по существу можно применять к любому одному или более переходным фронтам подвижной фазы, генерируемым при нормальной работе колонки.

**[0010]** Основное преимущество способа GDТА заключается в том, что он обеспечивает более чувствительную оценку дисперсии по слою колонки, чем способ гауссовой оценки НЕТР. При использовании GDТА больше не требуется измерять асимметрию, поскольку модель GDТА правильно измеряет дисперсию за счет подгонки кривой. Кроме того, применение функции гамма-распределения упрощает анализ переходных фронтов по сравнению с ранее описанными альтернативными негауссовыми способами. Использование переходов подвижной фазы, уже имеющих в

хроматографическом процессе, позволяет избежать необходимости в дополнительных стадиях обработки вне технологической линии. Более того, во многих случаях, исторические данные позволяют установить исторические диапазоны эффективности колонки до внедрения способа. Наконец, способ GDTA может быть автоматизирован для обеспечения единообразного применения.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается способ эксплуатации хроматографической колонки в способах производства для получения антител к IL-12/IL-23p40, конкретных фармацевтических композиций антител и их антигенсвязывающих фрагментов, причем антитела к IL-12/IL-23p40 содержат последовательности аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из следующих: (i) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, причем указанный способ включает:

сбор выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования хроматографической колонки с набиванием колонки;

определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для восходящего переходного фронта или формулы Ib для нисходящего переходного фронта,

$$C = 1 - \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Формула Ia}$$

или

$$C = \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Формула Ib,}$$

где C представляет собой выходной сигнал колонки для данного V, V представляет собой накопленный поток, деленный на объем колонки, а k,  $\theta$  и  $V_i$  представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для определения кривой;

вычисление высоты, эквивалентной теоретической тарелке (HETP), для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения k,  $\theta$  и  $V_i$ ,

$$HETP = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L$$

Формула II,

где

$$\mu = k\theta + V_i,$$

$$\sigma = \sqrt{k\theta^2},$$

L=длина колонки; и

оценку качества набивания хроматографической колонки на основе указанного вычисленного значения НЕТР.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, дополнительно включающий:

кондиционирование, замену или перенабивку хроматографической колонки на основе указанной оценки.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, дополнительно включающий:

сбор выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для соответствующего переходного фронта подвижной фазы во время одного или более последующих применений набивания хроматографической колонки;

выполнение указанного определения и указанного вычисления с использованием выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока, собранных во время каждого одного или более последующих применений набивания хроматографической колонки;

определение значения НЕТР для набивания хроматографической колонки во время каждого из указанных одного или более последующих применений на основании указанного выполнения;

выведение тенденции изменения определенных значений НЕТР для набивания хроматографической колонки при двух или более последующих применениях; и

идентификацию изменения качества набивания хроматографической колонки на основании указанной выведенной тенденции, причем указанные кондиционирование, замена или перенабивка хроматографической колонки основаны на указанной идентификации.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается способ, в котором увеличение значения НЕТР набивания хроматографической колонки в одном или более последующих применениях указанного набивания колонки по сравнению со значением НЕТР набивания хроматографической колонки в одном или более более ранних применениях указанного набивания колонки выявляет снижение качества набивания хроматографической колонки.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором собирают выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока для двух или более различных переходных фронтов подвижной фазы во время указанного первого применения набивания колонки, причем указанный способ включает:

выполнение указанного определения и вычисления с использованием выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока, независимо собранных для каждого из

двух или более разных переходных фронтов подвижной фазы, с вычислением значения НЕТР для каждого из двух или более различных переходных фронтов подвижной фазы;

оценку качества набивания хроматографической колонки на основе двух или более рассчитанных значений НЕТР, причем указанное кондиционирование, замена или перенабивка хроматографической колонки основаны на указанной оценке.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается способ, в котором хроматографическая колонка выбрана из группы, состоящей из колонки для аффинной хроматографии с белком А, колонки для катионообменной хроматографии и колонки для анионообменной хроматографии.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором колонка для аффинной хроматографии с белком А включает в себя колонку для аффинной хроматографии с белком А MabSelect™, колонка для катионообменной хроматографии включает в себя колонку для катионообменной хроматографии UNOsphere S™ или колонку для катионообменной хроматографии SP Sepharose XL, а колонка для анионообменной хроматографии включает в себя колонку для анионообменной хроматографии Q Sepharose™ XL.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором переходный фронт подвижной фазы в колонке для аффинной хроматографии с белком А получен из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта отмывки, образованного во время очистки антител к IL-12/IL-23p40, фронта, образованного при элюировании антител к IL-12/IL-23p40, фронта, образованного при санитарной обработке колонки с помощью гуанидин-НСl, фронта, образованного при отмывании колонки после санитарной обработки с использованием 0,1 М цитрата натрия, рН 3,5.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором переходный фронт подвижной фазы в колонке для катионообменной хроматографии получен из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образованного при загрузке материала, обработанного растворителем/детергентом (S/D), который содержит антитела к IL-12/IL-23p40, фронта, образованного при элюировании антител к IL-12/IL-23p40, и фронта, образованного при десорбции колонки.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором переходный фронт подвижной фазы в колонке для анионообменной хроматографии получен из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образованного при очистке колонки гидроксидом натрия, и фронта, образованного при десорбции колонки.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0021]** На **ФИГ. 1А-1В** представлены графики примера подгонки кривой при анализе гамма-распределения перехода. На **ФИГ. 1А** представлен график, демонстрирующий пример подгонки кривой к данным по переходу подвижной фазы при анализе гамма-распределения перехода. На **ФИГ. 1В** представлен график, демонстрирующий пример

подгонки кривой к данным о переходе подвижной фазы при анализе гамма-распределения перехода, с использованием параметров этой кривой для вычисления высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), в качестве показателя эффективности колонки.

[0022] На **ФИГ. 2** представлена схема, демонстрирующая систему квалификационного исследования хроматографической колонки, описанную в настоящем документе.

[0023] На **ФИГ. 3** представлен график распределения вероятностей НЕТР для фронта уравнивания колонки с белком А без преобразования.

[0024] На **ФИГ. 4** представлен график суммы квадратов (SS) для фронта уравнивания колонки с белком А без преобразования.

[0025] На **ФИГ. 5** представлен график распределения вероятностей НЕТР для фронта отмывки колонки с белком А без преобразования.

[0026] На **ФИГ. 6** представлен график распределения вероятностей SS для фронта отмывки колонки с белком А без преобразования.

[0027] На **ФИГ. 7** представлен график распределения вероятностей НЕТР для фронта уравнивания колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ).

[0028] На **ФИГ. 8** представлен график распределения вероятностей SS для фронта уравнивания колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ).

[0029] На **ФИГ. 9** представлен график распределения вероятностей НЕТР для фронта отмывки колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ).

[0030] На **ФИГ. 10** представлен график распределения вероятностей SS для фронта отмывки колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ).

[0031] На **ФИГ. 11** представлен график распределения вероятностей среднего ( $V_m$ ) для фронта уравнивания колонки с белком А.

[0032] На **ФИГ. 12** представлен график распределения вероятностей среднего ( $V_m$ ) для фронта отмывки колонки с белком А.

[0033] На **ФИГ. 13** представлена контрольная карта НЕТР для фронта уравнивания колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ). UCL, верх. конт. гр. = верхняя контрольная граница; LCL, ниж. конт. гр. = нижняя контрольная граница. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0034] На **ФИГ. 14** представлен график временного распределения НЕТР для фронта уравнивания колонки с белком А. UCL получена из преобразованных данных, показанных на **ФИГ. 13**.

[0035] На **ФИГ. 15** представлена контрольная карта SS для фронта уравнивания колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ). Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0036] На **ФИГ. 16** представлен график временного распределения SS для фронта уравнивания колонки с белком А. UCL получена из преобразованных данных, показанных на **ФИГ. 15**.

[0037] На **ФИГ. 17** показана контрольная карта для среднего ( $V_m$ ) для фронта уравнивания колонки с белком А. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0038] На **ФИГ. 18** представлена контрольная карта НЕТР для фронта отмывки колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ). Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0039] На **ФИГ. 19** представлен график временного распределения НЕТР для фронта отмывки колонки с белком А. UCL получена из преобразованных данных, показанных на **ФИГ. 18**.

[0040] На **ФИГ. 20** представлена контрольная карта SS для фронта отмывки колонки с белком А с преобразованием через натуральный логарифм ( $\lambda=0$ ). Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0041] На **ФИГ. 21** представлен график временного распределения SS для фронта отмывки колонки с белком А. UCL получена из преобразованных данных, показанных на **ФИГ. 20**.

[0042] На **ФИГ. 22** показана контрольная карта среднего ( $V_m$ ) для фронта отмывки колонки с белком А. Нумерованные точки на графиках показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0043] На **ФИГ. 23** представлен график временного распределения результатов

НЕТР для фронта уравнивания колонки с белком А с прямым захватом продукта (DPC) для разных набивок колонок.

[0044] На **ФИГ. 24** представлен график временного распределения результатов НЕТР для фронта отмывки DPC-колонки с белком А для разных набивок колонок.

[0045] На **ФИГ. 25** представлен график временного распределения результатов НЕТР для фронта уравнивания DPC-колонки с белком А для разных хроматографических установок.

[0046] На **ФИГ. 26** представлен график временного распределения результатов НЕТР для фронта отмывки DPC-колонки с белком А для разных хроматографических установок.

[0047] На **ФИГ. 27** представлен график, отображающий средний поток для уравнивания DPC-колонки с белком А. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0048] На **ФИГ. 28** представлен график среднего давления до колонки во время уравнивания. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0049] На **ФИГ. 29** представлен график средней скорости отмывочного потока для фронта отмывки DPC-колонки с белком А. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

На **ФИГ. 30** представлен график среднего давления отмывки для фронта отмывки DPC-колонки с белком А. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0050] На **ФИГ. 31** представлен график, отображающий значение НЕТР до и после изменения скорости отмывочного потока. Нумерованные точки на карте показывают выбросы и/или очевидные тенденции для результатов НЕТР на основании 1, 2 и 3-го правил Шухарта, т. е. 1 обозначает 1 точку за рамками контрольных границ, 2 обозначает 8 точек с одной стороны от центральной линии, а 3 обозначает 6 последовательных точек с постоянным возрастанием или убыванием.

[0051] На **ФИГ. 32** представлен график временного распределения значений НЕТР для двух различных набивок колонок с белком А, которые оценивали для фронта уравнивания по 45 партиям REMICADE® (инфликсимаба).

[0052] На **ФИГ. 33** представлен график временного распределения значений НЕТР для фронта уравнивания колонки SP-Sepharose High Performance (SPHP). Контрольные границы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом.

[0053] На **ФИГ. 34** представлен график временного распределения НЕТР для фронта отмывки колонки SPHP водой для инъекций (WFI). Контрольные границы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом.

[0054] На **ФИГ. 35** представлен график временного распределения НЕТР для фронта раствора для хранения колонки SPHP. Контрольные границы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом.

[0055] На **ФИГ. 36** представлен график временного распределения НЕТР для фронта уравнивания колонки Q2. Контрольные границы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом.

[0056] На **ФИГ. 37** представлен график временного распределения НЕТР для фронта десорбционного уравнивания колонки Q2. Контрольные границы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом.

[0057] На **ФИГ. 38** представлен график временного распределения НЕТР для фронта раствора для хранения колонки Q2. Контрольные границы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом.

[0058] На **ФИГ. 39** представлен общий обзор 10 стадий процесса производства устекинумаба.

[0059] На **ФИГ. 40** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 3 с использованием аффинной хроматографической колонки MabSelect™ с белком А для фронта отмывки 2, формирующегося во время очистки STELARA® (устекинумаба).

[0060] На **ФИГ. 41** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 3 с использованием аффинной хроматографической колонки MabSelect™ с белком А для фронта, формирующегося во время элюирования STELARA® (устекинумаба).

[0061] На **ФИГ. 42** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 3 с использованием аффинной хроматографической колонки MabSelect™ с белком А для фронта, формирующегося во время элюирования SIMPONI® (голимумаба). DPC обозначает прямой захват продукта SIMPONI® (голимумаб) на колонке MabSelect™ с белком А.

[0062] На **ФИГ. 43** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 3 с использованием аффинной хроматографической колонки MabSelect™ с белком А для фронта, формирующегося при санитарной обработке с помощью гуанидина-НСl. DPC обозначает прямой захват продукта SIMPONI® (голимумаб) на колонке MabSelect™ с белком А.

[0063] На **ФИГ. 44** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 3 с использованием аффинной хроматографической колонки MabSelect™ с белком А для фронта, формирующегося при отмывке после санитарной обработке с помощью 0,1 М цитрата натрия, pH 3,5. DPC обозначает прямой захват продукта SIMPONI® (голимумаб) на колонке MabSelect™ с белком А.

[0064] На **ФИГ. 45** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 6, фронт катионообменной хроматографической колонки UNOsphere S™, образующийся во время загрузки обработанного растворителем/детергентом (S/D) материала, содержащего SIMPONI® (голимумаб). PS1 означает стадию 1 тонкой очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке UNOsphere S™.

[0065] На **ФИГ. 46** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 6, фронт катионообменной хроматографической колонки UNOsphere S™, образующийся при элюировании SIMPONI® (голимумаба). PS1 означает стадию 1 тонкой очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке UNOsphere S™.

[0066] На **ФИГ. 47** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 6, фронт катионообменной хроматографической колонки UNOsphere S™, образующийся при десорбции колонки. PS1 означает стадию 1 тонкой очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке UNOsphere S™.

[0068] На **ФИГ. 48** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 7, фронт анионообменной хроматографической колонки Q Sepharose™ XL, образующийся при очистке гидроксидом натрия. PS2 означает стадию 2 тонкой очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке Q Sepharose™ XL.

[0069] На **ФИГ. 49** представлена диаграмма, отражающая результаты НЕТР для стадии 7, фронт анионообменной хроматографической колонки Q Sepharose™ XL, образующийся при десорбции колонки. PS2 означает стадию 2 тонкой очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке Q Sepharose™ XL.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0070] Настоящее описание относится к улучшенной процедуре квалификационной оценки для отслеживания изменений в слоях набивки хроматографических колонок во время повторяющегося использования хроматографических колонок в способах производства для получения антител к IL-12/IL-23p40, например антител к IL-12/IL-23p40 STELARA® (устекинумаб), и конкретных фармацевтических композиций данного антитела. Данный способ, независимо от масштаба, представляет собой практическое средство оценки эффективности функционирования колонки в течение всего срока ее службы.

[0071] Эффективность разделения хроматографической колонки часто характеризуют с использованием модели теоретических хроматографических тарелок. При использовании этого подхода хроматографическая колонка рассматривается как состоящая из ряда стадий или теоретических тарелок. Каждая тарелка представляет собой расстояние, на котором компоненты пробы достигают равновесия между подвижной и неподвижной

фазами (см. Deemter, Zuiderweg and Klinkenberg, Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography, *Chem. Engng. Sci.* 5: 271-289 (1956), которая полностью включена в данный документ путем ссылки). Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок в колонке  $N_p$ , причем большее количество тарелок в колонке означает большее число равновесных состояний, меньшую дисперсию хроматографических полос, более узкие пики и более качественное разделение. Чем больше число тарелок в данной колонке, тем меньше высота тарелки. Соответственно, эффективность колонки также можно измерить путем вычисления высоты тарелки, которая называется «высотой, эквивалентной теоретической тарелке», или НЕТР. При использовании такого подхода чем меньше значение НЕТР, тем выше эффективность разделения на колонке.

**[0072]** НЕТР вычисляют путем деления длины хроматографической колонки  $L$  на число теоретических тарелок  $N_p$ .

$$HETP=L/N_p$$

Число теоретических тарелок в колонке исторически определяли путем изучения хроматографического пика после импульсной инъекции с использованием следующей формулы:

$$N_p = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2,$$

где  $t_R$  представляет собой время удержания, а  $w_{1/2}$  представляет собой ширину пика на половине высоты. Однако такой подход не обеспечивает точного измерения эффективности колонки, когда форма пика, используемого для вычисления  $N_p$ , отклоняется от гауссова распределения. Чтобы компенсировать недостаток чувствительности, для оценки деформации пика используют второй показатель - асимметрию. Этот показатель сравнивает ширину пика по переднему и заднему фронтам на уровне 10% от максимальной высоты пика. Как описано выше, эта модель имеет недостаточную чувствительность для обнаружения изменений в эффективности колонки.

**[0073]** Способ, описанный в настоящем документе, обеспечивает альтернативное и более точное измерение НЕТР, которое основано на гамма-распределении по одному или более переходным фронтам подвижной фазы, которые возникают во время повседневной эксплуатации хроматографической колонки. Таким образом, настоящее описание относится к способу эксплуатации хроматографической колонки. Данный способ включает получение выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования хроматографической колонки с набиванием колонки. Этот способ дополнительно включает определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для восходящего переходного фронта или формулы Ib для нисходящего переходного фронта.

$$C = 1 - \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \quad \text{Формула Ia}$$

или

$$C = \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \quad \text{Формула Ib}$$

В формуле Ia и формуле Ib  $C$  представляет собой выходной сигнал колонки для данного  $V$ ,  $V$  представляет собой накопленный поток, деленный на объем колонки, а  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$  представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для определения кривой. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), рассчитывают для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$ ,

$$\text{где НЕТР} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad \text{Формула II}$$

$$\mu = k\theta + V_i$$

$$\sigma = \sqrt{k\theta^2}, \text{ и}$$

$L$ —длина колонки.

**[0074]** Качество набивания хроматографической колонки оценивают на основе вычисленного значения НЕТР. На основании оценки качества колонки определяют, что хроматографическая колонка является приемлемой для последующего использования или ее необходимо кондиционировать, заменить или перенабить.

**[0075]** Способ квалификационного исследования колонки, описанный в настоящем документе, можно применять к любой хроматографической колонке. К примерам хроматографических колонок относятся, без ограничений, колонки, используемые для жидкостной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, молекулярной эксклюзионной хроматографии, сверхкритической жидкостной хроматографии, газовой хроматографии, эксклюзионной хроматографии размеров, обращенно-фазовой хроматографии, двухмерной хроматографии, быстрой белковой хроматографии (FPLC), противоточной хроматографии, хиральной хроматографии, водной нормально фазной хроматографии (ANP), хроматографии смешанного режима и псевдоаффинной хроматографии. К примерам материалов для набивания колонки относятся, без ограничений, набивочный материал для аффинной хроматографии (например, набивочный материал для аффинной хроматографии на основе белка А или белка G), набивочный материал для ионообменной хроматографии (например, катионного обмена (карбоксиметилловые смолы), анионного обмена (аминоэтиловые смолы) и набивочный материал для смешанного режима), набивочный материал для адсорбционной хроматографии (например, силикагель или набивочный материал на основе оксида алюминия), набивочный материал для гидрофобной хроматографии (например, фенилсефароза, аза-аренофильные смолы или м-аминофенилбороновая кислота), набивочный материал для металло-хелатной аффинной

хроматографии (например, Ni(II)- и Cu(II)-аффинные материалы), набивочный материал для эксклюзионной хроматографии (например, набивочный материал для геле-электрофореза или капиллярного электрофореза) или набивочный материал для молекулярной эксклюзионной хроматографии (например, полистирол).

**[0076]** Описанный в настоящем документе способ может применяться во время повседневного использования хроматографической колонки, например во время выделения, очистки или идентификации химических или биологических соединений в пробе. Такие соединения могут включать в себя, например, без ограничений, белки (например, антитела и их фрагменты), нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, малые органические молекулы, малые неорганические молекулы, вирусы, липосомы и гибридные формы или варианты любых таких соединений.

**[0077]** В отличие от предыдущих способов квалификационного исследования колонки, где было необходимо выводить колонку из технологического процесса для исследования, например, способа импульсного впрыска, описанный в настоящем документе способ осуществляется во время обычной эксплуатации колонки. В настоящем способе используется преимущество процессов перехода подвижной фазы, включая технологические буферы и растворы с различными свойствами, которые происходят во время обычного процесса очистки на колонке.

**[0078]** В соответствии со способом настоящего изобретения «подвижная фаза» при колоночной хроматографии представляет собой жидкую фазу, которая окружает неподвижный материал набивания хроматографической колонки и проходит через него. Во время эксплуатации хроматографической колонки состав и свойства подвижной фазы часто изменяются с каждой стадией процесса, например, уравнивания, отмывок и т. д. Изменения свойств подвижной фазы можно обнаружить и измерить в элюате, т. е. в подвижной фазе, которая элюируется из колонки после прохождения через неподвижную фазу. В настоящем документе термин «выходной сигнал колонки» означает сигнал о физическом или химическом свойстве элюата из подвижной фазы, который детектируется при элюировании элюата из колонки. Физическим или химическим свойством, обеспечивающим выходной сигнал колонки, может быть любое свойство, такое как pH, проводимость, поглощение света, флуоресценция, заряд, концентрация соли, поляриметрия, показатель преломления, электрохимическая реакция, отношение массы к заряду и т. п., которое можно измерить с помощью любого типичного хроматографического детектора. К хроматографическим детекторам, приемлемым для измерения выходного сигнала колонки, относятся, без ограничений, масс-спектрометр, инфракрасный спектрометр, видимый спектрометр, ультрафиолетовый спектрометр, инфракрасный спектрометр с преобразованием Фурье, пламенно-ионизационный детектор, детектор рассеяния лазерного излучения под малым углом, детектор с диодной матрицей, флуоресцентный спектрометр, детектор pH, детектор электропроводности, электрохимический детектор и рефрактометрический детектор.

**[0079]** Выходной сигнал колонки получают на элюате. Кроме того, для сбора

выходного сигнала колонки также собирают «накопленный поток». «Накопленный поток» представляет собой общий объем текучей среды, элюируемой из колонки с течением времени. Это значение делят на объем колонки и выражают в объемах колонки.

**[0080]** Переходный фронт образуется в результате изменения выходного сигнала колонки относительно накопленного потока. Переходный фронт возникает в результате последовательного применения в отношении колонки разных подвижных фаз, имеющих одно или более разных свойств (например, проводимость, рН и т. д.). В соответствии со способом, описанным в настоящем документе, выходной сигнал колонки на переходном фронте может быть нормализован, чтобы иметь максимальное значение 1 и минимальное значение 0. В настоящем документе термин «нисходящий переходный фронт» представляет собой переход подвижной фазы, в котором начальная подвижная фаза имеет более высокий уровень выходного сигнала колонки, например проводимости, чем уровень выходного сигнала колонки для следующей введенной подвижной фазы.

**[0081]** В настоящем документе термин «восходящий переходный фронт» представляет собой переход подвижной фазы, в котором начальная подвижная фаза имеет более низкий уровень выходного сигнала колонки, например проводимости, чем уровень выходного сигнала колонки для следующей введенной подвижной фазы.

**[0082]** Переходный фронт создается путем нанесения первой подвижной фазы на хроматографическую колонку с набиванием колонки для квалификационного исследования в ходе эксплуатации колонки. Через какое-то время после добавления первой подвижной фазы, например когда первая подвижная фаза начинает элюироваться, в хроматографическую колонку с набиванием колонки добавляют вторую подвижную фазу, имеющую детектируемый выходной сигнал колонки, отличный от сигнала первой подвижной фазы. Переходный фронт обнаруживают путем сбора выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока через два или более интервала подачи подвижной фазы, когда происходит смена между первой и второй подвижными фазами.

**[0083]** В одном варианте осуществления выходной сигнал колонки для первой и второй подвижных фаз отличается на величину, превышающую шум сигнала. В одном варианте осуществления разница в выходном сигнале колонки между первой и второй подвижными фазами на 5% выше фонового шума сигнала. В другом варианте осуществления разница в выходном сигнале колонки между первой и второй подвижными фазами по меньшей мере на 10% выше фонового шума сигнала. В другом варианте осуществления разница в выходном сигнале колонки между первой и второй подвижными фазами по меньшей мере на 15% выше фонового шума сигнала.

**[0084]** В одном варианте осуществления выходной сигнал колонки, детектируемый на переходном фронте, представляет собой проводимость. В этом варианте осуществления выходной сигнал колонки для первой и второй подвижных фаз предпочтительно отличается по меньшей мере на 1 мкСм/см, по меньшей мере на 10 мкСм/см, по меньшей мере на 100 мкСм/см, по меньшей мере на 1 мСм/см или более чем на 1 мСм/см.

**[0085]** В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки, детектируемый

на переходном фронте, представляет собой рН. В этом варианте осуществления выходной сигнал колонки для первой и второй подвижных фаз предпочтительно отличается по меньшей мере на 0,05 единицы рН, по меньшей мере на 0,1 единицы рН, по меньшей мере на 1 единицу рН, по меньшей мере на 2 единицы рН или более чем на 2 единицы рН.

**[0086]** В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки, детектируемый на переходном фронте, представляет собой поглощение в УФ- и видимом спектре. В этом варианте осуществления выходной сигнал колонки для первой и второй подвижных фаз предпочтительно отличается по меньшей мере на 0,01 единицы поглощения, по меньшей мере на 0,1 единицы поглощения, по меньшей мере на 0,5 поглощения, по меньшей мере на 0,8 единицы поглощения или более чем на 0,8 единицы поглощения.

**[0087]** В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки, детектируемый на переходном фронте, представляет собой поглощение в инфракрасном спектре. В этом варианте осуществления выходной сигнал колонки для первой и второй подвижных фаз предпочтительно отличается по меньшей мере на 1 процент пропускания, по меньшей мере на 10 процентов пропускания, по меньшей мере на 20 процентов пропускания, по меньшей мере на 30 процент пропускания или более чем на 30 процентов пропускания.

**[0088]** В одном варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы получают путем перехода от подвижной фазы, содержащей денатурирующий агент, к подвижной фазе, содержащей неденатурирующий агент. В другом варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы получают путем перехода от подвижной фазы, содержащей неденатурирующий агент, к подвижной фазе, содержащей денатурирующий агент.

**[0089]** В другом варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы получают путем перехода от щелочного состояния подвижной фазы к нейтральному или более кислотному состоянию подвижной фазы. В альтернативном варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы получают путем перехода от кислотного состояния подвижной фазы к нейтральному или более щелочному состоянию подвижной фазы.

**[0090]** В другом варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы получают путем перехода от подвижной фазы, содержащей органический растворитель, к водной подвижной фазе. В альтернативном варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы получают путем перехода от водной подвижной фазы к подвижной фазе, содержащей органический растворитель.

**[0091]** Выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока собирают с разными интервалами по ходу переходного фронта подвижной фазы. Предпочтительно, чтобы выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока собирались на всем протяжении переходного фронта подвижной фазы, от минимального выходного сигнала колонки до максимального выходного сигнала колонки, или наоборот. В одном варианте осуществления выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока собирают с нерегулярными интервалами, например, их собирают при обнаружении изменения выходного сигнала колонки. В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки

и накопленные параметры потока собирают с равными интервалами на всем протяжении переходного фронта подвижной фазы. Например, в одном варианте осуществления выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока собирают с интервалами в 1 секунду на всем протяжении переходного фронта подвижной фазы. В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока собирают с интервалами 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 секунд на всем протяжении переходного фронта подвижной фазы.

**[0092]** В одном варианте осуществления данные о выходном сигнале колонки нормализуют, как описано выше, путем установки максимального значения в 1 и минимального значения в 0 за период анализа. Поток также преобразуют в объемы колонок, чтобы стандартизовать для сравнения разных набиваний колонок. К этим данным применяют кумулятивную функцию гамма-распределения (CDF) для построения кривой, лучше всего соответствующей полученным точкам данных. Гамма-CDF определяется тремя значениями: параметром формы  $k$ ; параметром масштаба  $\theta$  (тета); и параметром смещения  $V_i$  по следующей формуле I:

$$C=f(V, k, \theta, V_i) \text{ Формула I}$$

Согласно формуле I  $C$  представляет собой выходной сигнал колонки для данного  $V$ ,  $V$  представляет собой накопленный поток, деленный на объем колонки. Формула Ia, полученная из формулы I, используется для определения значения функции гамма-распределения для восходящего переходного фронта.

$$C = 1 - \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \text{ Формула Ia,}$$

где

$\Gamma$  представляет собой верхнюю неполную гамма-функцию, а

$\gamma$  представляет собой нижнюю неполную гамма-функцию.

В альтернативном варианте формула Ib, которая также получена из формулы I, используется для определения значения функции гамма-распределения для нисходящего фронта перехода.

$$C = \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \text{ Формула Ib}$$

**[0093]** На ФИГ. 1 А представлен график, демонстрирующий пример данных нормализованного выходного сигнала колонки и объемов колонки, собранные для переходного фронта в колонке. Для подгонки кривой к данным использовали формулу Ia.

**[0094]** Наиболее приемлемые параметры гамма-CDF определяют путем манипулирования значениями  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$  для нахождения параметров, которые формируют модельную кривую с наименьшей суммой квадратов отклонений от данных. Эту кривую подгоняют к точкам данных по всему фронту перехода с генерированием модели с наилучшей аппроксимацией. Параметры  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$  этой кривой используют для расчета количества тарелок  $N_p$  в колонке или высоты тарелки, т. е. НЕТР, в качестве индикаторов эффективности колонки.

**[0095]** Количество тарелок  $N_p$  рассчитывают, исходя из среднего  $\mu$  и дисперсии  $\sigma^2$  для в модельной кривой. Среднее и дисперсию получают из кривой следующим образом:

$$\text{Среднее, } \mu = k\theta + V_i$$

$$\text{Дисперсия, } \sigma^2 = k\theta^2$$

Количество тарелок рассчитывают на основании среднего и дисперсии следующим образом:

$$\text{Количество тарелок, } N_p = \mu^2 / \sigma^2$$

НЕТР рассчитывают так, как описано выше, на основании длины колонки  $L$  в сантиметрах, деленной на количество тарелок  $N_p$ , следующим образом.

$$\text{НЕТР} = \frac{L}{N_p} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} \cdot L = \frac{k\theta^2 L}{(k\theta + V_i)}$$

**[0096]** На ФИГ. 1В показан тот же график, что и на ФИГ. 1А, с определенными параметрами среднего  $\mu$  и дисперсии  $\sigma^2$ .

**[0097]** Для оценки аппроксимации данных моделью, рассчитанной, как описано в настоящем документе, также могут быть определены среднее ( $V_m$ ), сумма квадратов ( $SS$ ) и мода.  $SS$  является прямым показателем отклонения модельной кривой от технологических данных, на основании которых она выведена. Значение  $V_m$  представляет собой измерение центральной точки перехода в единицах объемов колонки. Это значение должно быть близким к единице, поскольку для смены буфера обычно требуется один объем колонки. Как правило, форма фронта не влияет на среднее. Среднее используется для проверки автоматических расчетов на наличие ошибок. Например, низкое значение может указывать на ошибку сбора данных и может потребовать дополнительного исследования для подтверждения результата. Мода соответствует объему, при котором скорость изменения является наибольшей. Она будет равна среднему, если кривая перехода симметрична. Как правило, переходы асимметричны, и мода меньше среднего.

**[0098]** В дополнение к НЕТР из параметра  $k$  (форма) можно вычислить другие факторы, включая деформацию ( $\gamma_1$ ), которая является мерой, связанной с асимметрией, и куртозис ( $\gamma_2$ ), который является мерой остроты пика. Эти факторы можно использовать для выявления изменений в эффективности колонки.

$$\gamma_1 = \frac{2}{\sqrt{k}}$$

$$\gamma_2 = \frac{6}{k}$$

**[0099]** В соответствии со способом, описанным в настоящем документе, выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока собирают для одного и того же перехода подвижной фазы при каждом запуске процесса колонки и вычисляют НЕТР по гамма-CDF. Для вычисления НЕТР также можно извлечь и использовать данные за прошлые периоды, сгенерированные колонками, используемыми на той же стадии процесса и при том же масштабе. Данные НЕТР объединяют для определения тенденций в значениях НЕТР соответствующих переходов при исторических или текущих операциях с целью

определения верхней и нижней контрольных границ значения НЕТР. Контрольными границами являются высокие и низкие значения НЕТР, которые определяют диапазон приемлемых значений НЕТР, т. е. значений НЕТР, которые соответствуют приемлемой эффективности колонки. Эти верхняя и нижняя контрольные границы могут быть установлены на основании статистической оценки. Например, в одном варианте осуществления верхнюю и нижнюю контрольные границы устанавливают путем вычисления среднего  $\pm 2$ , 3 или 4 среднеквадратичных отклонения. В другом варианте осуществления верхнюю и нижнюю контрольные границы устанавливают путем вычисления среднего  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонения, как описано в примерах в настоящем документе. В другом варианте осуществления верхняя и нижняя контрольные границы могут быть установлены с помощью вычисления доверительного интервала по историческим данным. В одном варианте осуществления верхнюю и нижнюю контрольные границы устанавливают путем расчета 95%, 96%, 97% или 98% доверительного интервала по историческим данным. В другом варианте осуществления верхняя и нижняя контрольные границы могут быть установлены с помощью вычисления 99% доверительного интервала по историческим данным.

**[0100]** Верхнюю и нижнюю контрольные границы используют для выявления изменений эффективности колонки со временем и в процессе эксплуатации. Как правило, любое увеличение НЕТР, которое превышает верхнюю контрольную границу, может указывать на снижение эффективности колонки. Если во время регулярного мониторинга колонок наблюдается неблагоприятная тенденция по НЕТР или выход за контрольные границы, для обеспечения качества продукта в данной партии следует оценить качество элюируемого продукта, эффективность процесса хроматографии на колонке и/или удаление примесей. При невыполнении любых установленных критериев по качеству продукта или характеристикам колонки перед выдачей разрешения на эксплуатацию необходимо выполнить соответствующее корректирующее действие, такое как кондиционирование, перенабивка или замена колонки, и квалификационное исследование. Способы кондиционирования хроматографической колонки для перераспределения набивочного слоя могут варьироваться в зависимости от используемой колонки, но хорошо известны специалистам в данной области.

**[0101]** Мониторинг эффективности колонки во время эксплуатации может быть основан на одной или более чем одной смене фазы, которые обычно входят в протокол очистки. Предпочтительно мониторинг основан на значениях НЕТР, рассчитанных на основе гамма-CDF для двух, трех или более смен фаз в ходе протокола очистки.

**[0102]** Как отмечается ниже, расчет НЕТР с применением способа GDТА, описанного в настоящем документе, для определения эффективности колонки может быть основан на исторических данных, собранных от колонок, применяемых на одной стадии технологического процесса и в том же масштабе. Для оценки также можно использовать данные, полученные на квалифицированной модели технологической стадии с уменьшенным масштабом. Это позволяет оценить качество работы колонки в сравнении с

квалифицированными данными.

**[0103]** На результаты способа GDTA, описанного в настоящем документе, могут влиять такие факторы, как скорость потока (эффект Ван-Деемтера), потенциальные взаимодействия буферов и дополнительный объем колонки, и их следует учитывать при установке контрольных границ для GDTA. Переходные фронты, включенные в GDTA, предпочтительно удовлетворяют определенным критериям, таким как измерения обоих сигналов подвижной фазы на выходе колонки выполнены в одном масштабе, разница в измеренных сигналах между подвижными фазами на выходе колонки превышает фоновый шум сигнала, а взаимодействие между подвижной фазой и смолой является единообразным и воспроизводимым.

**[0104]** Общие критерии оценки колонок, используемые для их одобрения и мониторинга во время эксплуатации, должны определяться на основе оценки исторических данных, специфичных для оборудования и типа смолы. Примеры типовых измеряемых параметров качества продукта и характеристик процесса, которые могут быть использованы для оценки взаимосвязи между результатами квалификационного исследования и рабочими характеристиками, приведены в таблице 1. Типовые измеряемые параметры качества и характеристик процесса, используемые для оценки, не ограничиваются перечисленными в таблице 1; данный список предназначен для применения лишь в качестве справочного руководства, и следует ориентироваться на конкретные требования оцениваемого проекта и стадии технологического процесса. Технические описания и критерии приемлемости, относящиеся к качеству продукта и характеристикам процесса, являются специфичными для проекта и определяются на основе требований технологического процесса.

Таблица 1. Типовые измеряемые параметры качества и эффективности стадий

Параметр	Способ анализа
Объем до элюирования (CV)	
Объем элюирования (CV)	
Выход стадии	
Хроматографический профиль	Визуальный осмотр
Концентрация элюата	A280
Элюированный мономер	ДВ-ЭКС-ВЭЖХ
Технологические примеси	Различные анализы

**[0105]** Способ анализа гамма-распределения перехода, описанный в настоящем документе, можно осуществлять в режиме реального времени в процессе эксплуатации колонки. Данный способ включает получение посредством вычислительного устройства для квалификационного исследования хроматографической колонки выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования

хроматографической колонки с набиванием колонки; определение посредством вычислительного устройства для квалификационного исследования хроматографической колонки модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для восходящего переходного фронта или формулы Ib для нисходящего переходного фронта.

$$C = 1 - 1/\Gamma(k) \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \text{ Формула Ia}$$

или

$$C = 1/\Gamma(k) \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \text{ Формула Ib.}$$

В формулах Ia и Ib  $C$  представляет собой выходной сигнал колонки для данного  $V$ ,  $V$  представляет собой накопленный поток, деленный на объем колонки, а  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$  представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для определения кривой. Способ дополнительно включает вычисление посредством вычислительного устройства для квалификационного исследования хроматографической колонки высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$ ,

$$НЕТР = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L$$

Формула II,

где

$$\mu = k\theta + V_i,$$

$$\sigma = \sqrt{k\theta^2},$$

$L$ =длина колонки.

[0106] Способ дополнительно включает оценку посредством вычислительного устройства для квалификационного исследования хроматографической колонки качества набивания хроматографической колонки на основе указанного рассчитанного значения НЕТР. На основании этой оценки оператор хроматографической колонки может определить, можно ли повторно использовать хроматографическую колонку или ее нужно заменить, перенабить или кондиционировать перед следующей эксплуатацией колонки.

[0107] На ФИГ. 2 представлена схема, на которой представлен обзор способа и системы эксплуатации хроматографической колонки и оценки эффективности колонки в режиме реального времени, как описано в настоящем документе. Как показано на ФИГ. 2 и описано выше, система **10** включает в себя хроматографическую колонку **12**, используемую для разделения биомолекул, введенных в колонку в виде сложной смеси, т. е. элюента **14**, детектор **20**, который обнаруживает выходной сигнал колонки в элюате при его элюировании из хроматографической колонки, коммуникационный интерфейс **22**, который передает сигнал/данные от детектора **20**, вычислительное устройство **24** для

квалификационного исследования колонки и сервер 26.

[0108] Хроматографическую колонку 12 заполняют проницаемым, полупроницаемым или непроницаемым твердофазным материалом для набивания колонки. Приемлемые хроматографические колонки и материал для набивания колонки описаны выше. Элюент 14, содержащий интересующие биомолекулы, вводят в хроматографическую колонку 12. Подвижную фазу 16 также вводят в хроматографическую колонку 12. Подвижная фаза 16 облегчает разделение биомолекул на неподвижной фазе хроматографической колонки 12 и элюирование биомолекул в элюат через выход 18 хроматографической колонки. В соответствии со способом, описанным в настоящем документе, подвижная фаза 16 содержит последовательно введенные буферы колонки и/или отмывочные реагенты, которые отличаются друг от друга одним или более физическими или химическими свойствами, как описано ниже, например, такими как рН, электропроводность, концентрация соли. Эти различия в одном или более физических или химических свойствах обнаруживаются в элюате с помощью детектора 20.

[0109] Детектор 20 соединен с выходом 18 хроматографической колонки 12. Соответственно, детектор 20 отслеживает и собирает выходной сигнал в элюате хроматографической колонки 12. Приемлемые детекторы и свойства элюата, т. е. выходной сигнал колонки, определяются, как описано выше. Детектор соединен с блоком 22 коммуникационного интерфейса, который передает данные, собранные детектором 20 (например, выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока), на вычислительное устройство 24 для квалификационного исследования колонки для обработки данных и/или на сервер 26 для хранения.

[0110] Вычислительное устройство 24 для квалификационного исследования колонки системы, описанной в настоящем документе, может представлять собой любое вычислительное устройство, например компьютер, персональное вычислительное устройство, смартфон, и т. п., включающее в себя центральный процессор (ЦП) или процессор 32, запоминающее устройство 30, сетевой интерфейс 28 и пользовательский интерфейс 34, которые соединены друг с другом шиной 36 или другим каналом связи. Вычислительное устройство 24 для квалификационного исследования колонки может включать в себя другие типы и/или количества компонентов и элементов в других конфигурациях.

[0111] Процессор 32 в вычислительном устройстве 24 для квалификационного исследования колонки выполняет программу из сохраненных команд для одного или более аспектов анализа гамма-распределения перехода, описанного и проиллюстрированного посредством примеров, приведенных в настоящем документе, хотя можно использовать и другие типы и/или количества устройств обработки, и процессор 32 может выполнять другие типы и/или количества запрограммированных команд. В одном варианте осуществления процессор 32 расположен исключительно на вычислительном устройстве 24 для квалификационного исследования колонки. В другом варианте осуществления процессор распределен между детектором 20 и вычислительным устройством 24 для

квалификационного исследования колонки. Например, в одном варианте осуществления процессор **32** вычислительного устройства **24** для квалификационного исследования колонки содержит микроконтроллер, соединенный с детектором. В таком варианте осуществления микроконтроллер служит встроенным процессором, выполненным с возможностью соотнесения или преобразования данных, собранных детектором **20**, в цифровой сигнал, передаваемый на вычислительное устройство **24** для квалификационного исследования колонки. Микроконтроллер, соединенный с одним или более детекторами, способен выполнять одну или более функций обработки вычислительного устройства **24** для квалификационного исследования колонки.

[0112] Эти запрограммированные команды для одного или более аспектов GDТА, описанных в настоящем документе, хранятся в запоминающем устройстве **30** вычислительного устройства **24** для квалификационного исследования колонки. В качестве запоминающего устройства **30** можно использовать множество различных типов устройств хранения, таких как оперативное запоминающее устройство (ОЗУ) и/или постоянное запоминающее устройство (ПЗУ) в синхронизируемом процессорном устройстве, или гибкий диск, жесткий диск, CD ROM, DVD ROM или другой машиночитаемый носитель, считываемый магнитной, оптической или другой системой считывания и записи, соединенной с процессором **32** в вычислительном устройстве **24** для квалификационного исследования колонки.

[0113] Сетевой интерфейс **28** вычислительного устройства **24** для квалификационного исследования колонки функционально соединяет и облегчает обмен данными между вычислительным устройством **24** для квалификационного исследования колонки и детектором **20**, хотя можно использовать и другие типы и/или количества коммуникационных сетей или систем с другими типами и/или количествами соединений и конфигураций.

[0114] Вычислительное устройство **24** для квалификационного исследования колонки может дополнительно содержать пользовательский интерфейс **34**, такой как, например, графический пользовательский интерфейс, сенсорный пользовательский интерфейс или веб-интерфейс пользователя. Пользовательский интерфейс выполнен с возможностью отображения для пользователя информации о параметрах качества хроматографической колонки. Пользовательский интерфейс также выполнен с возможностью получения от пользователя входных данных относительно параметров хроматографической колонки.

[0115] Сервер **26**, изображенный на ФИГ. 2, может представлять собой одно или множество вычислительных устройств, каждое из которых включает в себя ЦП или процессор, запоминающее устройство и сетевой интерфейс, соединенные друг с другом посредством шины или другого соединения, аналогичного описанному для вычислительного устройства **24** для квалификационного исследования колонки. Сервер **26** может включать в себя другие типы и/или количества компонентов и элементов в других конфигурациях.

[0116] Коммуникационный (-ые) интерфейс (-ы) 22 системы, описанной в настоящем документе, может (могут) включать в себя одну или более локальных сетей (LAN) и/или глобальных сетей (WAN). Исключительно в качестве примера коммуникационный (-ые) интерфейс (-ы) 22 может (могут) использовать протокол TCP/IP через Ethernet и стандартные для отрасли протоколы, включая протокол передачи гипертекстов (HTTP) и/или безопасный HTTP (HTTPS), хотя можно использовать и другие типы и/или количества коммуникационных сетей.

[0117] Другой аспект настоящего изобретения относится к машиночитаемому носителю для долговременного хранения, имеющему хранящиеся на нем команды, относящиеся к квалификационному исследованию хроматографических колонок с использованием анализа гамма-распределения перехода. Данные команды включают исполняемый код, который при выполнении процессором приводит к тому, что процессор выполняет стадии, включающие получение выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования хроматографической колонки с набиванием колонки; определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia, описанной выше, для восходящего переходного фронта или формулы Ib, описанной выше, для нисходящего переходного фронта; вычисление высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II, описанной выше, и описанных выше параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$ ; и оценку качества набивания хроматографической колонки на основе указанного вычисленного значения НЕТР.

[0118] Другой аспект настоящего изобретения относится к устройству для квалификационной оценки хроматографической колонки. Это устройство включает в себя процессор и запоминающее устройство, соединенное с процессором. Запоминающее устройство выполнено с возможностью выполнения запрограммированных команд, хранящихся в запоминающем устройстве. Эти команды включают сбор выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования хроматографической колонки с набиванием колонки; определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для восходящего переходного фронта или формулы Ib для нисходящего переходного фронта, как описано выше; вычисление высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II, описанной выше, и параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения  $k$ ,  $\theta$  и

$V_i$ , описанных выше, и оценку качества набивания хроматографической колонки на основе указанного вычисленного значения НЕТР.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1. Применение анализа гамма-распределения перехода в квалификационном исследовании хроматографических колонок с белком А, использованных при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

##### Общее описание

**[0119]** Процесс производства терапевтического антитела REMICADE® (инфликсимаб) включает несколько стадий, четыре из которых включают хроматографическую очистку. Анализ гамма-распределения перехода (GDТА) применяли в квалификационном исследовании колонок применительно к двум или трем переходам на каждом из этих стадии эксплуатации колонки. В настоящем примере описано применение способа GDТА на стадии очистки с помощью колонки с белком А, применяемой при производстве REMICADE® (инфликсимаба). Процесс очистки включает два переходных фронта, т. е. уравнивание и промежуточную отмывку, которые подходят для GDТА, как описано в настоящем документе.

**[0120]** GDТА выполняли для 129 фронтов при последовательной очистке 69 партий REMICADE® (инфликсимаба), включая 60 фронтов уравнивания и 69 фронтов отмывки. Анализ гамма-распределения для фронта проводили одновременно с производством, и он не влиял на процесс производства. Все производство, мониторинг и контроль осуществляли с использованием современных эффективных процедур. При очистке REMICADE® (инфликсимаба) колоночной хроматографией регистрировали электропроводность (т. е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т. е. накопленный поток).

**[0121]** В дополнение к применению GDТА при эксплуатации колонки в режиме реального времени также собирали и анализировали, как описано в настоящем документе, исторические данные для 285 партий, обработанных в течение четырех предыдущих лет. Набор данных включал 253 фронта уравнивания и 285 фронтов отмывки, всего 538 исторических фронтов. Фронты уравнивания не получали для 32 партий, для которых перед использованием была выполнена предварительная санитарная обработка. Этот набор данных был выбран для получения равномерного распределения по сроку службы колонок, и они представляют 11 набивок колонок.

##### Протокол GDТА

**[0122]** Для каждого переходного фронта при очистке на колонке с белком А, т. е. при отмывке и уравнивании, регистрировали электропроводность и накопленный поток. Определение начальной точки проводили путем оценки тенденций по электропроводности и давлению до колонки, чтобы определить момент, в который колонка введена в эксплуатацию. Была создана электронная таблица, которую настроили на получение данных о потоке и электропроводности с сервера с использованием расчетного интервала 10 секунд для продолжительности фронта.

[0123] Данные по электропроводности нормализовали путем установки максимального значения в 1 и минимального значения в 0 и пропорционального масштабирования других точек. Кроме того, поток преобразовывали в объемы колонки.

[0124] Начальное значение гамма-CDF вычисляли, используя те же исходные параметры  $k$ ,  $\theta$ ,  $V_i$ , что и в модуле PI.  $V_i$  вычитали из каждого значения объема в члене  $x$  функции гамма-распределения. Чтобы нормализовать электропроводность, которая возрастала в процессе очистки, значения электропроводности устанавливали в 0 для объемов менее  $V_i$ , а максимальное значение устанавливали в 1.

[0125] Для каждой точки объема вычисляли разность (ошибку) между каждым значением электропроводности и аппроксимацией модели. Кроме того, вычисляли сумму квадратов ошибки в диапазоне от 0,5 до 1,8 CV. Рассчитывали параметры наилучшей аппроксимации функцией гамма-CDF с использованием решающего алгоритма Excel с нахождением значений  $k$ ,  $\theta$  и  $V_i$ , которые давали модельную кривую с минимальным значением суммы квадратов, используя

$$C = 1 - 1/\Gamma(k) \gamma(k, \frac{V-V_i}{\theta}) \text{ Формула Ia.}$$

Решающий алгоритм запускали на 10 000 итераций с использованием нелинейного способа GRG с ограничениями  $k \geq 0,0001$  и  $V_i \geq 0$  для обеспечения наилучшего приближения.

Из итоговых значений  $k, \theta$  и  $V_i$  рассчитывали следующие параметры:

среднее ( $V_m$ ),  $\mu = k\theta + V_i$ ,

дисперсия,  $\sigma^2$  (сигма-квадрат) =  $k\theta^2$ ,

мода =  $(k-1)\theta + V_i$ ,

$$HETP = \frac{L}{N_p} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L = \frac{k\theta^2 L}{(k\theta + V_i)^2}$$

Для каждого фронта рассчитывали среднюю скорость потока и давление до колонки за период от 0,5 до 1,8 CV.

Анализ и оценка критериев приемлемости

Нормальность

[0126] Результаты по HETP и SS как для фронта уравнивания, так и для фронта отмывки оценивали на нормальность путем построения графика распределения вероятностей. На графиках распределения вероятностей (ФИГ. 3-12) точки данных (результаты HETP или SS) представляют собой фактическое кумулятивное распределение, наблюдаемое в пробе. Линии представляют аппроксимированное суммарное распределение, а также верхний и нижний доверительные интервалы на основе нормального распределения с использованием оцениваемых параметров пробы. Шкалу процентилей преобразуют таким образом, что аппроксимированное распределение образует прямую линию. Каждый из наборов данных HETP и SS ограничивается значением 0 на нижнем конце, однако модель нормального распределения предполагает отрицательные значения. Полученные графики распределения вероятности демонстрируют

криволинейную форму. См. ФИГ. 3-6. Таким образом, результаты лучше аппроксимировать с использованием логарифмического преобразования. См. ФИГ. 7-10, где приведен график распределения вероятности для логарифмически преобразованных данных.

[0127] Данные по среднему ( $V_m$ ) также оценивали на нормальность. На ФИГ. 11 и ФИГ. 12 показано, что данные соответствуют нормальному распределению и имеют всего несколько выпадающих значений. Таким образом, преобразование не требуется. Этот параметр не был указан в протоколе, но обеспечивает полезное подтверждение достоверности аппроксимации с помощью кривой. Из этого анализа также будут получены контрольные границы для данного параметра.

Выявление выпадающих значений и причин вариабельности

[0128] Чтобы выявить выпадающие значения и оценить вариабельность результатов, строили контрольные карты для каждого параметра. См. ФИГ. 13-22. В контрольных картах использовали преобразованные данные для НЕТР и SS, где применяли преобразование через натуральный логарифм. Эти данные также нанесены на график временного распределения с преобразованной верхней контрольной границей для каждого из этих параметров.

[0129] *НЕТР*. В результатах НЕТР наблюдается ряд выпадающих значений и тенденций как для фронта уравнивания, так и для фронта отмывки. Кроме того, на ФИГ. 13 и ФИГ. 18 показаны тенденции в данных на основе 1, 2 и 3-го правил Шухарта, представленные квадратами на фигурах и пронумерованные указанным ниже образом.

#### **1 Правило**

**есть**

- 1 1 точка за пределами контрольных границ.
- 2 8 точек на одной стороне от центральной линии.
- 3 6 последовательных точек с непрерывным нарастанием или убыванием.

Партии, связанные с этими отклонениями, не исключали из анализа, поскольку они отражают приемлемый процесс.

[0130] На обеих контрольных картах (ФИГ. 13 и ФИГ. 18) показано несколько нарушений 1-го правила Шухарта, также превышающих контрольные границы. В каждом случае проблемы идентифицировали и исправляли путем повторного кондиционирования колонок.

[0131] Как и ожидалось, несколько прогонов удовлетворяли критериям 2-го и 3-го правил из-за вариаций в набивках колонок. Для дальнейшей оценки тенденций были подготовлены графики временного распределения, где данные были сгруппированы по набивкам колонок (ФИГ. 23-24) и хроматографическим установкам (ФИГ. 25-26). Эти графики показывают, что большая часть вариабельности по особой причине относится к деградации колонки и некоторым отдельным отклонениям. Тенденции увеличения НЕТР для фронта уравнивания очевидны для каждой колонки с течением времени (ФИГ. 23). Отклонения, наблюдаемые для фронта отмывки, по-видимому, ограничиваются той или

иной установкой в разное время (ФИГ. 26), что указывает на то, что в установке может присутствовать источник вариабельности характеристик колонки.

**[0132]** *Сумма квадратов (SS)*. Сумма квадратов представляет собой меру того, насколько гамма-распределение соответствует технологическим данным. Эта мера позволит провести проверку достоверности результата НЕТР. Контрольные карты для преобразованных данных показаны на ФИГ. 15 и ФИГ. 20 для уравнивания и отмывки соответственно. Этот показатель имеет только верхнюю контрольную границу. На ФИГ. 15 показаны 6 точек, где верхняя контрольная граница превышена. Четыре из них связаны с более высоким уровнем НЕТР. В партии 880572М присутствовало нарушение потока при прохождении фронта, которое привело к высокому значению SS, но не повлияло на НЕТР.

Оценка потока и давления

**[0133]** Для выявления всех выпадающих значений для набора данных оценивали среднюю скорость потока и давление до колонки. Выявляли взаимосвязь между различиями и оценивали результаты.

**[0134]** На ФИГ. 27-30 показаны тенденции по скорости потока и давлению до колонки. Графики показывают превосходный контроль скорости потока на каждой из стадий. Скорость потока отмывки при данной оценке изменялась. Давление до колонки отражает вариации, относящиеся к установке и колонкам, но оно по существу стабильно в пределах некоторого диапазона. На ФИГ. 31 показано, что изменение скорости потока отмывочной среды не оказывает существенного влияния на значение НЕТР.

Контрольные границы для колонки с белком А

НЕТР

**[0135]** Значение НЕТР непосредственно связано с эффективностью колонки, а также зависит от других факторов в системе, которые могут увеличивать дисперсию. Результат должен быть  $> 0$ . Контрольные границы для НЕТР лучше всего определять с использованием преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом ( $\lambda=0$ ), как показано на ФИГ. 13 для фронта уравнивания и на ФИГ. 18 для фронта отмывки. На контрольных картах показаны контрольные границы для преобразованных данных, рассчитанные посредством Minitab с применением  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонений (см. также таблицу 2 ниже). Среднеквадратичное отклонение определяется на основании скользящего размаха среднего. Для учета вариаций эффективности колонки в течение срока ее службы был выбран скользящий размах 100. Верхнюю и нижнюю контрольные границы подвергают обратному преобразованию ( $e^x$ ) для определения контрольных границ для непреобразованных данных.

**[0136]** График временного распределения результатов НЕТР и контрольных границ для каждого фронта показан на ФИГ. 14 и ФИГ. 19. На основе исторического анализа ожидается, что эксплуатация в пределах этих границ приведет к получению приемлемых хроматографических характеристик. Значения выше верхних контрольных границ могут указывать на проблемы с потоком в колонке, и их необходимо дополнительно изучить. Значения ниже нижних контрольных границ могут указывать на ошибку вычисления.

### Сумма квадратов (SS)

**[0137]** SS является показателем того, насколько модель гамма-распределения соответствует технологическим данным. Этот показатель применяют для проверки того, чтобы значения НЕТР, рассчитанные с помощью способа GDТА, соответствовали технологическим данным. Нижняя граница отсутствует, и результат должен быть  $> 0$ . Верхнюю контрольную границу для SS лучше всего определять с использованием преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом ( $\lambda=0$ ), как показано на ФИГ. 15 для фронта уравнивания и на ФИГ. 20 для фронта отмывки. На контрольных картах показаны контрольные границы для преобразованных данных, рассчитанные посредством Minitab с применением  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонений. Среднеквадратичное отклонение определяется на основании скользящего размаха среднего. Для учета вариаций эффективности колонки в течение срока ее службы был выбран скользящий размах 100. Контрольные карты демонстрируют верхние контрольные границы для преобразованных данных, которые подвергали обратному преобразованию с получением значений 0,050 и 0,989 для фронтов уравнивания и отмывки соответственно (см. таблицу 2). График временного распределения результатов SS и контрольных границ для каждого фронта показан на ФИГ. 16 и ФИГ. 20. Результаты в пределах границ гарантируют соответствие модели данным, а также историческим результатам. Если результат выходит за пределы этого диапазона, существует вероятность появления особых причин.

### Среднее

**[0138]** Среднее добавляли в качестве второго показателя точности модели с гамма-распределением. Среднее представляет собой теоретический центр массы фронта, и оно всегда должно составлять около 1 объема колонки, если в системе нет других факторов, вызывающие смещение, таких как большой дополнительный объем колонки или взаимодействие между подвижной фазой и смолой. Средне как для фронта уравнивания, так и фронта отмывки имеет приблизительно нормальное распределение и не нуждается в преобразовании, см. ФИГ. 11 и ФИГ. 12. Среднее фронта уравнивания имеет плотное распределение в районе 1,07 объема колонки (CV), при этом с обеих сторон присутствуют некоторые выпадающие значения, а с верхней стороны они приближаются к 1,2, см. ФИГ. 17. Фронт отмывки демонстрирует несколько большую вариацию и имеет центр на 0,99 CV, при этом несколько выпадающих вниз значений приближаются к 0,8, см. ФИГ. 22. Рекомендуется применять контрольные границы от 0,80 до 1,20 CV для среднего у обоих фронтов (см. таблицу 2). Это приемлемо, поскольку среднее не является мерой эффективности колонки, а используется для проверки правильности анализа. Более жесткие контрольные границы могут привести к ненужной чувствительности этой проверки.

Таблица 2. Рекомендуемые контрольные границы для НЕТР, SS и среднего при очистке на колонке с белком А при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

Фронт	Параметр	Верх. конт. гр.	Ниж. конт. гр.
-------	----------	-----------------	----------------

Равновесное состояние	НЕТР	0,243	0,027
	SS	0,050	Н/д
	Среднее	1,20	0,80
Отмывка	НЕТР	0,352	0,011
	SS	0,989	Н/д
	Среднее	1,20	0,80

Пример 2. Применение анализа гамма-распределения перехода для выявления субоптимальной эффективности хроматографических колонок с белком А, использованных при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

**[0139]** Процесс производства терапевтического антитела REMICADE® (инфликсимаб) включает несколько стадий, четыре из которых включают хроматографическую очистку. Анализ гамма-распределения перехода (GDТА) применяли в квалификационном исследовании колонок применительно к двум или трем переходам на каждом из этих стадии эксплуатации колонки. В настоящем примере описано применение способа GDТА на стадии очистки с помощью колонки с белком А, применяемой при производстве REMICADE® (инфликсимаба). Процесс очистки включает два переходных фронта, т. е. уравнивание и промежуточную отмывку, которые подходят для GDТА, как описано в настоящем документе.

**[0140]** GDТА выполняли для 45 фронтов уравнивания при последовательной очистке 45 партий REMICADE® (инфликсимаба), включая 23 партии, обработанные на набивке колонок 883333M001, и 22 партии, обработанные на набивке колонок 885473M001. Анализ гамма-распределения для фронта проводили одновременно с производством, и он не влиял на процесс производства. Все производство, мониторинг и контроль осуществляли с использованием современных эффективных процедур. При очистке REMICADE® (инфликсимаба) колоночной хроматографией регистрировали электропроводность (т. е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т. е. накопленный поток).

**[0141]** Тенденция для результатов НЕТР по фронту уравнивания для 45 партий (см. ФИГ. 32) показала значительную разницу между набивками колонок. Существующие средства контроля для оценки колонок не выявили никаких различий между двумя набивками колонок. Оценка выхода партии показала значимое ( $p=0,001$ ) различие между партиями, обработанными на двух набивках колонок, и выход оказался на 4,3% ниже в случае набивки колонок с более высокими значениями НЕТР. Проводили оценку других потенциальных факторов, и они не показали корреляции с разницей в выходе. Таким образом, из анализа сделан вывод, что разница в эффективности колонок привела к снижению выхода продукта. На основе этих данных перед продолжением использования колонку с меньшим выходом подвергали кондиционированию для улучшения набивания колонки. Этот пример демонстрирует чувствительность способа GDТА при оценке качества хроматографической колонки.

Пример 3. Применение анализа гамма-распределения перехода в квалификационном исследовании колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии SP-Sepharose, использованных при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

#### Общее описание

**[0142]** Как описано выше, процесс производства REMICADE® (инфликсимаба) включает несколько стадий, четыре из которых включают хроматографическую очистку. В настоящем примере описано применение способа GDТА на стадии очистки с помощью колонки SP-Sepharose High Performance (SPHP), применяемой при производстве REMICADE® (инфликсимаба). Колонка SPHP представляет собой колонку для катионообменной хроматографии. Процесс очистки включает три переходных фронта, т. е. уравнивание, отмывку WFI и использование раствора для хранения, которые подходят для GDТА, как описано в настоящем документе.

**[0143]** GDТА выполняли на 69 фронтах при очистке 23 партий REMICADE® (инфликсимаб), включая 23 фронта уравнивания, отмывки WFI и отмывки раствором для хранения. Анализ гамма-распределения для фронта проводили одновременно с производством, и он не влиял на процесс производства. Все производство, мониторинг и контроль осуществляли с использованием современных эффективных процедур. При очистке REMICADE® (инфликсимаба) колоночной хроматографией регистрировали электропроводность (т. е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т. е. накопленный поток).

**[0144]** В дополнение к применению GDТА при эксплуатации колонки в режиме реального времени также собрали и проанализировали, как описано в настоящем документе, исторические данные для 189 переходных фронтов, обработанных в течение четырех предыдущих лет. Набор данных включал 64 фронта уравнивания, 63 фронта для отмывки WFI и 62 фронта отмывки раствором для хранения. Этот набор данных был выбран для получения равномерного распределения по сроку службы колонок, и они представляют 6 набивок колонок.

**[0145]** GDТА для фронтов колонки SPHP проводили так, как описано в примере 1 выше. Этот анализ позволил получить значения HETP, SS и среднего для каждого фронта. Контрольные границы, полученные для каждого из этих трех параметров на основании статистической оценки, приведены ниже в таблице 3.

#### Контрольные границы для колонки SPHP

##### HETP

**[0146]** Значение HETP непосредственно связано с эффективностью колонки, а также зависит от других факторов в системе, которые могут увеличивать дисперсию. Результат должен быть  $> 0$ . Контрольные границы для HETP лучше всего определяются с использованием преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом ( $\lambda=0$ ). Контрольные границы для преобразованных данных вычисляли посредством Minitab с применением  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонений. Среднеквадратичное отклонение определяется на основании скользящего размаха среднего. Для учета вариаций

эффективности колонки в течение срока ее службы был выбран скользящий размах 25. Верхнюю и нижнюю контрольные границы подвергают обратному преобразованию ( $e^x$ ) для определения контрольных границ для необработанных данных. График временного распределения результатов НЕТР и контрольные границы для каждого фронта показан на ФИГ. 33 (фронт уравнивания) ФИГ. 34 (фронт отмывки WFI) и ФИГ. 35 (фронт раствора для хранения). На основе исторического анализа ожидается, что эксплуатация в пределах этих границ приведет к получению приемлемых хроматографических характеристик. Значения выше верхних контрольных границ могут указывать на проблемы с потоком в колонке, и их необходимо дополнительно изучить. Значения ниже нижних контрольных границ могут указывать на ошибку вычисления.

#### Сумма квадратов (SS)

[0147] SS является показателем того, насколько модель гамма-распределения соответствует технологическим данным. Этот показатель будет применяться для проверки того, чтобы значения НЕТР, рассчитанные с помощью способа GDТА, соответствовали технологическим данным. Нижняя граница отсутствует, и результат должен быть  $> 0$ . Верхняя контрольная граница для НЕТР лучше всего определяется с использованием преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом ( $\lambda=0$ ). Контрольные границы для преобразованных данных вычисляли посредством Minitab с применением  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонений. Среднеквадратичное отклонение определяется на основании скользящего размаха среднего. Для учета вариаций эффективности колонки в течение срока ее службы был выбран скользящий размах 100. Верхние контрольные границы для преобразованных данных были подвергнуты обратному преобразованию с получением значений 0,110 для фронта уравнивания, 0,027 для фронта отмывки WFI и 0,073 для фронта раствора хранения (см. таблицу 3). Результаты в пределах границ гарантируют соответствие модели данным, а также историческим результатам. Если результат выходит за пределы этого диапазона, существует вероятность появления особых причин.

#### Среднее

[0148] Среднее добавляли в качестве второго показателя точности модели с гамма-распределением. Среднее представляет собой теоретический центр массы фронта, и оно всегда должно составлять около 1 объема колонки, если в системе нет других факторов, вызывающие смещение, таких как большой дополнительный объем колонки или взаимодействие между подвижной фазой и смолой. Среднее для фронтов уравнивания, отмывки WFI и раствора хранения имеет неправильное распределение и не выигрывает от преобразования. Рекомендуется применять контрольные границы от 0,80 до 1,20 CV для среднего у каждого из фронтов (см. таблицу 3). Это приемлемо, поскольку среднее не является мерой эффективности колонки, а используется для проверки правильности анализа. Ожидается, что эти границы будут достаточными для выявления значительных отклонений от ожидаемых результатов расчета. Более жесткие контрольные границы приводят к ненужной чувствительности этой проверки и наблюдаемым различиям для

каждой набивки колонки.

Таблица 3. Рекомендуемые контрольные границы для HETP, SS и среднего при очистке на колонке SPHP при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

Фронт	Параметр	Верх. конт. гр.	Ниж. конт. гр.
Равновесное состояние	HETP	0,081	0,018
	SS	0,110	Н/д
	Среднее	1,20	0,80
Отмывка WFI	HETP	0,066	0,015
	SS	0,027	Н/д
	Среднее	1,20	0,80
Отмывка	HETP	0,056	0,020
	SS	0,073	Н/д
	Среднее	1,20	0,80

Пример 4. Применение анализа гамма-распределения перехода в квалификационном исследовании колонок Q2, использованных при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

#### Общее описание

[0149] В настоящем примере описано применение способа GDТА на стадии очистки с помощью вторичной анионообменной колонки (Q2), применяемой при производстве REMICADE® (инфликсимаба). Колонка Q2 представляет собой колонку для анионообменной хроматографии. Процесс очистки включает в себя три переходных фронта, т. е. уравнивание, десорбцию и раствор для хранения, которые подходят для GDТА, как описано в настоящем документе.

[0150] GDТА выполняли на 68 фронтах, включая 23 фронта уравнивания и десорбции и 22 фронта раствора для хранения. Анализ гамма-распределения для фронта проводили одновременно с производством, и он не влиял на процесс производства. Все производство, мониторинг и контроль осуществляли с использованием современных эффективных процедур. При очистке REMICADE® (инфликсимаба) колоночной хроматографией регистрировали электропроводность (т. е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т. е. накопленный поток).

[0151] В дополнение к применению GDТА при эксплуатации колонки в режиме реального времени также собрали и проанализировали, как описано в настоящем документе, исторические данные для 324 переходных фронтов, обработанных в течение четырех предыдущих лет. Набор данных включал 121 фронт уравнивания, 124 фронта десорбции и 79 фронтов раствора для хранения. Этот набор данных был выбран для получения равномерного распределения по сроку службы колонок, и они представляют 10 набивок колонок.

**[0152]** GDТА для фронтов колонки Q2 проводили так, как описано в примере 1 выше. Этот анализ позволил получить значения HETP, SS и среднего для каждого фронта. Контрольные границы, полученные для каждого из этих трех параметров на основании статистической оценки, приведены ниже в таблице 4.

Контрольные границы для колонки Q2

HETP

**[0153]** Значение HETP непосредственно связано с эффективностью колонки, а также зависит от других факторов в системе, которые могут увеличивать дисперсию. Результат должен быть  $> 0$ . Контрольные границы для HETP лучше всего определяются с использованием преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом ( $\lambda=0$ ). Контрольные границы для преобразованных данных вычисляли посредством Minitab с применением  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонений. Среднеквадратичное отклонение определяется на основании скользящего размаха среднего. Для учета вариаций эффективности колонки в течение срока ее службы был выбран скользящий размах 100. Верхнюю и нижнюю контрольные границы подвергают обратному преобразованию ( $e^x$ ) для определения контрольных границ для непреобразованных данных.

**[0154]** График временного распределения результатов HETP и контрольные границы для каждого фронта показаны на ФИГ. 36 (фронт уравнивания) ФИГ. 37 (фронт десорбции) и ФИГ. 38 (фронт раствора для хранения). На основе исторического анализа ожидается, что эксплуатация в пределах этих границ приведет к получению приемлемых хроматографических характеристик. Значения выше верхних контрольных границ могут указывать на проблемы с потоком в колонке, и их необходимо дополнительно изучить. Значения ниже нижних контрольных границ могут указывать на ошибку вычисления.

Сумма квадратов (SS)

**[0155]** SS является показателем того, насколько модель гамма-распределения соответствует технологическим данным. Этот показатель будет применяться для проверки того, чтобы значения HETP, рассчитанные с помощью способа GDТА, соответствовали технологическим данным. Нижняя граница отсутствует, и результат должен быть  $> 0$ . Верхняя контрольная граница для HETP лучше всего определяется с использованием преобразования Бокса - Кокса с натуральным логарифмом ( $\lambda=0$ ). Контрольные границы для преобразованных данных вычисляли посредством Minitab с применением  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонений. Среднеквадратичное отклонение определяется на основании скользящего размаха среднего. Для учета вариаций эффективности колонки в течение срока ее службы был выбран скользящий размах 100. Среднеквадратичное отклонение определяли по агрегированным данным фронта раствора для хранения, поскольку способ скользящего размаха давал большее среднеквадратичное отклонение. Контрольные границы представлены ниже в таблице 4. Результаты в пределах границ гарантируют соответствие модели данным, а также историческим результатам. Если результат выходит за пределы этого диапазона, существует вероятность появления особых причин.

## Среднее

**[0156]** Среднее добавляли в качестве второго показателя точности модели с гамма-распределением. Среднее представляет собой теоретический центр массы фронта, и оно всегда должно составлять около 1 объема колонки, если в системе нет других факторов, вызывающие смещение, таких как большой дополнительный объем колонки или взаимодействие между подвижной фазой и смолой. Среднее для фронтов уравнивания, десорбции и раствора для хранения имеет неправильное распределение и не выигрывает от преобразования. Рекомендуется применять контрольные границы от 0,80 до 1,20 CV для среднего у каждого из фронтов (см. таблицу 4). Это приемлемо, поскольку среднее не является мерой эффективности колонки, а используется для проверки правильности анализа. Ожидается, что эти границы будут достаточными для выявления значительных отклонений от ожидаемых результатов расчета. Более жесткие контрольные границы приводят к ненужной чувствительности этой проверки и наблюдаемым различиям для каждой набивки колонки.

Таблица 4. Рекомендуемые контрольные границы для HETP, SS и среднего при очистке на колонке Q2 при производстве REMICADE® (инфликсимаба)

Фронт	Параметр	Верх. конт. гр.	Ниж. конт. гр.
Равновесное состояние	HETP	0,125	0,003
	SS	0,344	Н/д
	Среднее	1,20	0,80
Отмывка WFI	HETP	0,184	0,019
	SS	0,156	Н/д
	Среднее	1,20	0,80
Отмывка	HETP	0,265	0,024
	SS	0,691	Н/д
	Среднее	1,20	0,80

Пример 5. Способы производства для получения STELARA® (устекинумаба)

## Предпосылки

**[0157]** STELARA® (устекинумаб) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело G1-каппа, которое связывается с высокой аффинностью и специфичностью с общей субъединицей р40 человеческих цитокинов интерлейкина (IL)-12 и IL-23. Устекинумаб содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11; аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ

ID NO:5 и SEQ ID NO:6. Связывание устекинумаба с субъединицей IL-12/23p40 блокирует связывание IL-12 или IL-23 с рецептором IL-12R $\beta$ 1 на поверхности натуральных киллеров и Т-клеток CD4<sup>+</sup>, ингибирует внутриклеточную сигнализацию IL-12 и IL-23 и последующую активацию и продукцию цитокинов. Аномальная регуляция IL-12 и IL-23 ассоциируется со множеством иммуноопосредованных заболеваний.

**[0158]** На сегодняшний день устекинумаб получил разрешение на продажу во всем мире, включая страны Северной Америки, Европы, Южной Америки и Азиатско-Тихоокеанского региона, для лечения взрослых пациентов, включая пациентов с хроническим бляшковидным псориазом средней или тяжелой степени и/или активным псориазическим артритом и болезнью Крона (CD). Устекинумаб также оценивают в исследовании фазы 3 для лечения активной системной красной волчанки (СКВ).

Последовательности

Пример последовательностей антител к IL-12/IL-23p40, STELARA® (устекинумаб)

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:1)

TYWLG

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:2)

IMSPVDSDIRYSPSFQG

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:3)

RRPGQGYFDF

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:4)

RASQGISSWLA

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:5)

AASSLQS

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:6)

QQYNIYPYT

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела к IL-12/IL-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:7)

1	EVQLVQSG	VKKPGESL	SCKGSGYSF	<u>TYWLGWVRQ</u>	PGKGLDWIG	<u>MSPVDSDIR</u>
	AE	KI	T	M	I	Y
61	<u>SPSFQGQVT</u>	SVDKSITTA	LQWNSLKA	<u>TAMYVCARR</u>	<u>PGQGYFDF</u>	QGTLVTVS
	M	Y	SD	<u>R</u>	WG	S

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела к IL-12/IL-23p40(подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:8)

1 DIQMTQSP LSASVGDRV ITCRASQGIS SWLAWYQQ EKAPKSLIY ASSLQSGVP  
 SS T KP A S  
 61 RFSGSGSG FTLTISSLQP EDFATYYCQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKR  
 TD Q

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к IL-12/IL-23p40(подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:10)

1 EVQLVQS VKKPGESL SCKGSGYSF TYWLGWVR PGKGLDWI MSPVSDIR  
 GAE KI T QM GI Y  
 61 SPSFQGQV SVDKSITTA LQWNSLKA TAMYYCARR PGQGYFDF QGTLVTVSS  
 TM Y SD R WG S  
 121 STKGPSVF APSSKSTSG TAALGCLV YFPEPVTVS NSGALTSGV TFAVLQSS  
 PL G KD W H G  
 181 LYSLSSVV PSSSLGTQT ICNVNHKPS TKVDKRVPE SCDKTHTCP CPAPELLGG  
 TV Y N K P P  
 241 SVFLFPPK DTLMISRTP VTCVVVDV EDPEVKFNW VDGVEVHN TKPREEQY  
 PK E SH Y AK NS  
 301 TYRVVSV LHQDWLNG YKCKVSNK PAPIEKTISK AKGQPREPQ YTLPPSRDE  
 LTV KE AL V L  
 361 TKNQVSL VKGFYPSDI VEWESNGQ NNYKTTTPV DSDGSFFLY KLTVDKSR  
 TCL A PE L S WQ  
 421 QGNVFSC HEALHNHY KSLSLSPGK  
 SVM TQ

Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к IL-12/IL-23p40(подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:11)

1 DIQMTQSP LSASVGDR ITCRASQGIS SWLAWYQQ EKAPKSLI ASSLQSGV  
 SS VT KP YA PS  
 61 RFSGSGSG FTLTISSLQP EDFATYYC YNIYPYTFG GTKLEIKR AAPSVFIF  
 TD QQ Q TV PP  
 121 SDEQLKSG SVVCLLNN PREAKVQW DNALQSGN ESVTEQDS STYLSST  
 TA FY KV SQ KD LT  
 181 LSKADYEK VYACEVTH LSSPVTKSF RGEC  
 HK QG N

Аминокислотная последовательность IL-12

Аминокислотная последовательность человеческого интерлейкина (IL)-12 с альфа-и бета-субъединицами: (SEQ ID NO:9)

1 RNLPVATP GMFPCLHN NLLRAVSN QKARQTLEF PCTSEEIDH DITKDKTST

	DP	SQ	ML	Y	E	V
61	EACLPLELT	NESCLNSRE	SFITNGSCL	SRKTSFMM	CLSSIYEDL	MYQVEFKT
	K	T	A	AL	K	MN
121	AKLLMDPK	IFLDQNMLA	IDELMQAL	NSETVPQKS	LEEPDFYKT	IKLCILLHAF
	RQ	V	NF	S	K	
181	RIRAVTIDR	MSYLNASI	LKKDVYVV	DWYPDAPG	VVLTCDTP	DGITWTLDQ
	V	WE	EL	EM	EE	S
241	SEVLGSGKT	TIQVKEFGD	GQYTCHKG	VLSHLLLL	KKEDGIWS	ILKDQKEPK
	L	A	GE	H	TD	N
301	KTFLRCEA	YSGRFTCW	TTISTDLTFS	VKSSRGSSD	QGVTCGAA	SAERVRGDN
	KN	WL		P	TL	K
361	EYEYSVEC	DSACPAEE	LPIEVMVD	HKLKYENY	SFFIRDIKP	DPPKNLQLK
	QE	S	AV	TS		P
421	LKNSRQVE	WEYPDTWS	HSYFSLTFC	QVQGKSKR	KDRVFTDK	ATVICRKNA
	VS	TP	V	EK	TS	S
481	ISVRAQDRY	SSSWSEWA	PCS			
	Y	SV				

#### Кассеты рекомбинантной экспрессии

**[0159]** В настоящем изобретении применяются кассеты рекомбинантной экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту. Последовательность нуклеотидов, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело для применения в способе настоящему изобретению, можно использовать для конструирования кассеты рекомбинантной экспрессии, которую можно вводить по меньшей мере в одну желаемую клетку-хозяина. Кассета рекомбинантной экспрессии, как правило, содержит полинуклеотид, функционально связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют трансляцию полинуклеотида в предназначенной для нее клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот могут применяться как гетерологичные, так и негетерологичные (т. е. эндогенные) промоторы.

**[0160]** В некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, которые служат в качестве промотора, энхансера или других элементов, можно встраивать в соответствующее положение (выше, ниже или в интроне) негетерологичной формы полинуклеотида по настоящему изобретению таким образом, чтобы стимулировать или подавлять экспрессию полинуклеотида. Например, эндогенные промоторы можно изменять *in vivo* или *in vitro* путем мутации, делеции и/или замены.

#### Векторы и клетки-хозяева

**[0161]** Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают

выделенные молекулы нуклеиновых кислот, клеткам-хозяевам, которые получены методами генной инженерии с рекомбинантными векторами, и к получению по меньшей мере одного антитела к П-23 с помощью рекомбинантных методов, которые хорошо известны в данной области.

**[0162]** Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективный маркер, для размножения в клетке-хозяине. Как правило, плазмидный вектор вводят в осадок, такой как осадок фосфата кальция, или в комплекс с заряженным липидом. Если в качестве вектора используют вирус, его можно упаковать *in vitro* с помощью пригодной упаковывающей линии клеток, а затем вводить внутрь клеток-хозяев.

**[0163]** Вставку ДНК необходимо функционально связать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкторы дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области - сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодированная часть зрелых транскриптов с экспрессией конструкторами предпочтительно содержит иницирующий транскрипцию в начале и терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, причем для экспрессии клеток млекопитающих или эукариот предпочтительны UAA и UAG.

**[0164]** Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничений, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе (DHFR, патенты США № 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017, ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или глутаминсинтетазе (GS) (патенты США №: 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) для культуры эукариотических клеток и гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях или прокариотах (вышеуказанные патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Пригодные культуральные среды и условия для вышеуказанных клеток-хозяев известны в данной области. Приемлемые векторы, разумеется, известны специалистам в данной области. Введение векторного конструктора в клетку-хозяина может осуществляться путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных способов. Такие способы по существу общеизвестны и хорошо описаны в данной области.

**[0165]** По меньшей мере одно антитело, применяемое в способе по настоящему изобретению, можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как гибридный белок, и оно может включать не только сигналы секреции, но также и дополнительные гетерологичные функциональные области. Например, к N-концу антитела можно добавлять область дополнительных аминокислот, особенно заряженные аминокислоты, для повышения стабильности и персистенции антитела в клетке-хозяине, а также в ходе очистки или в ходе последующих манипуляций и хранения. Кроме того, к антителу по настоящему изобретению для упрощения очистки можно добавлять пептидные звенья.

Такие области можно удалять перед приготовлением готового антитела или по меньшей мере одного его фрагмента. Такие способы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, и эти способы общеизвестны и хорошо описаны в данной области.

**[0166]** Специалисты в данной области знают множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, применяемый в способе по настоящему изобретению. Альтернативно нуклеиновые кислоты можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем процедуры) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело. Такие способы хорошо известны в данной области, например, как описано в патентах США № 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 и 5,733,761.

**[0167]** К клеткам, используемым для получения антител, их определенных частей или вариантов, относятся клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто культивируют в виде клеточных монослоев, но клетки также можно адаптировать для выращивания в суспензии, например, во встряхиваемых колбах или биореакторах. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, и к ним относятся, например, COS-1 (например, ATCC® CRL1650), COS-7 (например, ATCC® CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, ATCC® CCL-10), BSC-1 (например, ATCC® CCL-26), клетки яичника китайского хомячка (CHO), Hep G2, P3X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, HeLa и т. п., которые можно получить, например, в American Type Culture Collection, г. Манассас, штат Вирджиния ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). В некоторых вариантах осуществления к клеткам-хозяевам относятся клетки CHO и клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки, например клетки CHO-K1, клетки P3X63Ag8.653 (ATCC® CRL-1580) и клетки Sp2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581).

**[0168]** Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничений, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5,168,062; 5,385,839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1-альфа (патент США № 5,266,491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А большого Т-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. Для получения нуклеиновых кислот или белков по настоящему изобретению можно использовать и другие известные и/или поставляемые клетки, например по каталогу American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)), либо из других известных или коммерческих источников.

**[0169]** В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор обычно встраивают последовательности полиаденилирования или терминации транскрипции. Например, в качестве последовательности терминации можно использовать

последовательность полиаденилирования из гена бычьего гормона роста. Возможно также добавление последовательностей для точного сплайсинга транскрипта. Примером сплайсинговой последовательности является интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al., Expression of a recombinant DNA gene coding for the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 45:773-781 (1983)). Кроме того, в вектор можно добавлять последовательности генов для контроля репликации в клетке-хозяине, известные в данной области.

#### Клеточные линии CHO

**[0170]** Несмотря на доступность нескольких других линий клеток млекопитающих, большинство производимых в настоящее время рекомбинантных терапевтических белков получают в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (Jayapal KP, et al. (Jayapal KP, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem Eng Prog.* 2007; 103:40-47; Kunert R, Reinhart D., Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(8):3451-61). К их преимуществам относятся, например, хороший рост в виде прикрепленных клеток или в суспензии, способность адаптироваться к бессывороточным средам и средам с определенным химическим составом, высокая продуктивность и сформированная история одобрения регулирующих органов на продукцию терапевтических рекомбинантных белков. Они также очень легко поддаются генетическим модификациям, и способы трансфекции клеток, экспрессии рекомбинантного белка и селекции клонов хорошо охарактеризованы. Клетки CHO также могут обеспечивать совместимые с человеческим организмом посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин «клетки CHO» включает, например, без ограничений, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-M, CHO-S, CHO GS knockout, а также их модификации и производные.

#### Клонирование и экспрессия в клетках CHO

**[0171]** Одним из векторов, часто используемых для экспрессии в клетках CHO, является pC4. Плазмида pC4 является производной от плазмиды pSV2-dhfr (ATCC® 37146). Плазмида содержит мышинный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника китайского хомячка или другие клетки, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексата. Амплификация генов DHFR в клетках, резистентных к метотрексату (MTX), хорошо описана (см., например, F. W. Alt, et al., Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); и M. J. Page and M. A. Sydenham, High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MTX, развивается устойчивость к этому лекарственному средству путем чрезмерного продуцирования фермента-мишени, DHFR, в результате амплификации гена DHFR. Если к гену DHFR присоединить второй ген, как правило, происходит его коамплификация и сверхэкспрессия. Специалистам в данной области известно, что такой подход можно использовать для разработки клеточных линий,

несущих более 1000 копий амплифицированного (-ых) гена (-ов). Затем, когда метотрексат отменяют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или более хромосом клетки-хозяина.

**[0172]** Плаزمид рС4 содержит для экспрессии интересующего гена сильный промотор длинного концевой повтора (ДКП) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., Functional analysis of the transcription control region located within the avian retroviral long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) плюс фрагмент, выделенный из энхансера немедленно раннего гена цитомегаловируса человека (CMV) (Boshart, et al., A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-530 (1985)). После промотора расположены сайты расщепления рестрикционных ферментов BamHI, XbaI и Asp718, которые позволяют интегрировать гены. Позади этих сайтов клонирования плазмиды содержит 3'-интрон и сайт полиаденилирования гена препроинсулина крысы. Для экспрессии также можно использовать другие высокоэффективные промоторы, например промотор бета-актина человека, ранние или поздние промоторы SV40 или длинные концевые повторы других ретровирусов, например ВИЧ и HTLV. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и подобные системы также можно использовать для регулируемой экспрессии белков в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования мРНК также можно использовать другие сигналы, например из гормона роста человека или генов глобинов. Стабильные клеточные линии, несущие интересующий ген, интегрированный в хромосомы, также можно отбирать после котрансфекции с селективным маркером, таким как gpt, G418 или гигромицин. Преимуществом является использование вначале более одного селективного маркера, например G418 плюс метотрексат.

#### Общие способы очистки

**[0173]** Антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 можно выделять из рекомбинантных клеточных культур и очищать хорошо известными способами, включая, без ограничений, например, очистку с помощью белка А, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

**[0174]** При использовании в настоящем документе термины «антитело» или «антитела» относятся к молекулам биоаналогов антител, утвержденным в соответствии с Законом о ценовой конкуренции и инновациях биологических лекарств 2009 г. (закон ВРСІ) и аналогичными законами и нормативами во всем мире. В соответствии с законом ВРСІ может быть продемонстрировано, что антитело является биоаналогом, если данные показывают, что оно является «очень схожим» с эталонным продуктом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и «ожидается», что оно даст тот же клинический результат, что и эталонный продукт, с точки зрения безопасности,

чистоты и активности (R. Dolinar, F. Lavernia, and S. Edelman. A GUIDE TO FOLLOW-ON BIOLOGICS AND BIOSIMILARS WITH A FOCUS ON INSULIN. *Endocrine Practice*: февраль 2018 г., Vol. 24, No. 2, pp. 195-204). Эти молекулы-биоаналоги антител предлагаются по сокращенной схеме утверждения, при которой заявитель полагается на клинические данные эталонного продукта изобретателя для получения одобрения регулирующих органов. По сравнению с исходным эталонным изобретенным антителом, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований, молекула-биоаналог антитела в настоящем документе называется «биопрепаратом второго эшелона». В соответствии с настоящим документом STELARA® (устекинумаб) представляет собой исходное эталонное изобретенное антитело к IL-12/23p40, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований. Устекинумаб доступен в продаже в США с 2009 г.

[0175] При использовании в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и сегмент Fd (т. е. участок *тяжелой цепи*, который включен в Fab-фрагмент). В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

#### Обзор производственного процесса

[0176] STELARA® (устекинумаб) производят в ходе 10-стадийного процесса, который включает непрерывное перфузионное культивирование клеток с последующей очисткой. Обзор производственного процесса представлен на ФИГ. 39.

[0177] Используемые в настоящем документе термины «культура», «культивирование», «культивированный» и «клеточная культура» относятся к популяции клеток, которая суспендирована в среде в условиях, приемлемых для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет очевидно из контекста обычным специалистам в данной области, эти термины, используемые в настоящем документе, также относятся к комбинации, включающей популяцию клеток и среду, в которой популяция суспендирована. Клеточная культура включает в себя, например, клетки, выращенные способами порционного культивирования, культивирования с подпиткой или

перфузионного культивирования клеток и т. п. В некоторых вариантах осуществления культура клеток представляет собой культуру клеток млекопитающих.

**[0178]** Клеточные линии для применения в настоящем изобретении включают клеточные линии млекопитающих, включая, без ограничений, клетки яичника китайского хомячка (клетки СНО), человеческие эмбриональные клетки почек (клетки НЕК), клетки почки новорожденного хомячка (клетки ВНК), клетки мышины миеломы (например, клетки NS0 и клетки Sp2/0) и клетки человеческой сетчатки (например, клетки PER.C6).

**[0179]** Используемые в настоящем документе термины «среда с заданным химическим составом», «среда с определенным химическим составом», «гибридная среда с определенным химическим составом» или «среда с определенным химическим составом для гибридом» относятся к синтетической среде для выращивания, в которой известен характер и концентрация всех компонентов. Среда с заданным химическим составом не содержит бактериальных, дрожжевых, животных или растительных экстрактов, сыворотки или плазмы животных, хотя они могут включать или не включать в себя отдельные компоненты растительного или животного происхождения (например, белки, полипептиды и т. д.). Среда с заданным химическим составом может содержать неорганические соли, такие как фосфаты, сульфаты и т. п., необходимые для поддержания роста. Источник углерода является заданным и, как правило, представляет собой сахар, такой как глюкоза, лактоза, галактоза и т. п., или другие соединения, такие как глицерин, лактат, ацетат и т. п. Хотя в некоторых средах с определенным химическим составом в качестве буфера также используют фосфатные соли, можно использовать другие буферы, такие как цитрат, триэтаноламин и т. п. К примерам доступных в продаже сред с заданным химическим составом относятся, без ограничений, среда ThermoFisher's CD Hybridoma Medium и среда CD Hybridoma AGT™ Medium, различные среды типа Dulbecco's Modified Eagle's (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), питательная смесь Ham's Nutrient Mixture (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), их комбинации и т. п. Способы получения сред с заданным химическим составом известны в данной области, например, из патентов США № 6,171,825 и 6,936,441, WO 2007/077217 и заявок на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770.

**[0180]** Используемый в настоящем документе термин «биореактор» относится к любому сосуду, используемому для выращивания клеточной культуры. Биореактор может быть любого размера, при условии что его можно использовать для культивирования клеток. В определенных вариантах осуществления такие клетки представляют собой клетки млекопитающих. Как правило, биореактор будет иметь объем по меньшей мере 1 литр и может иметь объем 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000 литров или более или любой промежуточный объем. Внутренние условия биореактора, в том числе, помимо прочего, pH и температуру, необязательно контролируют в течение периода культивирования. Биореактор может состоять из любого материала, который подходит для содержания культур клеток млекопитающих, суспендированных в среде в условиях культивирования, соответствующих настоящему изобретению, включая стекло, пластик

или металл. Используемый в настоящем документе термин «производственный биореактор» относится к готовому биореактору, используемому при производстве интересующего полипептида или гликопротеина. Объем производственного биореактора, как правило, составляет по меньшей мере 500 литров и может составлять 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000 литров или более или любой промежуточный объем. Специалист в данной области будет знать и сможет выбрать приемлемые биореакторы для применения на практике в настоящем изобретении.

**[0181]** Предварительное культивирование, размножение и продукцию устекинумаба выполняют на стадии 1 и стадии 2. На стадии 1 иницируют предварительное культивирование из одного или более флаконов из рабочего клеточного банка, содержащего трансфицированные клетки Sp2/0, экспрессирующие последовательности HC и LC устекинумаба, размножают клетки в культуральных флаконах, одноразовых культуральных мешках и затравочном биореакторе объемом 100 л. Клетки культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 500 л. На стадии 2 клеточную культуру перфузируют в производственном биореакторе объемом 500 л, используя систему удержания клеток с поволоконным фильтром и переменным тангенциальным потоком (ATF). Из системы ATF собирают пермеат клеточной культуры (урожай), клетки удерживают в биореакторе и культуру пополняют свежей средой. Урожай из одного или более производственных биореакторов объемом 500 л можно объединять на стадии 3. Урожай очищают с помощью аффинной хроматографии со смолой MabSelect с белком А. Полученный элюат прямого захвата продукта (DPC) замораживают до дальнейшей обработки.

**[0182]** Очистку устекинумаба с помощью DPC выполняют на 4-8-й стадиях с помощью ионообменной хроматографии и других стадий для инактивации или удаления потенциальных вирусных загрязнений (обработка растворителем/детергентом [S/D] и фильтрация для удаления вирусов). Элюаты для DPC на стадии 4 размораживают, объединяют и фильтруют, на стадии 5 инкубируют с три-н-бутилфосфатом (TNBP) и обрабатывают полисорбатом 80 S/D для инактивации любых присутствующих вирусов в липидной оболочке. Реагенты TNBP и полисорбат 80, агрегаты и примеси удаляют из устекинумаба на стадии 6 с использованием катионообменной хроматографии на сефарозе SPXL®. Устекинумаб на стадии 7 дополнительно очищают с использованием анионообменной хроматографии на сефарозе QXL® для удаления ДНК, вирусов и примесей. На стадии 8 очищенный устекинумаб разбавляют и фильтруют через задерживающий вирусы фильтр (NFP®).

**[0183]** Получение предварительно подготовленной массы (PFB) и подготовленной массы (FB) устекинумаба выполняют на стадиях 9 и 10 соответственно. На стадии 9 на стадии ультрафильтрации устекинумаб концентрируют, а на стадии диафильтрации добавляют согласно составу эксципиенты и удаляют функциональные буферные соли. На стадии 10 к устекинумабу PFB добавляют полисорбат 80 с получением FB. FB фильтруют в поликарбонатные контейнеры для хранения в замороженном состоянии. Замороженный

FB упаковывают в изолированные контейнеры с сухим льдом для транспортировки к месту производства лекарственного препарата.

Подробное описание крупномасштабного производственного процесса

Стадия 1. Предварительное культивирование и размножение

**[0184]** Первой стадией производства устекинумаба является инициация предварительного культивирования из флакона рабочего клеточного банка (WCB) с трансфицированными клетками Sp2/0, экспрессирующими последовательности HC и LC устекинумаба, и размножение в культуральных флаконах, одноразовых культуральных мешках и затравочном биореакторе объемом 100 л. Клетки культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 500 л.

Процедура производства

**[0185]** Один или более хранящихся в криобанке флаконов WCB размораживают и разбавляют средой с заданным химическим составом (CD) для гибридом с добавлением 6 mM L-глутамина, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (CDH-A). Жизнеспособность культуры должна составлять  $\geq 45\%$ . Клетки далее разводят средой CDH-A во флаконе для культивирования до плотности посева от 0,2 до  $0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток (VC)/мл. Предварительное культивирование выполняют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с увлажнением, при условиях температуры, концентрации CO<sub>2</sub> и с перемешиванием в пределах диапазонов, определенных в записи для партии. Предварительную культуру инкубируют в течение  $\leq 3$  дней до получения минимальной плотности клеток  $\geq 0,6 \times 10^6$  VC/мл и жизнеспособности культуры  $\geq 50\%$ . Предварительную культуру последовательно размножают, пересеивая в культуральные флаконы, а затем в культуральные мешки в качестве способа увеличения масштаба для посева в биореактор объемом 100 л. Во время фазы размножения культуры каждая стадия инкубации занимает  $\leq 3$  дней для достижения условий посева, для чего требуется плотность клеток  $\geq 0,6 \times 10^6$  VC/мл и жизнеспособность культуры  $\geq 80\%$ . Плотность посева при каждом пересеивании составляет от 0,2 до  $0,5 \times 10^6$  VC/мл в культуральных флаконах и от 0,2 до  $0,6 \times 10^6$  VC/мл культуральных мешках. При каждом пересеве отбирают пробы для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в затравочный биореактор объемом 100 л отбирают пробу предварительной культуры для оценки биологической нагрузки.

**[0186]** Размножение предварительной культуры можно поддерживать в течение максимум 30 дней после размораживания. Предварительные культуры, не использованные в течение 30 дней, выбрасывают. При необходимости можно поддерживать и применять для посева в другой затравочный биореактор объемом 100 л резервные предварительные культуры, размноженные, как описано выше, и подвергнутые тому же технологическому мониторингу, контрольным исследованиям и воздействию тех же параметров процесса, что и основные предварительные культуры.

**[0187]** Когда предварительная культура будет соответствовать критериям посева,

содержимое культурального (-ых) мешка (-ов) переносят в биореактор объемом 100 л, содержащий среду CDH-A, ориентируясь на плотность посева  $\geq 0,3 \times 10^6$  VC/мл. pH, температуру и концентрацию растворенного кислорода в затравочном биореакторе удерживают в пределах диапазонов, определенных в записи партии. Культуру размножают до получения плотности клеток  $\geq 1,5 \times 10^6$  VC/мл и жизнеспособности культуры  $\geq 80\%$ . На протяжении всего процесса из затравочного биореактора отбирают пробы культуры для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в производственный биореактор объемом 500 л отбирают пробы культуры для определения биологической нагрузки.

**[0188]** Когда VCD в затравочном биореакторе достигнет  $\geq 1,5 \times 10^6$  VC/мл, культуру можно использовать для посева в производственный биореактор объемом 500 л. С другой стороны, из затравочного биореактора объемом 100 л можно забрать часть культуры, а оставшуюся культуру можно развести свежей средой. В результате такого процесса отбора и пополнения культуре дают размножиться до достижения достаточной клеточной плотности для посева в производственный биореактор объемом 500 л. Максимальная продолжительность культивирования в биореакторе объемом 100 л составляет 9 дней после посева.

#### Стадия 2. Производство в биореакторе

**[0189]** На стадии 2 клеточную культуру непрерывно перфузируют в производственном биореакторе объемом 500 л с использованием системы удержания клеток с половолоконным фильтром и переменным тангенциальным потоком (ATF). Из системы ATF собирают пермеат клеточной культуры (урожай), клетки возвращают в биореактор и культуру пополняют свежей средой.

#### Процедура производства

**[0190]** Посев в производственный биореактор объемом 500 л выполняют путем переноса содержимого затравочного биореактора объемом 100 л в производственный биореактор объемом 500 л, содержащий среду CD (с заданным химическим составом) для гибридом с добавлением 6 mM L-глутамина, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (CDH-A). Перенесенный объем должен быть достаточным для достижения целевой плотности посева  $\geq 0,3 \times 10^6$  жизнеспособных клеток (VC)/мл. Культуру поддерживают при температуре от 34 до 38 °C, pH от 6,8 до 7,6 и концентрации растворенного кислорода (DO) от 1 до 100%.

**[0191]** Иницируют непрерывную перфузию и культуру отбирают из биореактора объемом 500 л в систему ATF для отделения клеток от пермеата. Пермеат фильтруют через фильтр ATF 0,2 мкм и собирают в виде урожая в биотехнологические контейнеры (BPC). Клетки возвращают в биореактор и подают свежую среду CDH-A для поддержания постоянного объема культуры. В ходе производственного цикла контролируют плотность жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособность культуры, pH, DO, температуру и содержание иммуноглобулина G (IgG). Скорость перфузии постепенно увеличивают пропорционально VCD до достижения целевой скорости приблизительно одного объема

биореактора в день. Скорость перфузии удерживают таким образом, чтобы она не превышала 1,20 объемов биореактора в день. Удерживание в системе ATF отслеживают для облегчения отключения фильтра ATF прежде, чем задержка IgG на фильтре превысит 50%.

**[0192]** Когда VCD в биореакторе объемом 500 л достигнет  $8,0 \times 10^6$  VC/мл или на 10-й день, в зависимости от того, что наступит раньше, целевое значение pH снижают с 7,2 до 7,1. Удаление биомассы начинают либо на 20-й день, либо в момент достижения значения VCD, равного  $12,0 \times 10^6$  VC/мл, в зависимости от того, что наступит раньше. Биомассу удаляют из производственного биореактора объемом 500 л в ВРС-контейнеры со скоростью до 20% объемов биореактора в день. Из каждого урожая отбирают пробы для определения биологической нагрузки.

**[0193]** Непрерывное перфузионное культивирование клеток в биореакторе объемом 500 л продолжают до 46 дней после посева. В конце производства из культуры берут пробы для анализа на микоплазму и занесенный вирус. Урожай может храниться в течение  $\leq 30$  дней при температуре от 2 до 8°C после отключения от биореактора.

#### Стадия 3. Прямой захват продукта (DPC)

**[0194]** На стадии 3 урожай из одного или более производственных биореакторов объемом 500 л осветляют и очищают с использованием колонки для аффинной хроматографии с белком A MabSelect™ (GE Healthcare Bio-Sciences, г. Питтсбург, штат Пенсильвания) с использованием автоматизированной хроматографической установки. Устекинумаб захватывают из урожая и удаляют примеси от клеточной культуры, включая примеси клеток-хозяев. Полученный элюат DPC замораживают до дальнейшей обработки.

#### Подготовка и регенерация колонок с белком А

**[0195]** Перед загрузкой урожая набитую колонку для аффинной хроматографии MabSelect™ с белком А уравнивают буфером 50 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, 0,1% полисорбата 80, буфером, pH 7,3 (буфер уравнивания). Отслеживают электропроводность и pH для проверки полного уравнивания колонки. Отбирают пробы элюата из колонки для проверки на микробы. После использования колонку подвергают санитарной обработке, затем отмывают и хранят, если применимо, в соответствующих условиях хранения.

#### Процедура производства

**[0196]** Из урожая отбирают пробы для контроля бионагрузки, эндотоксина и содержания иммуноглобулина G. На технологической линии к урожаю добавляют 0,1 М этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), буфер pH 8,0, с конечной концентрацией ЭДТА от 5 до 30 мМ. Урожай фильтруют через фильтр 0,2 мкм и наносят на колонку с белком А с загрузочным соотношением от 14 до 41 г/л и при скорости потока от 300 до 500 см/ч. Колонку отмывают буфером уравнивания со скоростью потока от 300 до 500 см/ч до тех пор, пока УФ-поглощение при 280 нм ( $A_{280}$ ) не вернется к величине  $\leq 100$  мАЕ/мм, а затем отмывают по меньшей мере двумя дополнительными объемами колонки (CV) буфера уравнивания. Связанный устекинумаб отмывают по меньшей мере 4,5 объемами колонки буфера 0,1 М цитрата натрия, pH 5,0, со скоростью потока от 300 до 500 см/ч.

**[0197]** Устекинумаб элюируют с использованием 0,1 М цитрата, pH 3,5, со скоростью потока от 300 до 500 см/ч. Сбор элюируемого продукта начинается с восходящего  $A_{280}$ -сигнала с длиной пути  $\geq 50$  мАЕ/мм и останавливается при нисходящем  $A_{280}$ -сигнале с длиной пути  $\geq 50$  мАЕ/мм.

**[0198]** После сбора значение pH DPC-элюата доводят до 5,8-6,2 добавлением 1,0 М Tris -буфера и/или 0,1 М буфера цитрата натрия по мере необходимости. Во время доведения pH DPC-элюат перемешивают для обеспечения однородности раствора. Перед фильтрованием из DPC-элюата с доведенным pH отбирают пробы для определения биологической нагрузки.

**[0199]** DPC-элюат с доведенным pH фильтруют с использованием концевой фильтра 0,2 мкм. Аликвоты DPC-элюата помещают в поликарбонатные контейнеры. Из отфильтрованного DPC-элюата отбирают пробы для анализа содержания мономера, бионагрузки, эндотоксина и концентрации белка (на основании которой рассчитывают выход стадии, и ожидается, что он составит  $\geq 60\%$ ). Перед хранением при  $\leq -40^\circ\text{C}$  отфильтрованный DPC-элюат можно хранить в течение общего времени  $\leq 48$  часов при комнатной температуре и  $\leq 240$  часов при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$ . DPC-элюат может храниться в замороженном состоянии.

Стадия 4. Размораживание и объединение элюатов прямого захвата продукта (DPC)

**[0200]** На стадии 4 DPC-элюаты размораживают, объединяют и фильтруют, после чего инактивируют вирусы растворителем/детергентом.

Процедура производства

**[0201]** Замороженные DPC-элюаты размораживают при комнатной температуре. Размораживание завершается, когда элюаты визуально не содержат льда; размораживание не должно превышать 120 часов. Размороженные элюаты объединяют, фильтруют через фильтр 0,2 мкм в закрытый сосуд с получением от 2,7 до 5,4 кг белка. Отфильтрованный элюат перемешивают для обеспечения однородности раствора. Отбирают пробы для определения концентрации белка, эндотоксина, бионагрузки и pH. Измеренная концентрация белка составляет от 4,5 до 59 г/л. Затем pH доводят до 5,5-6,5 путем добавления либо 1,0 М Tris, либо 1,0 М лимонной кислоты по мере необходимости. Объединенные DPC-элюаты можно хранить до 48 часов при комнатной температуре перед дальнейшей обработкой на стадии 5.

Стадия 5. Обработка растворителем/детергентом (S/D) объединенных элюатов прямого захвата продукта (DPC)

**[0202]** На стадии 5 объединенные DPC-элюаты инкубируют с три-н-бутилфосфатом (TNBP) и полисорбатом 80 (обработка растворителем/детергентом [S/D]) для инактивации любых потенциально присутствующих вирусов в липидной оболочке.

Процедура производства

**[0203]** Маточный раствор S/D, содержащий 2% TNBP/10% полисорбата 80 (масс./масс.), переносят в сосуд, содержащий объединенные DPC-элюаты в соотношении от 0,08 до 0,12 (об./об.) с получением конечной концентрации 0,2% TNBP/1% полисорбата

80 (масс./об.). Раствор перемешивают для обеспечения однородности раствора, а затем переносят в сосуд для инактивации. Устекинумаб и реагенты для обработки S/D инкубируют при температуре  $\geq 15^{\circ}\text{C}$  при непрерывном перемешивании. Инактивация начинается, когда обработанный S/D устекинумаб полностью перенесен в сосуд для инактивации, и заканчивается, когда начинается фаза загрузки колонки катионообменной хроматографии на стадии 6. Общее время инактивации составляет  $\geq 60$  минут. Общее время от начала добавления реагента S/D до конца фазы загрузки колонки на стадии 6 составляет  $\leq 36$  часов.

#### Стадия 6. Катионообменная хроматография

**[0204]** На стадии 6 устекинумаб, обработанный растворителем/детергентом (S/D), связывают с колонкой для катионообменной хроматографии SP Sepharose XL (GE Healthcare Bio-Sciences, г. Питтсбург, штат Пенсильвания), соединенной с автоматизированной хроматографической установкой. Удаляют реагенты три-н-бутилфосфат (TNBP), полисорбат 80, агрегаты и примеси.

#### Подготовка и регенерация колонки для катионообменной хроматографии

**[0205]** Перед использованием набитую колонку для катионообменной хроматографии SP Sepharose XL уравнивают буфером, содержащим 30 мМ фосфата натрия, pH 6,5 (буфер уравнивания). Отслеживают электропроводность и pH для проверки полного уравнивания колонки. Отбирают пробы элюата из колонки для проверки на микробы. После применения колонку очищают от остаточного белка, регенерируют, подвергают санитарной обработке и хранят в соответствующем растворе для хранения.

#### Процедура производства

**[0206]** Обработанный S/D устекинумаб разбавляют на технологической линии водой для инъекций, сохраняя электропроводность от 2,4 до 3,4 мСм/см, и загружают на уравновешенную колонку для катионообменной хроматографии SP Sepharose XL. Все скорости потока при загрузке, отмывке и элюировании составляют от 100 до 300 см/ч. Соотношение загрузки продукта к смоле составляет от 45,5 до 90,9 г устекинумаба/л смолы. Колонку отмывают буфером уравнивания в количестве  $\geq 3$  объемов колонки. Затем устекинумаб элюируют из катионообменной колонки с использованием буфера 30 мМ фосфата натрия, 50 мМ хлорида натрия, pH 6,5. Сбор продукта начинают, когда УФ-поглощение для элюата из колонки при 280 нм ( $A_{280}$ ) поднимается как минимум до 25 мАЕ/мм. Отслеживают пик  $A_{280}$  и сбор прекращают, когда значение для элюата снижается до не менее 150 мАЕ/мм. Образцы элюированного продукта отбирают для анализа биологической нагрузки.

**[0207]** Элюат фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм в закрытый сосуд. Затем очищенный катионообменной хроматографией устекинумаб перемешивают и отбирают пробы для определения биологической нагрузки и эндотоксина. Отслеживают выход и ожидают, что он составит  $\geq 85\%$ . Устекинумаб можно хранить при комнатной температуре до 72 часов, а при температуре от 2 до  $8^{\circ}\text{C}$  до 7 дней перед дополнительной

обработкой.

#### Стадия 7. Анионообменная хроматография

**[0208]** На стадии 7 устекинумаб дополнительно очищают с помощью анионообменной хроматографии на Q Sepharose™ XL (GE Healthcare Bio-Sciences, г. Питтсбург, штат Пенсильвания) с использованием автоматической хроматографической установки. Устекинумаб проходит через смолу, в то время как ДНК, другие примеси и вирусы задерживаются.

#### Подготовка колонки для анионообменной хроматографии

**[0209]** Для регенерации перед использованием набитую анионообменную хроматографическую колонку Q Sepharose™ XL уравнивают буфером 50 мМ Tris, 50 мМ хлорида натрия, pH 8,0 (буфер уравнивания). Отслеживают электропроводность и pH для проверки полного уравнивания колонки. Отбирают пробы элюата из колонки для проверки на микробы. После применения колонку очищают от остаточного белка, регенерируют, подвергают санитарной обработке и хранят в соответствующем растворе.

#### Процедура производства

**[0210]** Перед загрузкой pH элюата катионообменной колонки доводят до 7,5-8,0 путем добавления 1,0 М Tris или 1,0 М лимонной кислоты по мере необходимости. Элюат перемешивают для обеспечения однородности раствора. Устекинумаб с доведенным pH загружают на анионообменную колонку Q Sepharose™ XL со скоростью потока от 50 до 250 см/ч. Соотношение загрузки продукта к смоле составляет от 45,5 до 136,4 г устекинумаба/л смолы.

**[0211]** Устекинумаб проходит через смолу без связывания, и его собирают, как только УФ-поглощение при 280 нм ( $A_{280}$ ) поднимается по меньшей мере до 30 мАЕ/мм. После загрузки устекинумаба колонку отмывают буфером уравнивания со скоростью потока от 50 до 250 см/ч. Отслеживают пик  $A_{280}$  и сбор прекращают, когда значение для элюата снижается до не менее 50 мАЕ/мм. Образцы элюированного продукта отбирают для анализа биологической нагрузки.

**[0212]** Устекинумаб фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм в закрытый сосуд, перемешивают и отбирают пробы для определения биологической нагрузки и эндотоксина. Отслеживают выход и ожидают, что он составит  $\geq 85\%$ . Очищенный на анионообменной колонке устекинумаб можно хранить при комнатной температуре до 72 часов или при температуре от 2 до 8°C до 7 дней перед дополнительной обработкой на стадии 8.

#### Стадия 8. Фильтрация для удаления вирусов

**[0213]** На стадии 8 очищенный анионным обменом устекинумаб разбавляют буфером 50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, pH 8,0 и фильтруют через задерживающий вирусы фильтр (NFP®) для удаления любых потенциально присутствующих вирусов.

#### Подготовка системы фильтрации NFP

**[0214]** Перед использованием стерилизованные в автоклаве одноразовые фильтры NFP устанавливают на подвергнутую санитарной обработке систему фильтрации NFP,

отмывают водой для инъекций (WFI), а затем тестируют на водопроницаемость. Фильтры уравнивают буфером 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0 (буфер уравнивания). Отслеживают электропроводность и pH для проверки полного уравнивания системы. Отбирают пробы выходящего буфера для проверки на микробы. После применения систему фильтрации NFP подвергают санитарной обработке и хранят в соответствующем растворе для хранения.

#### Процедура производства

**[0215]** Перед фильтрованием очищенный анионным обменом устекинумаб разводят в буфере уравнивания до концентрации  $\leq 8,2$  г/л. Разведенный устекинумаб затем фильтруют через фильтры NFP и фильтрат NFP собирают в сосуд из нержавеющей стали. В течение 5 минут после начала фильтрации определяют исходную скорость потока и отслеживают спад потока, проверяя, чтобы спад потока от начального потока (определяемого как 0%-й спад потока) не превышал 85%. После завершения фильтрации NFP установку отмывают буфером уравнивания и оставшийся продукт собирают в сосуд из нержавеющей стали, где его перемешивают и отбирают пробы для определения концентрации эндотоксина, бионагрузки и белка. Отслеживают выход и ожидают, что он составит  $\geq 85\%$ . NFP-фильтрат устекинумаба можно хранить при комнатной температуре до 72 часов, а при температуре от 2 до 8°C до 7 дней перед дополнительной обработкой на стадии 9.

#### Стадия 9. Концентрирование и диафильтрация

**[0216]** На стадии 9 на стадии ультрафильтрации устекинумаб концентрируют, а на стадии диафильтрации добавляют согласно составу эксципиенты и удаляют функциональные буферные соли.

#### Подготовка системы ультрафильтрации

**[0217]** Перед использованием систему уравнивают буфером 50 mM Tris, 50 M NaCl, pH 8,0. Отслеживают электропроводность и pH для проверки полного уравнивания системы. Отбирают пробы выходящего буфера для проверки на микробы. После применения систему ультрафильтрации подвергают санитарной обработке. Через систему пропускают WFI и выполняют нормализованный тест на водопроницаемость. При необходимости систему ультрафильтрации хранят в приемлемом растворе для хранения.

#### Процедура производства

**[0218]** Фильтрат устекинумаба после удаления вирусов предварительно концентрируют до 36-82 г/л. Затем продукт подвергают диафильтрации относительно буфера 10 mM гистидина, 8,5% сахарозы, pH 5,7 с  $\geq 8$  диаобъемами, пока pH и проводимость пермеата не окажутся в пределах 5,5-5,9 и 400-700 мкСм/см соответственно. Устекинумаб дополнительно концентрируют до концентрации не более 180 г/л. На протяжении всего процесса отслеживают и контролируют трансмембранное давление. Продукт извлекают, отмывая буфером 10 mM гистидина, 8,5% сахарозы, pH 5,7. Устекинумаб с помощью этого же буфера доводят до конечной концентрации белка от 86,7 до 95,8 г/л и обозначают как

предварительно подготовленную массу (PFB). Отслеживают выход стадии 9 и ожидают, что он составит  $\geq 85\%$ . При необходимости устекинумаб можно подвергать повторной обработке для получения надлежащей концентрации белка путем повторения стадий концентрирования в системе ультрафильтрации. Продукт перемешивают для обеспечения однородности раствора. Устекинумаб PFB хранят при комнатной температуре или при температуре от 2 до 8°C в течение до 48 часов.

#### Стадия 10. Приготовление подготовленной массы

**[0219]** На стадии 10 к предварительно подготовленной массе (PFB) устекинумаба добавляют полисорбат 80 с получением подготовленной массы (FB). FB фильтруют в поликарбонатные контейнеры для хранения в замороженном состоянии.

#### Процедура производства

**[0220]** Добавляют один процент полисорбата 80 в соотношении от 0,003 до 0,005 кг/л к устекинумабу PFB в закрытом сосуде с PFB и перемешивают для получения раствора FB. Раствор FB перемешивают в соответствии с валидированными параметрами для обеспечения однородности раствора. Раствор FB перед фильтрованием можно хранить при комнатной температуре или при температуре от 2 до 8°C до 48 часов. Раствор FB фильтруют, используя одноразовый предварительный фильтр, в сосуд для FB и перемешивают. Перемешанную FB затем фильтруют в поликарбонатные контейнеры через фильтр 0,2 мкм. Отбирают пробы для проверки извлечения. Контейнеры с устекинумабом FB хранят при температуре  $\leq -40$  °C.

Пример 6. Применение способа анализа гамма-распределения перехода (GDТА) для хроматографических колонок, использованных при производстве STELARA® (устекинумаба)

**[0221]** В этом примере описано применение способа GDТА к хроматографическим колонкам при очистке в процессе производства антител к TNF, например, антител к TNF $\alpha$  SIMPONI® (голимумаб), например, к колонке для аффинной хроматографии с белком А, использованной на 3-й стадии производства.

#### Стадия 3. Колонка для аффинной хроматографии с белком А

**[0222]** В случае стадии 3 при использовании колонки для аффинной хроматографии с белком А MabSelect™ к анализируемым переходным фронтам относятся, например, фронт отмывки 2 (ФИГ. 40) и фронт, образующийся во время элюирования (ФИГ. 41). В этот момент в случае колонки для аффинной хроматографии с белком А MabSelect™ также оценивают дополнительные фронты, образующиеся во время очистки колонки после санитарной обработки и стадии отмывки раствором для хранения после уравнивания. Представленные результаты отражают анализ партий, обработанных на 13 разных набивках колонок, используемых при производстве STELARA® (устекинумаба). Предварительная оценка тенденций показывает некоторое очевидное смещение эффективности колонки и некоторые различия, наблюдаемые между набивками колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными об эффективности колонки, будет выполнен с целью установления контрольных границ для

применения в будущей реализации способа GDТА для мониторинга технологического процесса в режиме реального времени.

Пример 7. Применение способа анализа гамма-распределения перехода (GDТА) для хроматографических колонок, использованных при производстве SIMPONI® (голимумаба)

**[0223]** В этом примере описано применение способа GDТА к хроматографическим колонкам при очистке в процессе производства антитела к TNF $\alpha$  SIMPONI® (голимумаб), например, к аффинной хроматографической колонке с белком А на стадии 3, катионообменной хроматографической колонке на стадии 6 и анионообменной хроматографической колонке на стадии 7. Эти стадии и колонки, применяемые в способах получения SIMPONI® (голимумаба), сравнимы с применяемыми при производстве STELARA® (устекинумаба).

Стадия 3. Колонка для аффинной хроматографии с белком А

**[0224]** В случае стадии 3 при использовании колонки для аффинной хроматографии с белком А MabSelect™ анализируемые переходные фронты включали, например, фронт элюирования (ФИГ. 42), фронт образующийся во время санитарной обработки с помощью гуанидин-НСI (ФИГ. 43), и фронт, образующийся при отмывке после санитарной обработки 0,1 М цитратом натрия, рН 3,5 (ФИГ. 44). Показанные результаты представляют собой анализ 160 партий SIMPONI® (голимумаба). Предварительная оценка тенденций показывает некоторое очевидное смещение эффективности колонки и некоторые различия, наблюдаемые между набивками колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными об эффективности колонки, будет выполнен с целью установления контрольных границ для применения в будущей реализации способа GDТА для мониторинга технологического процесса в режиме реального времени.

Стадия 6. Колонка для катионообменной хроматографии

**[0226]** В случае стадии 6 при использовании колонки для катионообменной хроматографии UNOsphere S™ анализируемые переходные фронты включали, например, фронт, образующийся во время загрузки материала, обработанного растворителем/детергентом (S/D) (ФИГ. 45), фронт, образующийся во время элюирования (ФИГ. 46) и фронт, образующийся во время десорбции (ФИГ. 47). Показанные результаты представляют собой анализ 72 партий SIMPONI® (голимумаба). Предварительная оценка тенденций показывает некоторое очевидное смещение эффективности колонки и некоторые различия, наблюдаемые между набивками колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными об эффективности колонки, будет выполнен с целью установления контрольных границ для применения в будущей реализации способа GDТА для мониторинга технологического процесса в режиме реального времени.

Стадия 7. Колонка для анионообменной хроматографии

**[0227]** В случае стадии 7 при использовании колонки для анионообменной хроматографии Q Sepharose™ XL к анализируемым переходным фронтам относятся,

например, фронт, образующийся при очистке гидроксидом натрия (ФИГ. 48), и фронт, образующийся при десорбции (ФИГ. 49). Показанные результаты представляют собой анализ 71 партии SIMPONI® (голимумаба). Предварительная оценка тенденций показывает некоторое очевидное смещение эффективности колонки и некоторые различия, наблюдаемые между набивками колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными об эффективности колонки, будет выполнен с целью установления контрольных границ для применения в будущей реализации способа GDТА для мониторинга технологического процесса в режиме реального времени.

**[0228]** Хотя предпочтительные варианты осуществления изображены и описаны подробно в данном документе, специалистам в соответствующей области будет очевидно, что различные модификации, дополнения, замены и т. п. могут быть сделаны без отклонения от сущности изобретения, и поэтому считается, что они входят в объем изобретения, как определено в следующей формуле изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ использования хроматографической колонки в способах производства для получения антител к ПЛ-12/ПЛ-23р40, конкретных фармацевтических композиций антител и их антигенсвязывающих фрагментов, причем антитела к ПЛ-12/ПЛ-23р40 содержат последовательности аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из следующих: (i) тяжелая цепь (НС), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, причем указанный способ включает:

сбор выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первого использования хроматографической колонки с набиванием колонки;

определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе полученного выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для восходящего переходного фронта или формулы Ib для нисходящего переходного фронта,

$$C = 1 - \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Формула Ia}$$

или

$$C = \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Формула Ib,}$$

где C представляет собой выходной сигнал колонки для данного V, V представляет собой накопленный поток, деленный на объем колонки, а k,  $\theta$  и  $V_i$  представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для определения кривой;

вычисление высоты, эквивалентной теоретической тарелке (НЕТР), для по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров модельной кумулятивной кривой гамма-распределения k,  $\theta$  и  $V_i$ ,

$$НЕТР = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L$$

Формула II,

где

$$\begin{aligned} \mu &= k\theta + V_i \\ \sigma &= \sqrt{k\theta^2} \end{aligned}$$

L=длина колонки; и

оценку качества набивания хроматографической колонки на основе указанного вычисленного значения НЕТР.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий:

кондиционирование, замену или перенабивку хроматографической колонки на основе указанной оценки.

3. Способ по п. 1, дополнительно включающий:

сбор выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока с двумя или более интервалами для соответствующего переходного фронта подвижной фазы во время одного или более последующих применений набивания хроматографической колонки;

выполнение указанного определения и указанного вычисления с использованием выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока, собранных во время каждого одного или более последующих применений набивания хроматографической колонки;

определение значения НЕТР для набивания хроматографической колонки во время каждого из указанных одного или более последующих применений на основании указанного выполнения;

выведение тенденции изменения определенных значений НЕТР для набивания хроматографической колонки при двух или более последующих применениях; и

идентификацию изменения качества набивания хроматографической колонки на основании указанной выведенной тенденции, причем указанные кондиционирование, замена или перенабивка хроматографической колонки основаны на указанной идентификации.

4. Способ по п. 3, где увеличение значения НЕТР набивания хроматографической колонки в одном или более последующих применениях указанного набивания колонки по сравнению со значением НЕТР набивания хроматографической колонки в одном или более более ранних применениях указанного набивания колонки выявляет снижение качества набивания хроматографической колонки.

5. Способ по п. 1, где собирают выходной сигнал колонки и накопленные параметры потока для двух или более различных переходных фронтов подвижной фазы во время указанного первого применения набивания колонки, причем указанный способ включает:

выполнение указанного определения и вычисления с использованием выходного сигнала колонки и накопленных параметров потока, независимо собранных для каждого из двух или более разных переходных фронтов подвижной фазы, с вычислением значения НЕТР для каждого из двух или более различных переходных фронтов подвижной фазы;

оценку качества набивания хроматографической колонки на основе двух или более рассчитанных значений НЕТР, причем указанное кондиционирование, замена или перенабивка хроматографической колонки основаны на указанной оценке.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где хроматографическая колонка выбрана из группы, состоящей колонки для аффинной хроматографии с белком А, колонки для катионообменной хроматографии и колонки для анионообменной хроматографии.

7. Способ по п. 6, где колонка для аффинной хроматографии с белком А включает в себя колонку для аффинной хроматографии с белком А MabSelect™, колонка для

катионообменной хроматографии включает в себя колонку для катионообменной хроматографии UNOsphere S™ или колонку для катионообменной хроматографии SP Sepharose XL, а колонка для анионообменной хроматографии включает в себя колонку для анионообменной хроматографии Q Sepharose™ XL.

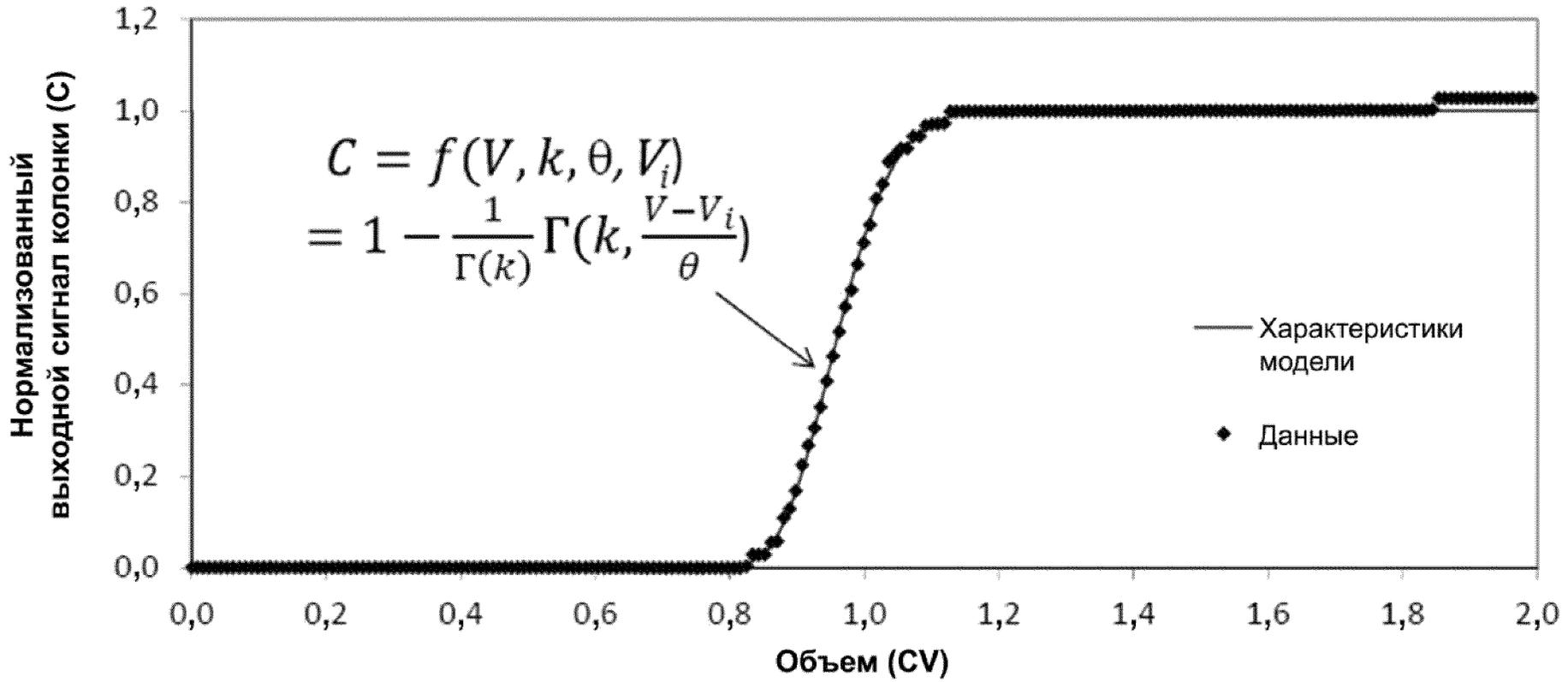
8. Способ по п. 6, где переходный фронт подвижной фазы в колонке для аффинной хроматографии с белком А получен из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта отмывки, образованного во время очистки антител к IL-12/IL-23p40, фронта, образованного при элюировании антител к IL-12/IL-23p40, фронта, образованного при санитарной обработке колонки с помощью гуанидин-HCl, фронта, образованного при отмывании колонки после санитарной обработки с использованием 0,1 М цитрата натрия, pH 3,5.

9. Способ по п. 6, где переходный фронт подвижной фазы в колонке для катионообменной хроматографии получен из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образованного при загрузке материала, обработанного растворителем/детергентом (S/D), который содержит антитела к IL-12/IL-23p40, фронта, образованного при элюировании антител к IL-12/IL-23p40, и фронта, образованного при десорбции колонки.

10. Способ по п. 6, где переходный фронт подвижной фазы в колонке для анионообменной хроматографии получен из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образованного при очистке колонки гидроксидом натрия, и фронта, образованного при десорбции колонки.

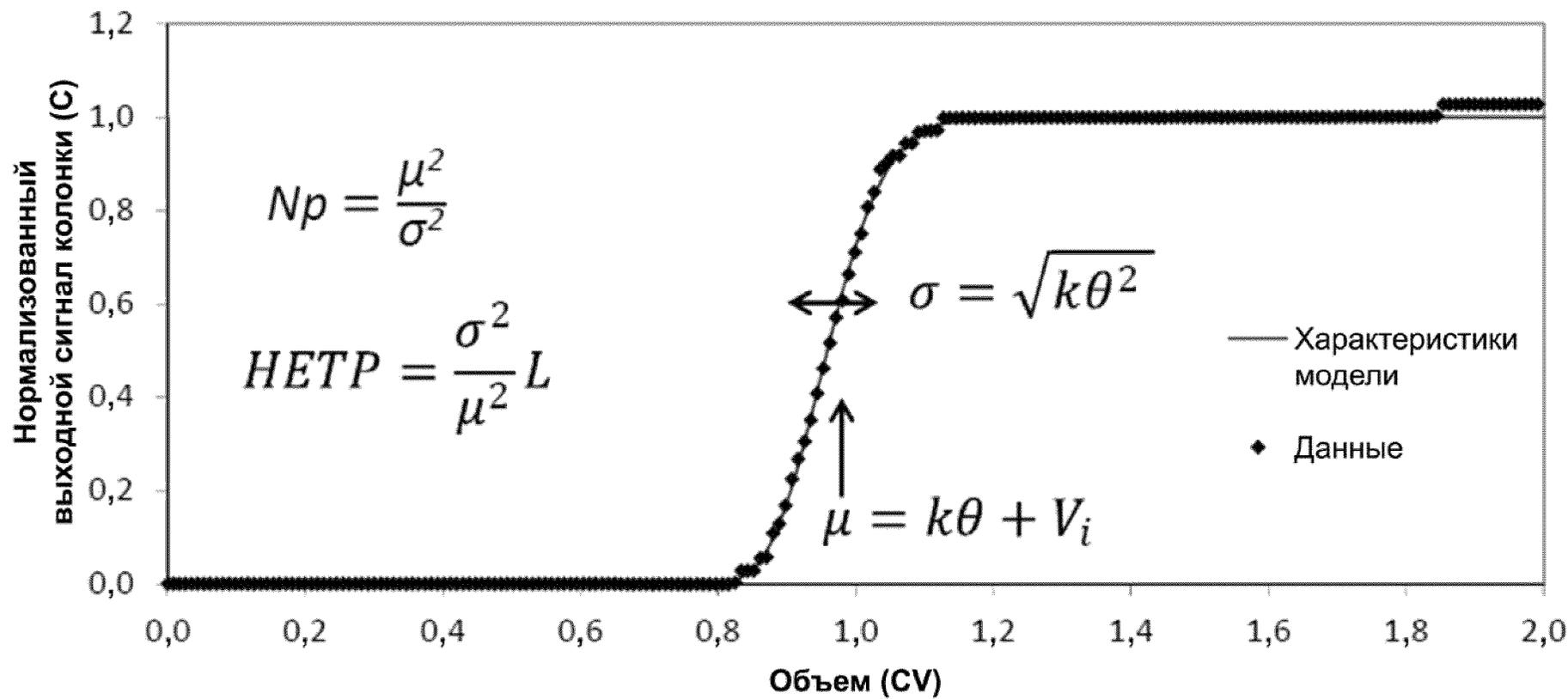
По доверенности

## Анализ фронта, колонка DPC (отмывка)

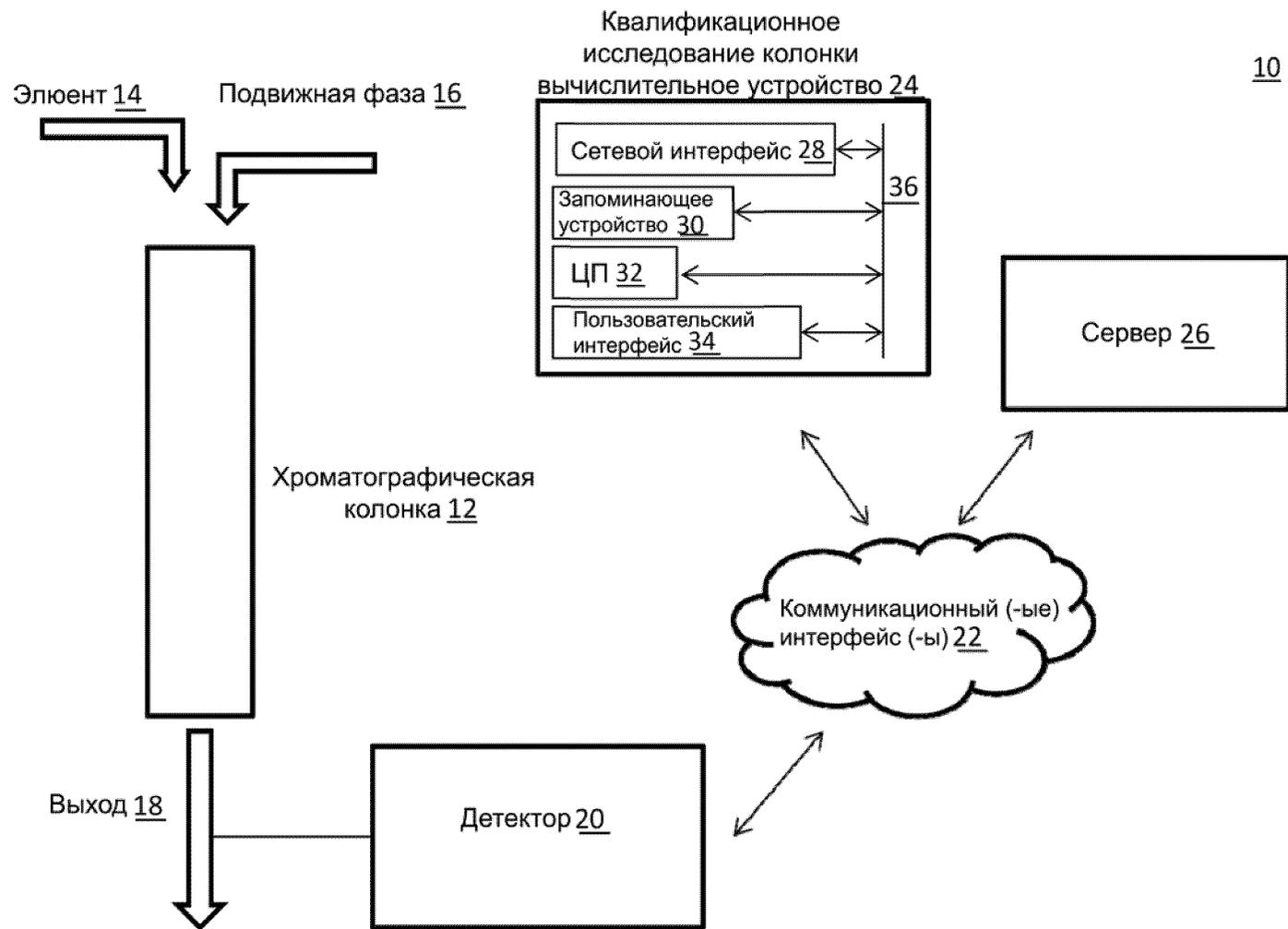


ФИГ. 1А

## Анализ фронта, колонка DPC (отмывка)

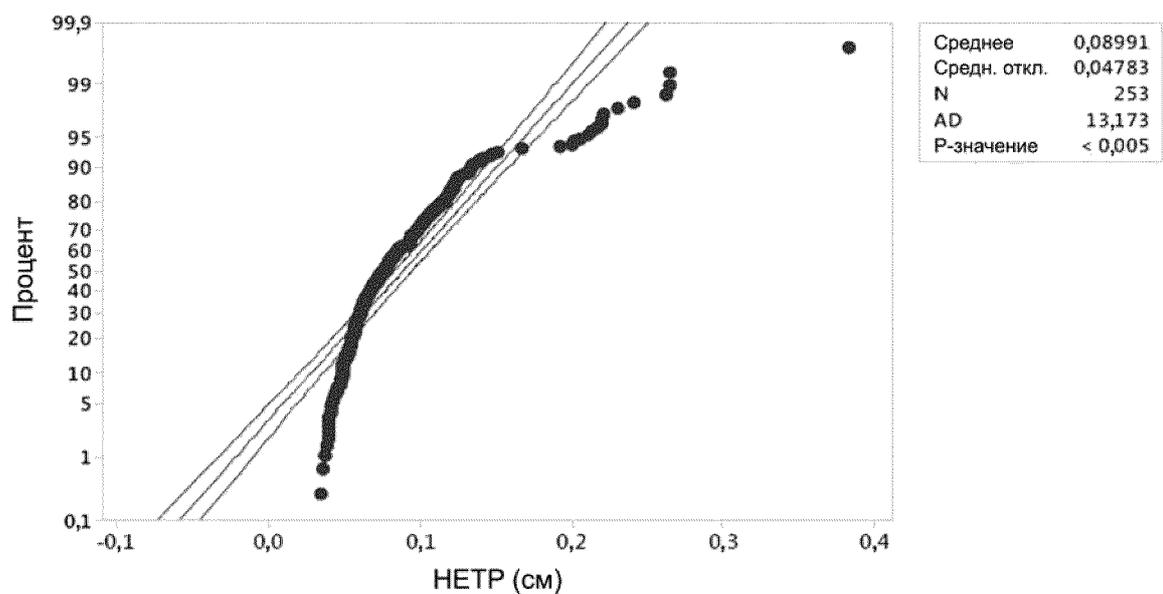


ФИГ. 1В



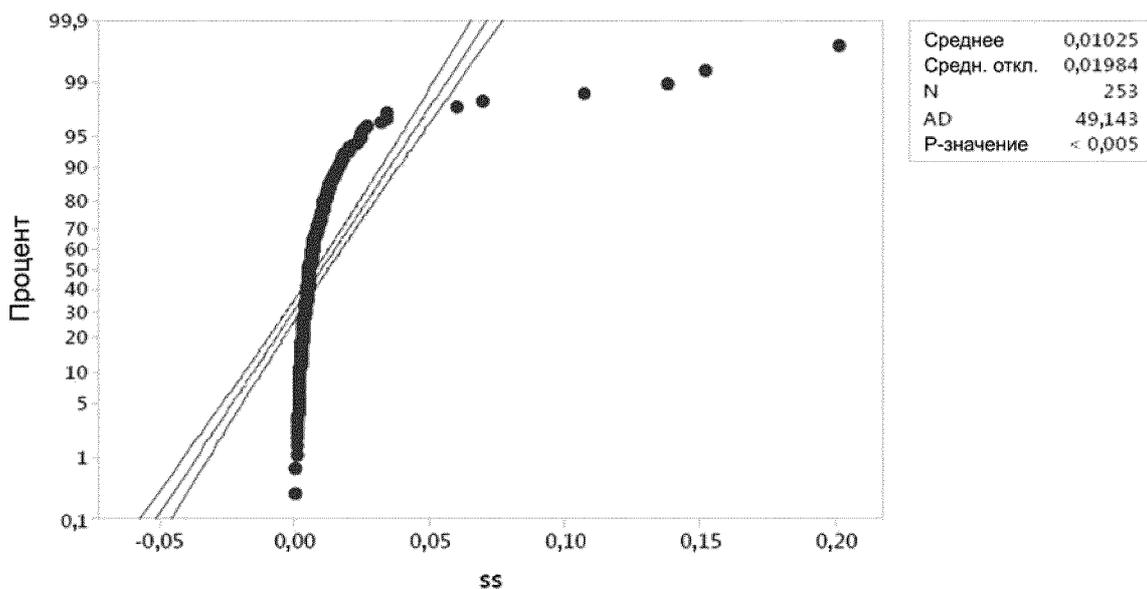
ФИГ. 2

График распределения вероятностей НЕТР для уравнивш. DPC  
Нормальное, ДИ 95%



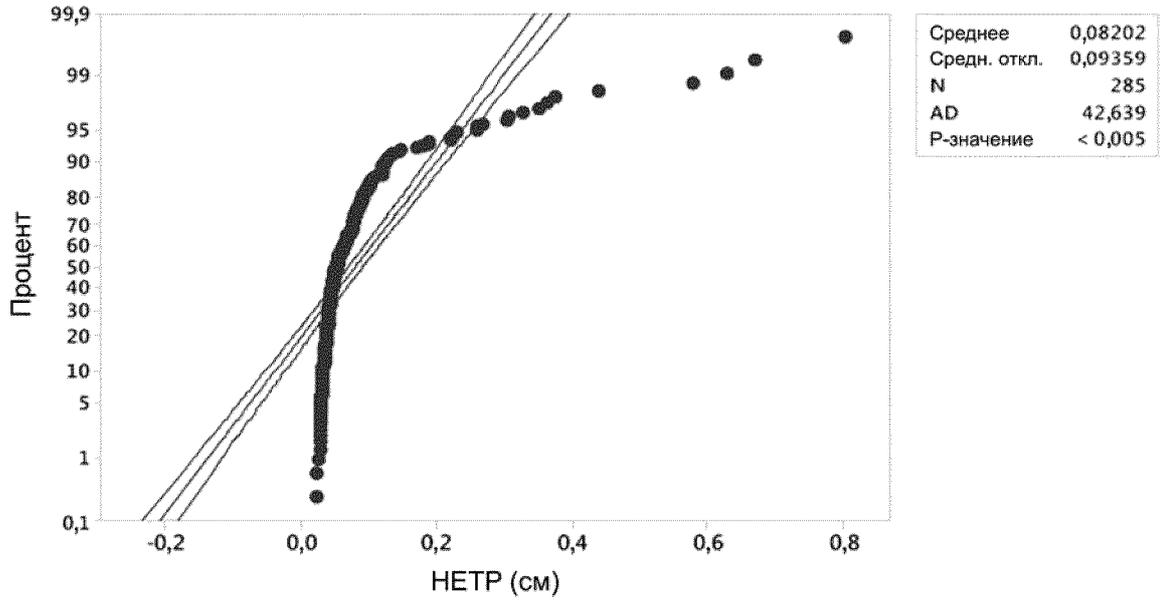
ФИГ. 3

График распределения вероятностей ss для уравнивш. DPC  
Нормальное, ДИ 95%



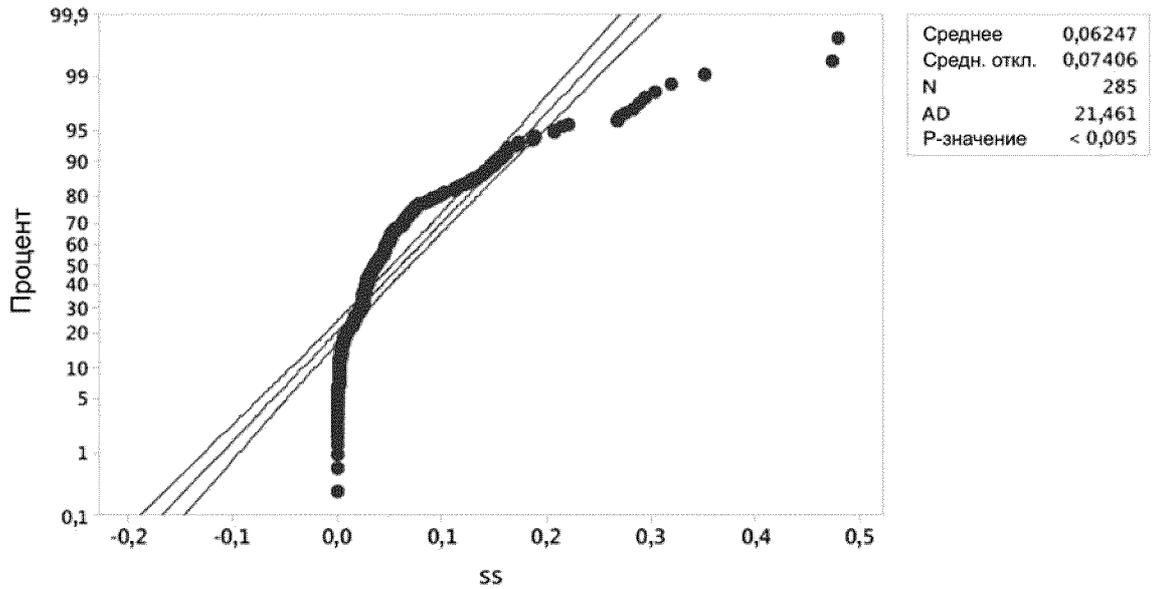
ФИГ. 4

График распределения вероятностей НЕТР для отмывки ДРС  
Нормальное, ДИ 95%



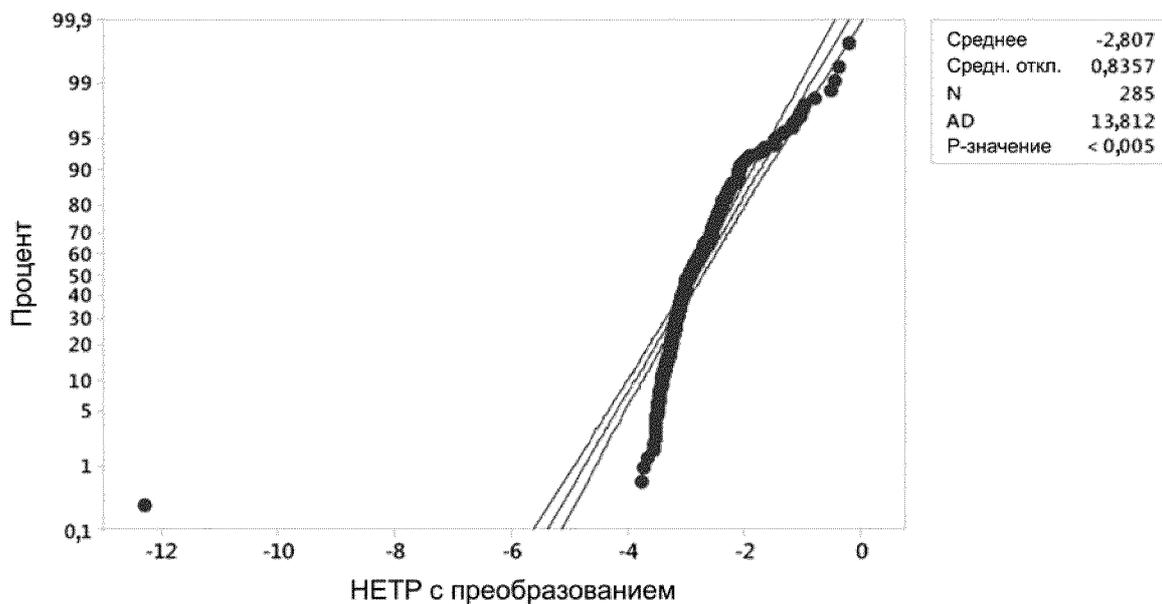
ФИГ. 5

График распределения вероятностей ss для отмывки ДРС  
Нормальное, ДИ 95%



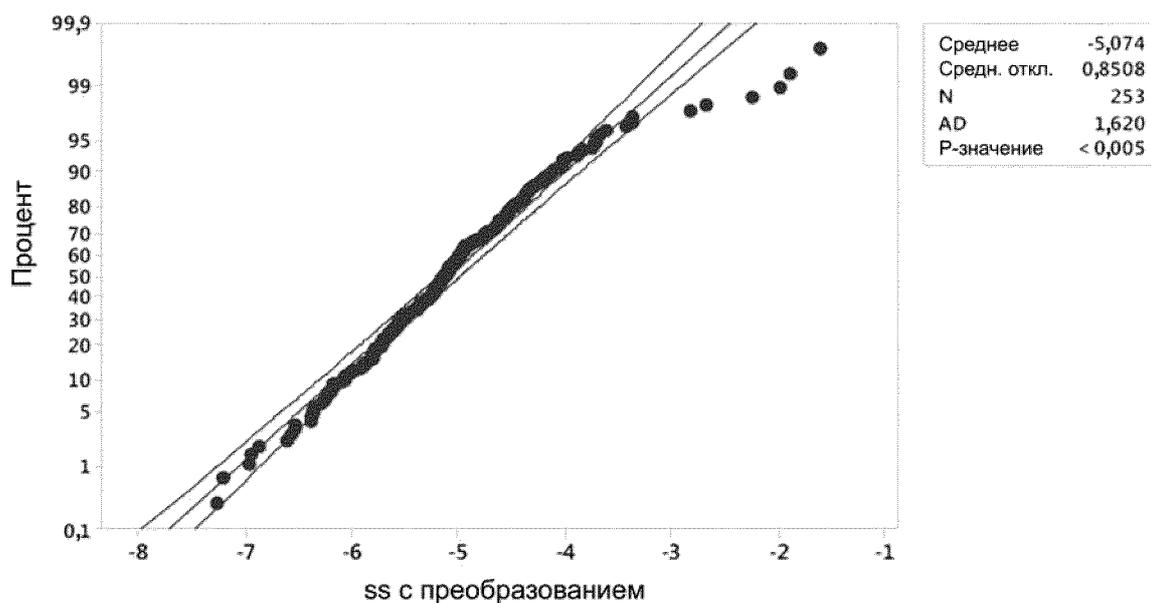
ФИГ. 6

График распределения вероятностей НЕТР  
с преобразованием для уравнивш. DPC  
Нормальное, ДИ 95%



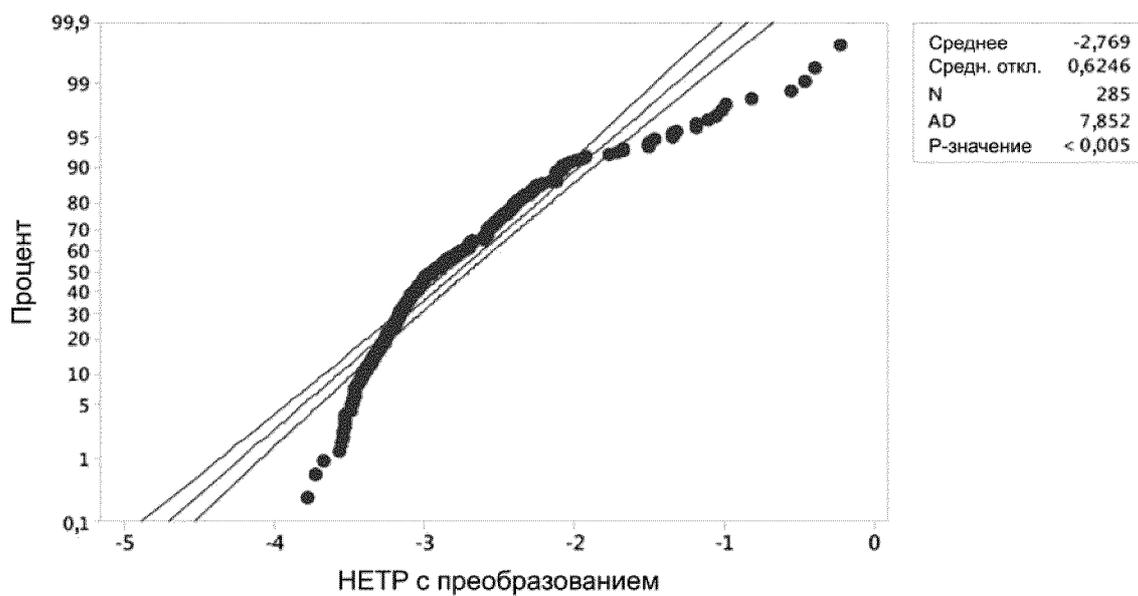
ФИГ. 7

График распределения вероятностей ss  
с преобразованием для уравнивш. DPC  
Нормальное, ДИ 95%



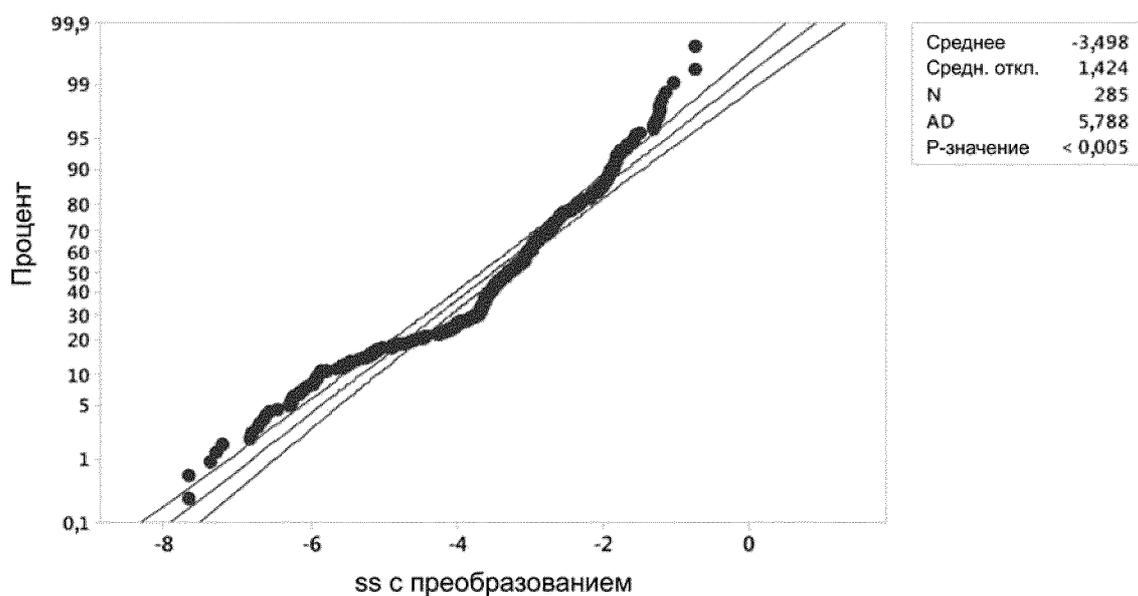
ФИГ. 8

График распределения вероятностей  
НЕТР с преобразованием для отмывки ДРС  
Нормальное, ДИ 95%



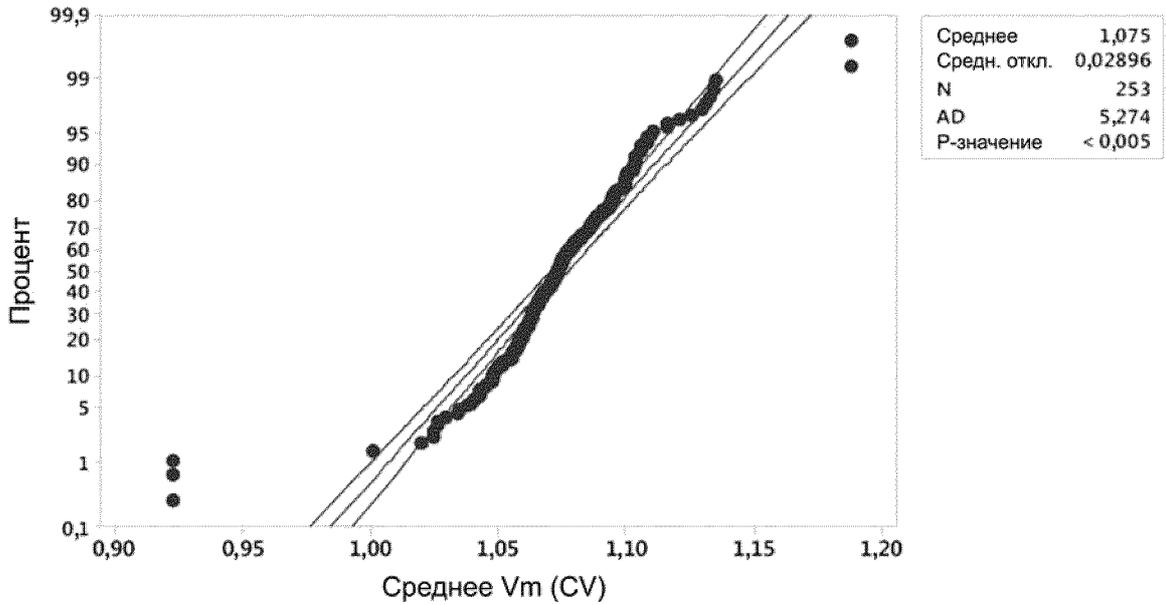
ФИГ. 9

График распределения вероятностей ss  
с преобразованием для отмывки ДРС  
Нормальное, ДИ 95%



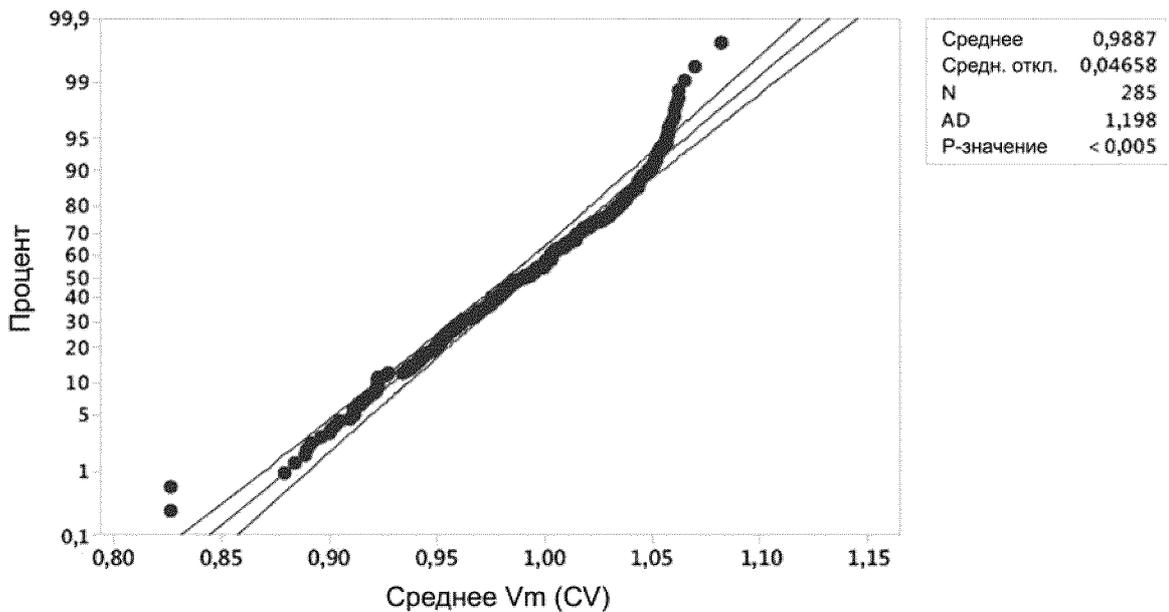
ФИГ. 10

График распределения вероятностей среднего ( $V_m$ ) для уравнивш. DPC  
Нормальное, ДИ 95%



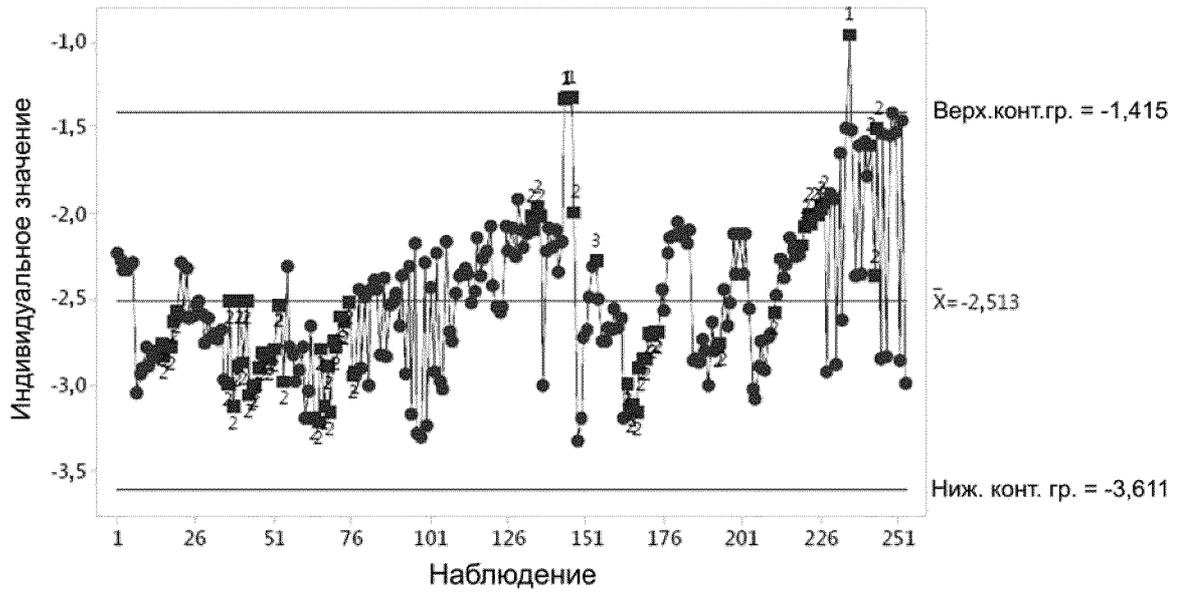
ФИГ. 11

График распределения вероятностей среднего ( $V_m$ ) для отмывки DPC  
Нормальное, ДИ 95%



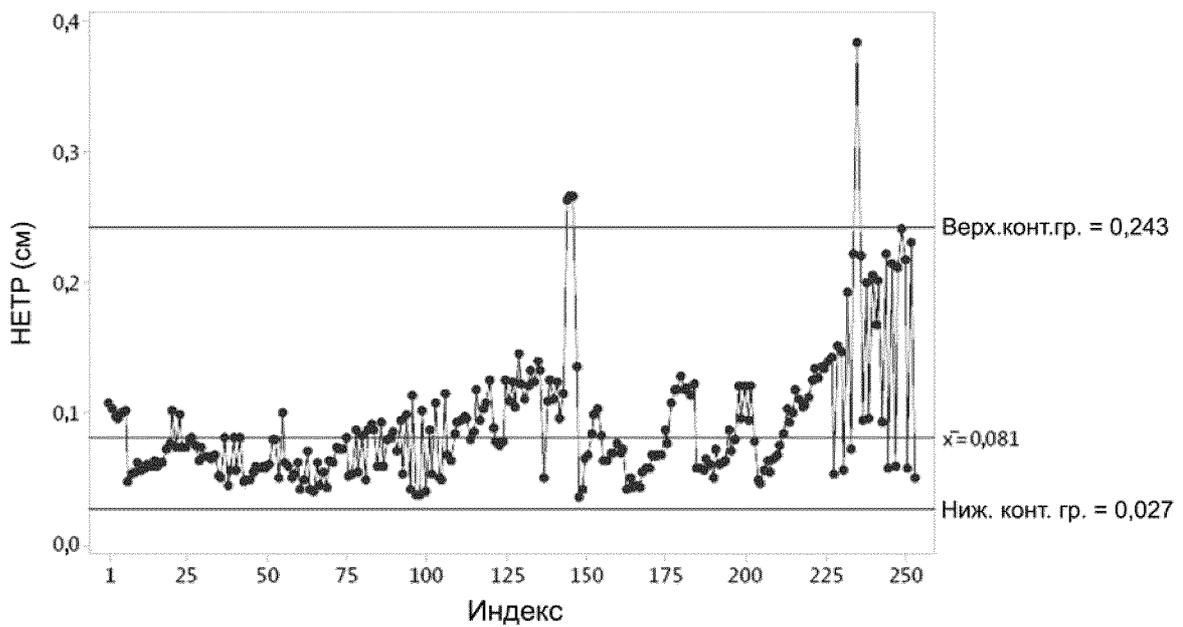
ФИГ. 12

I график НЕТР для уравновеш. ДРС  
с использованием преобразования Бокса — Кокса с  $\lambda = 0,00$



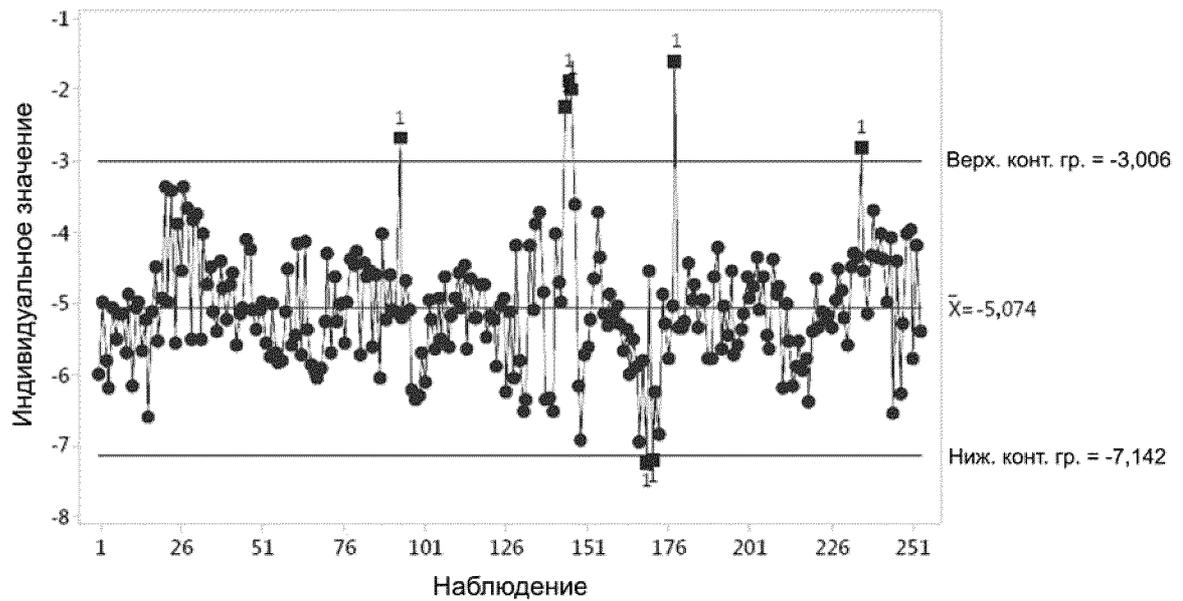
ФИГ. 13

График временного распределения НЕТР для уравновеш. ДРС



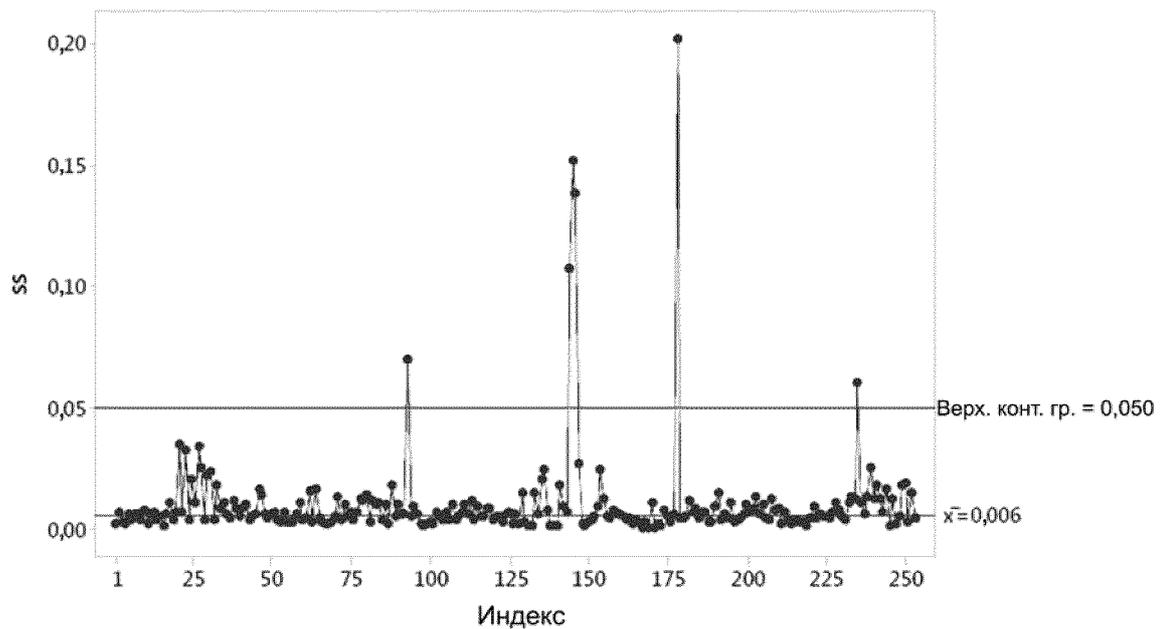
ФИГ. 14

I график ss для уравновеш. ДРС  
с использованием преобразования Бокса — Кокса с  $\lambda = 0,00$



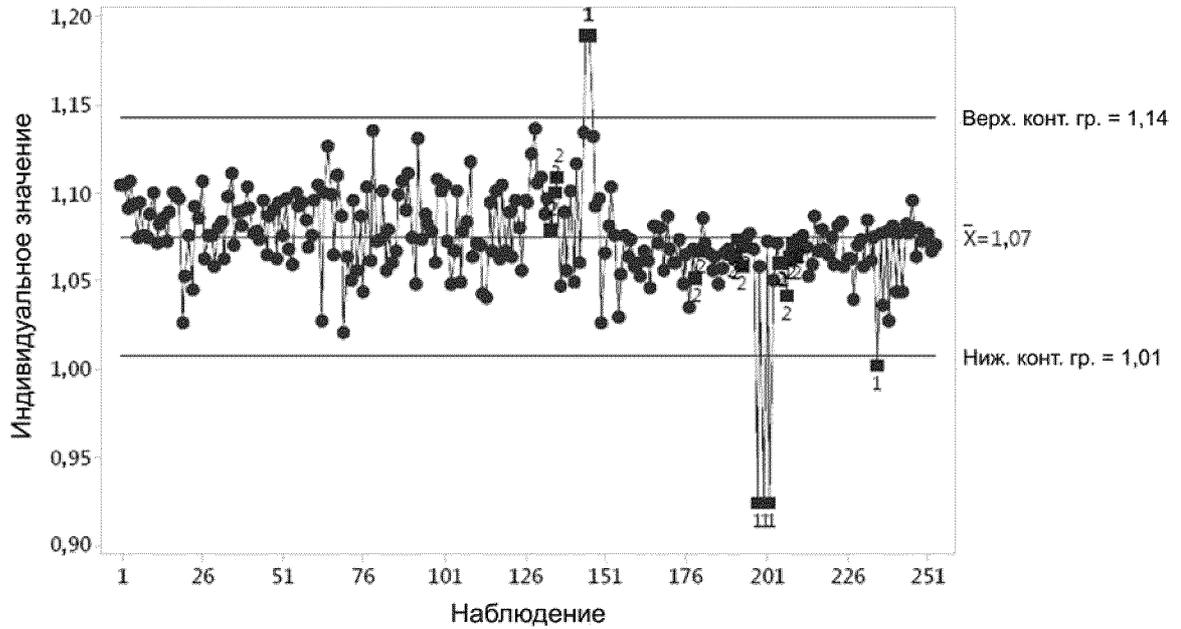
ФИГ. 15

График временного распределения ss для уравновеш. ДРС



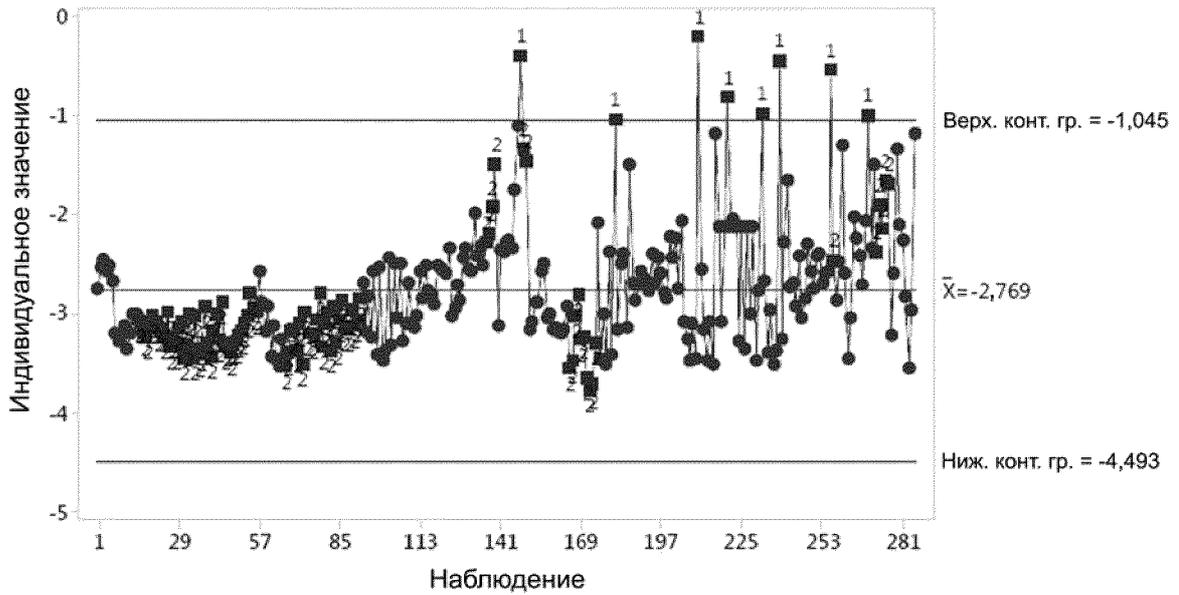
ФИГ. 16

I график среднего ( $V_m$ ) для уравновеш. DPS



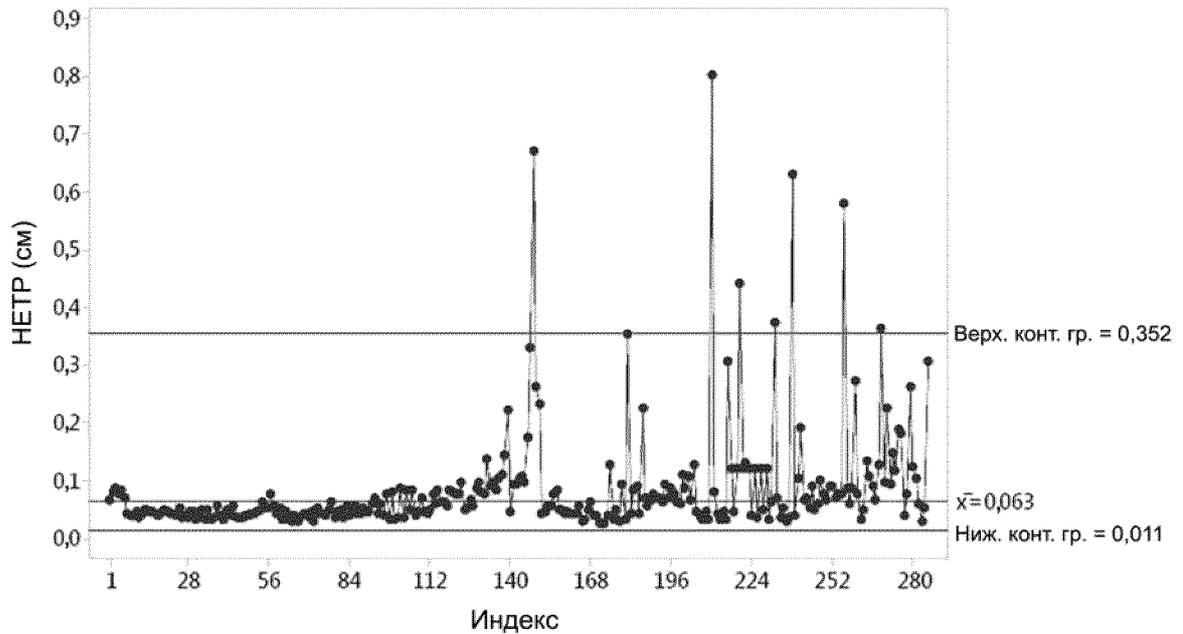
ФИГ. 17

I график НЕТР для отмывки DPS с использованием преобразования Бокса — Кокса с  $\lambda = 0,00$



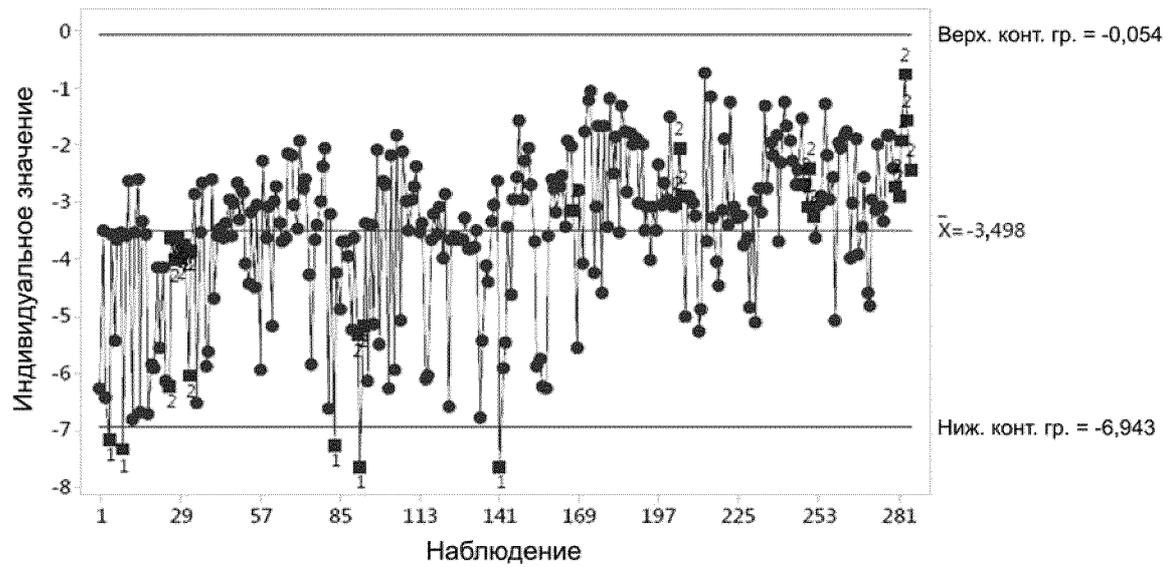
ФИГ. 18

График временного распределения НЕТР для отмывки ДРС



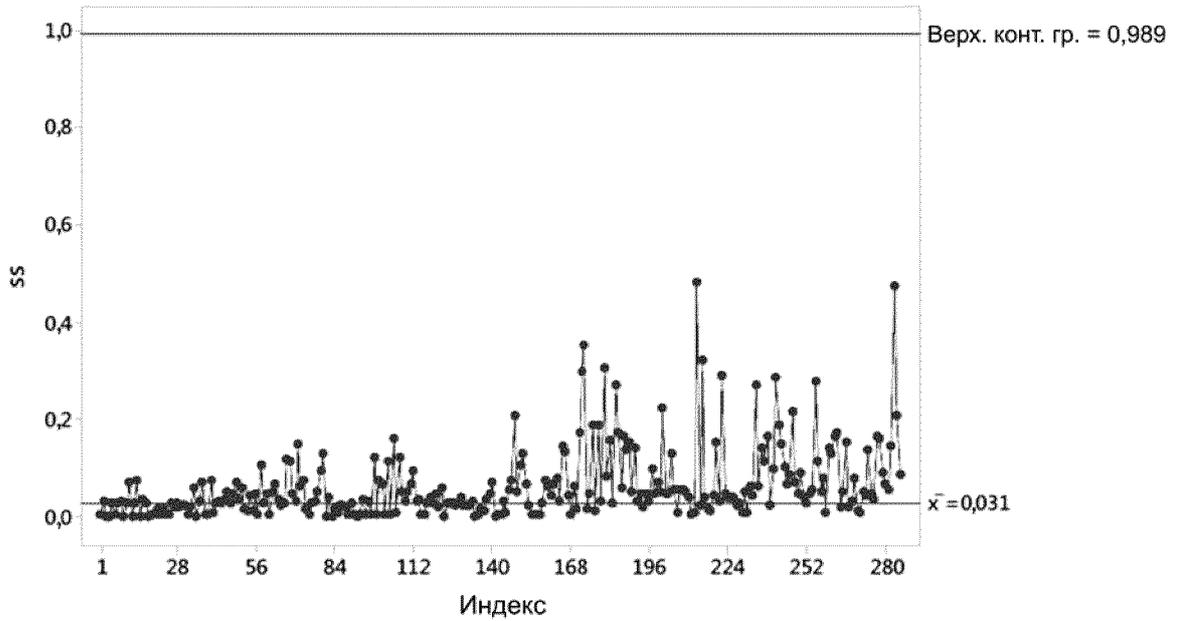
ФИГ. 19

I график ss для отмывки ДРС

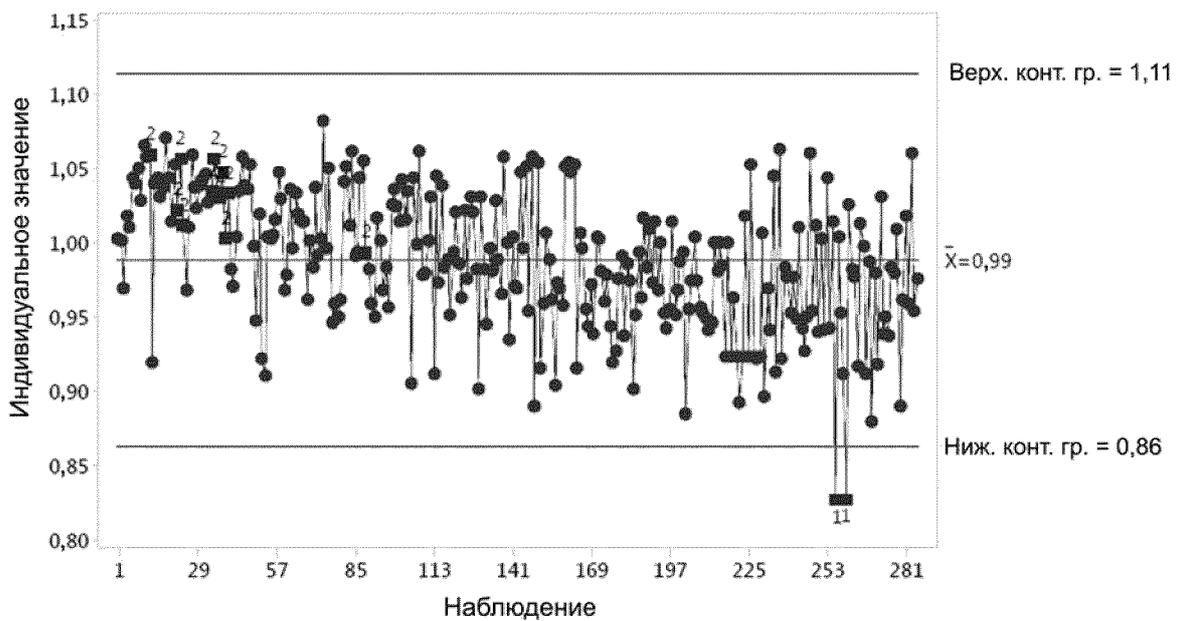
с использованием преобразования Бокса — Кокса с  $\lambda = 0,00$ 

ФИГ. 20

График временного распределения ss для отмывки DPC

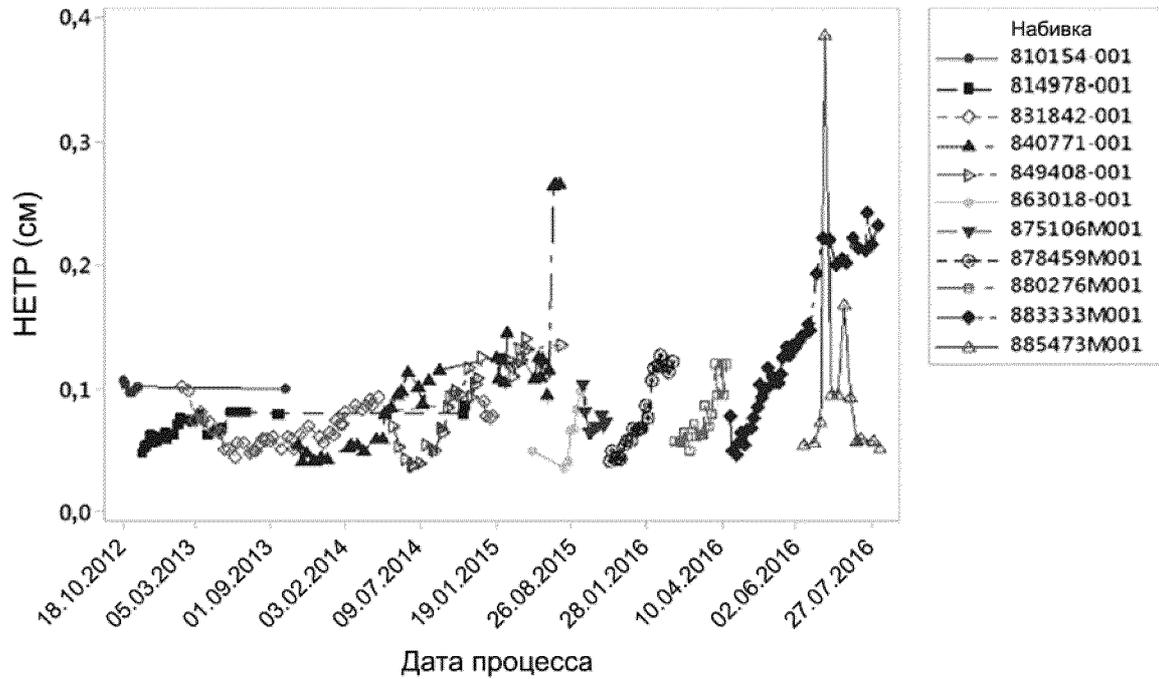


ФИГ. 21

I график среднего ( $V_m$ ) для отмывки DPC

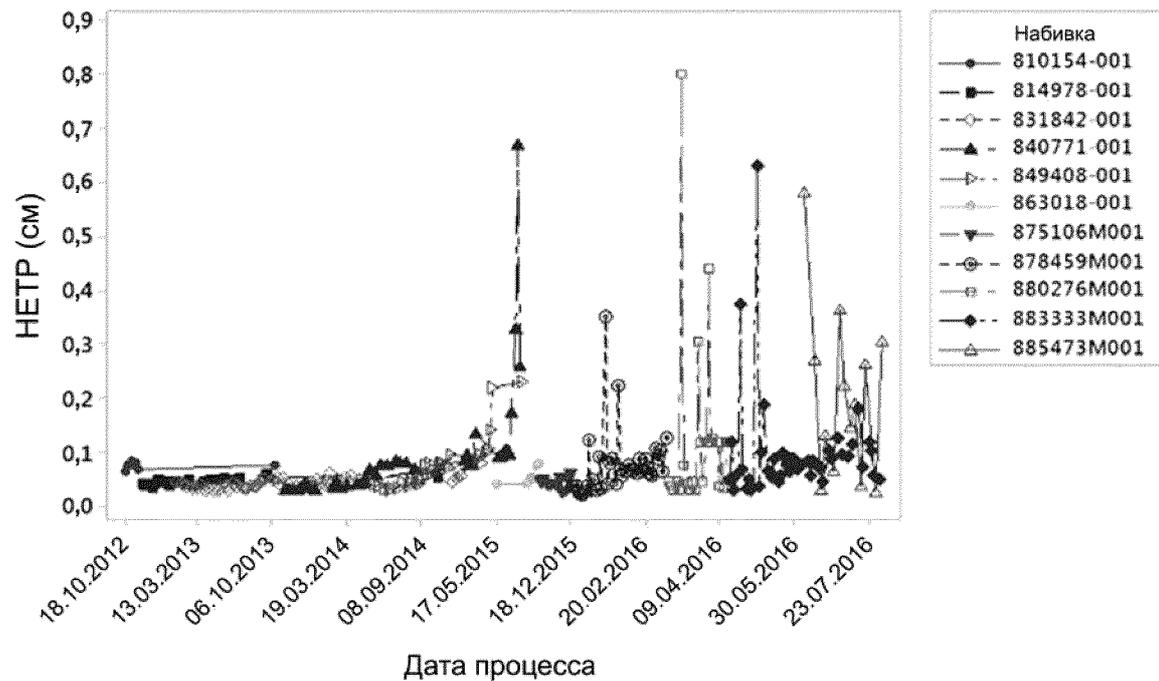
ФИГ. 22

График временного распределения НЕТР для уравниш. DPC



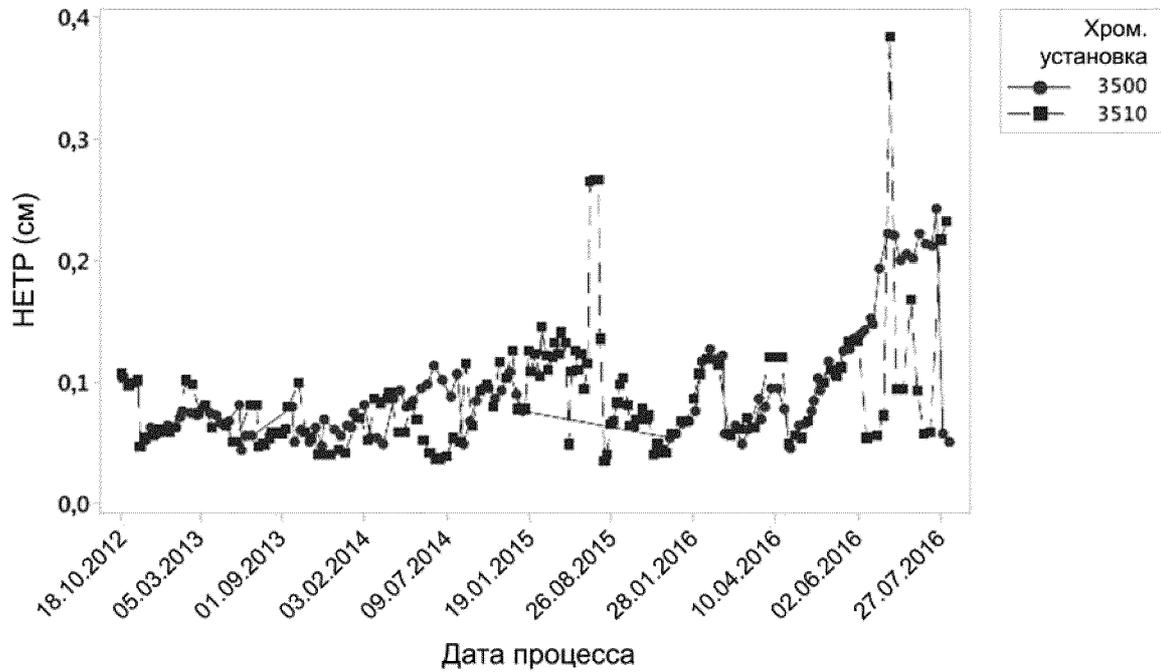
ФИГ. 23

График временного распределения НЕТР для отмывки DPC



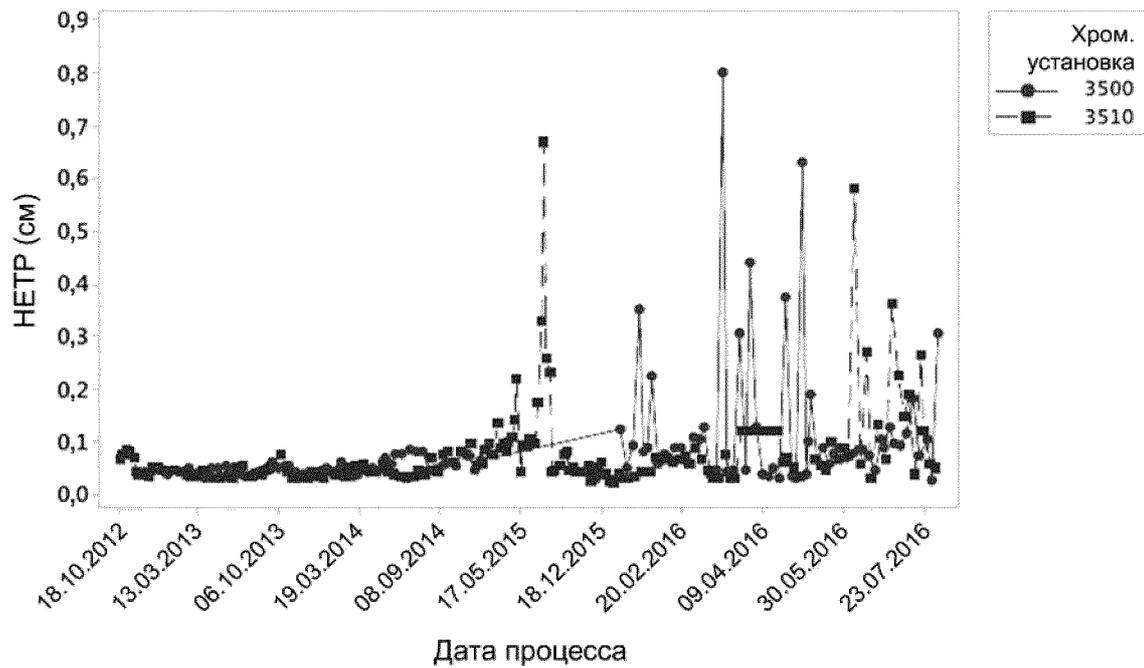
ФИГ. 24

График временного распределения НЕТР для уравновеш. DPS



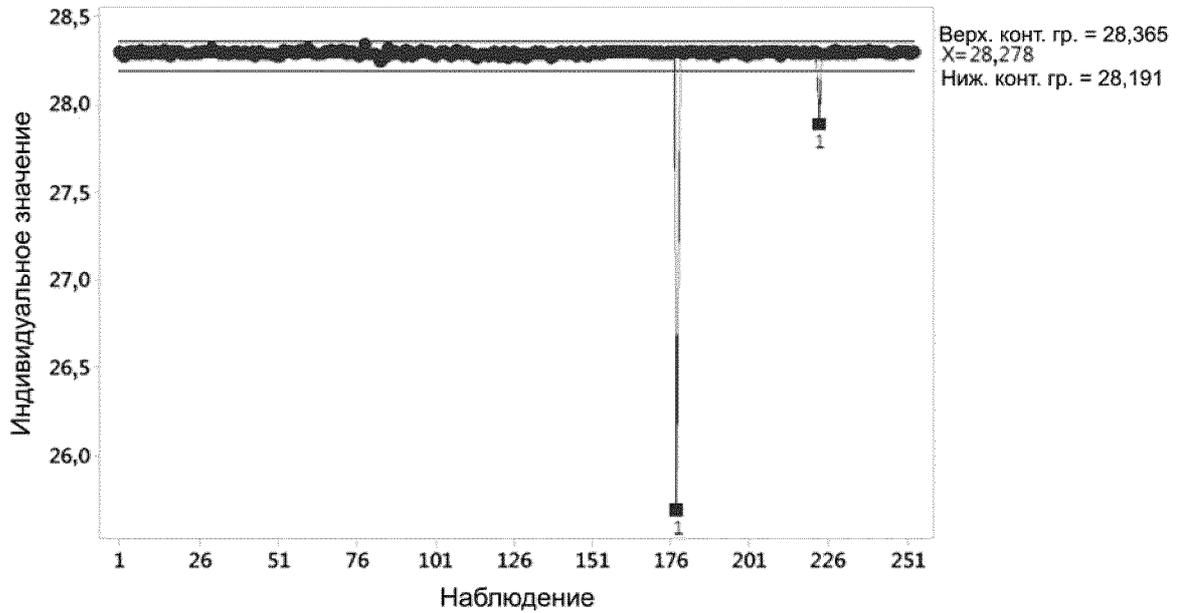
ФИГ. 25

График временного распределения НЕТР для отмывки DPS



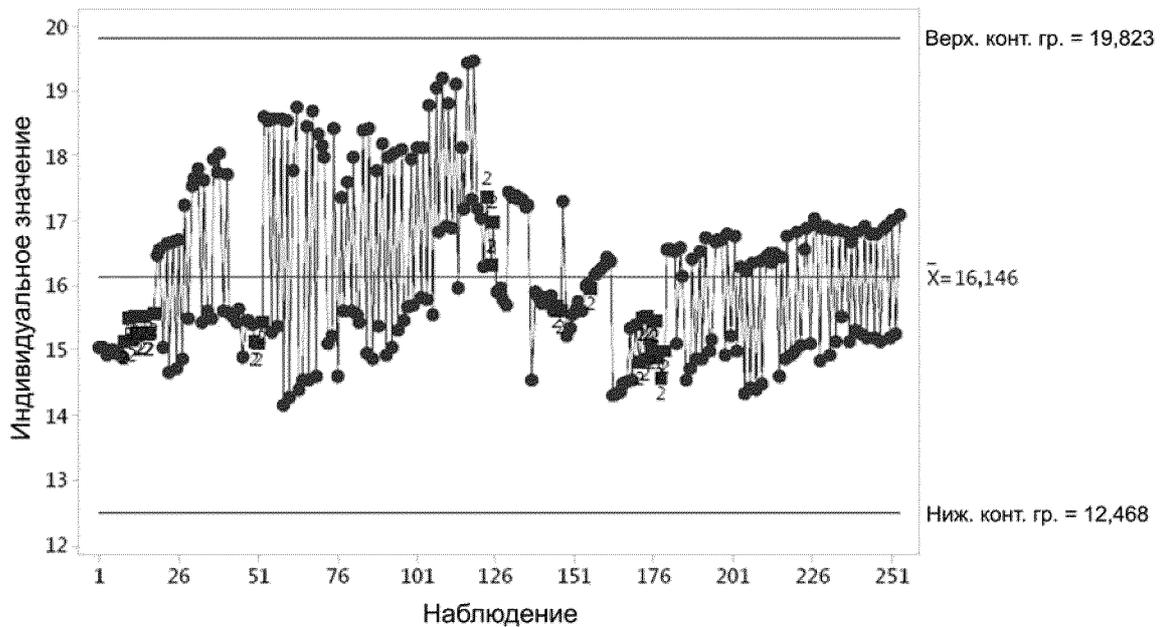
ФИГ. 26

I график среднего потока для уравновеш. ДРС



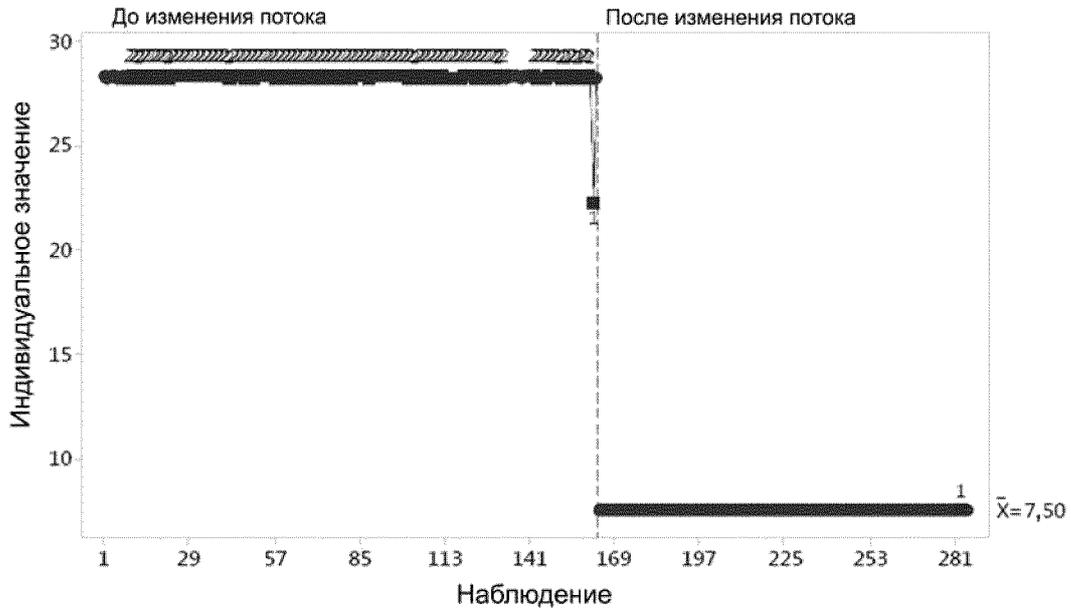
ФИГ. 27

I график среднего давления для уравновеш. ДРС



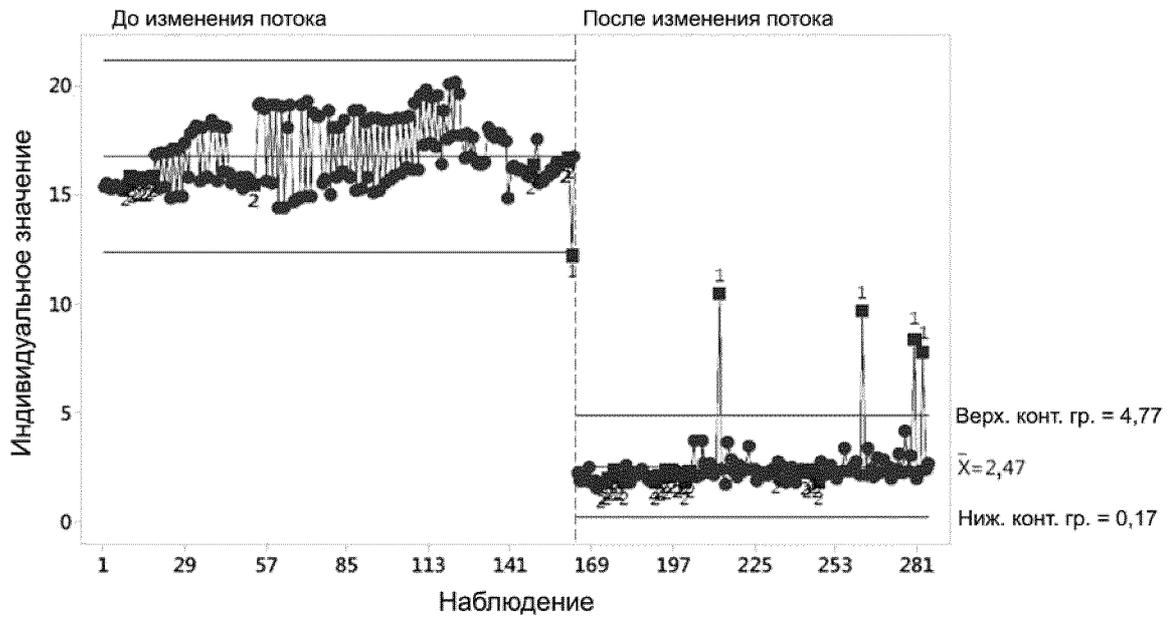
ФИГ. 28

I график среднего потока для отмывки DPC



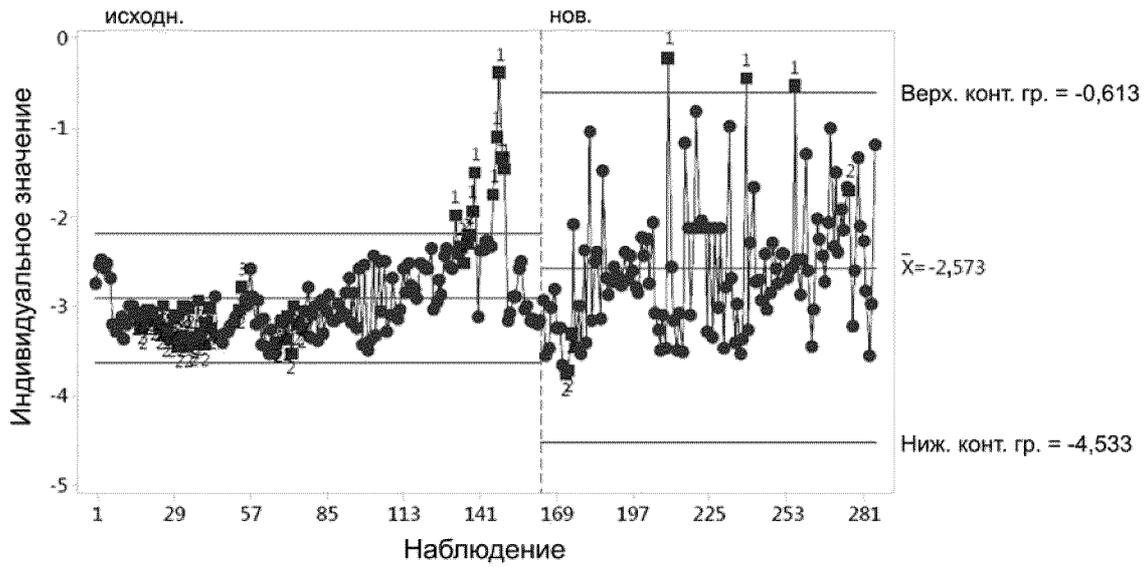
ФИГ. 29

I график среднего давления для отмывки DPC



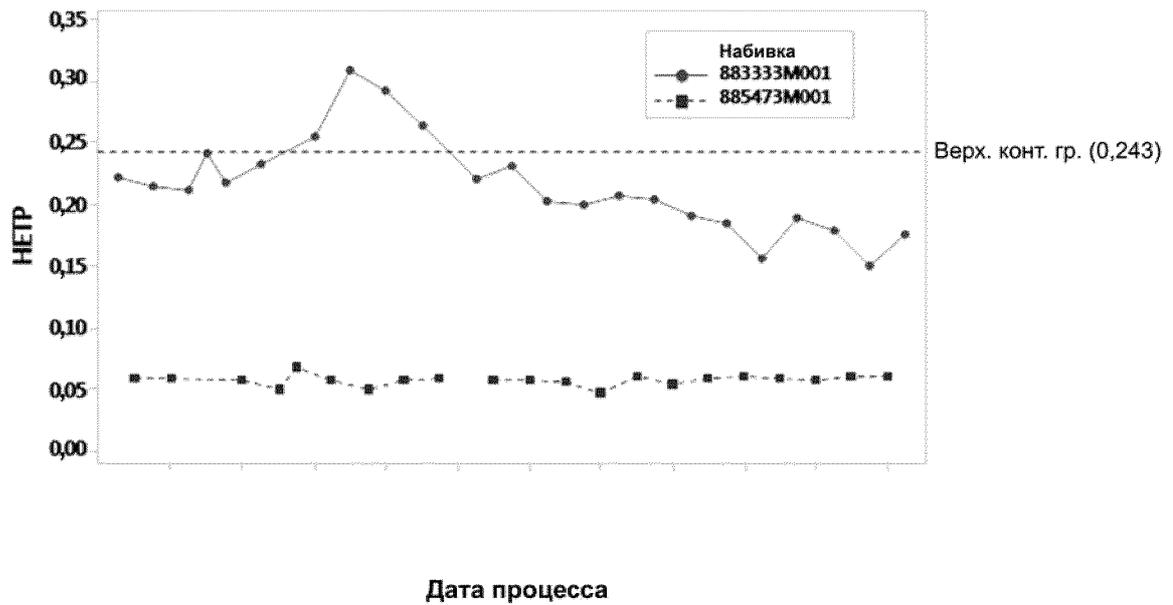
ФИГ. 30

I график НЕТР по потоку исходн. по сравнению с нов.  
с использованием преобразования Бокса — Кокса с  $\lambda = 0,00$



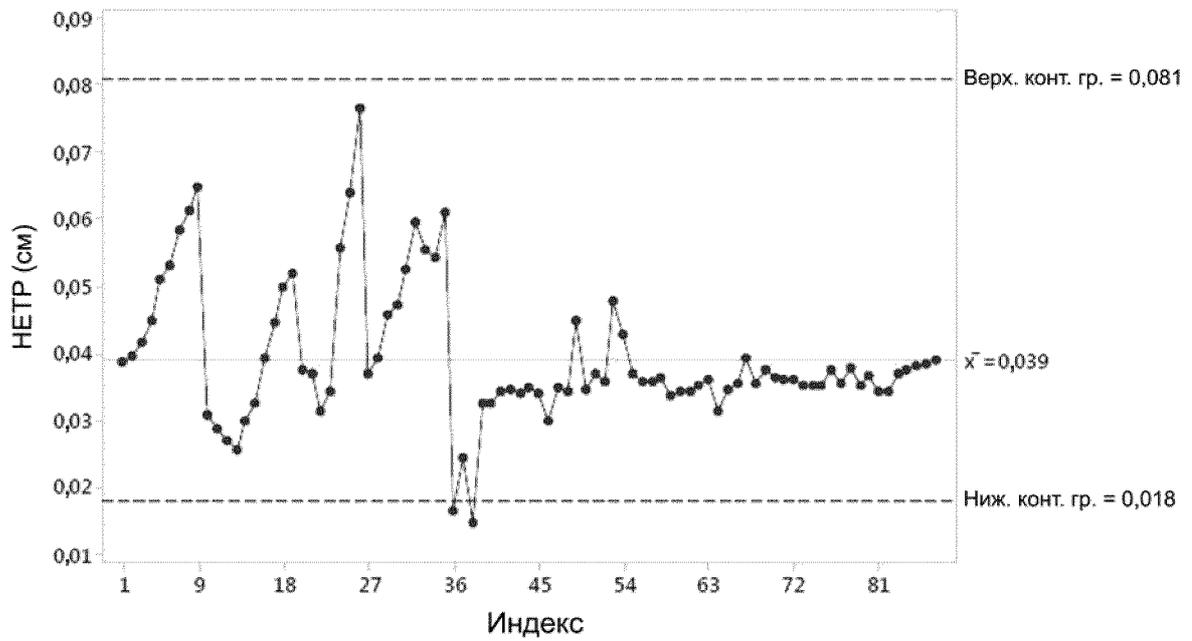
ФИГ. 31

График временного распределения НЕТР для уравнивш. ДРС



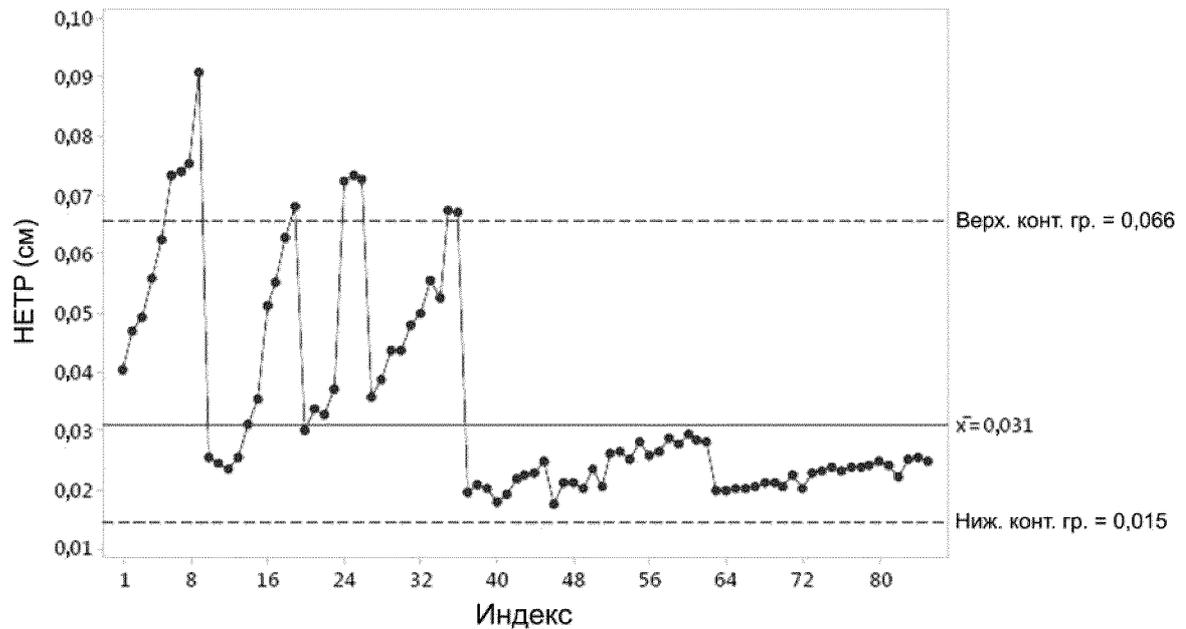
ФИГ. 32

График временного распределения НЕТР для уравновеш. S



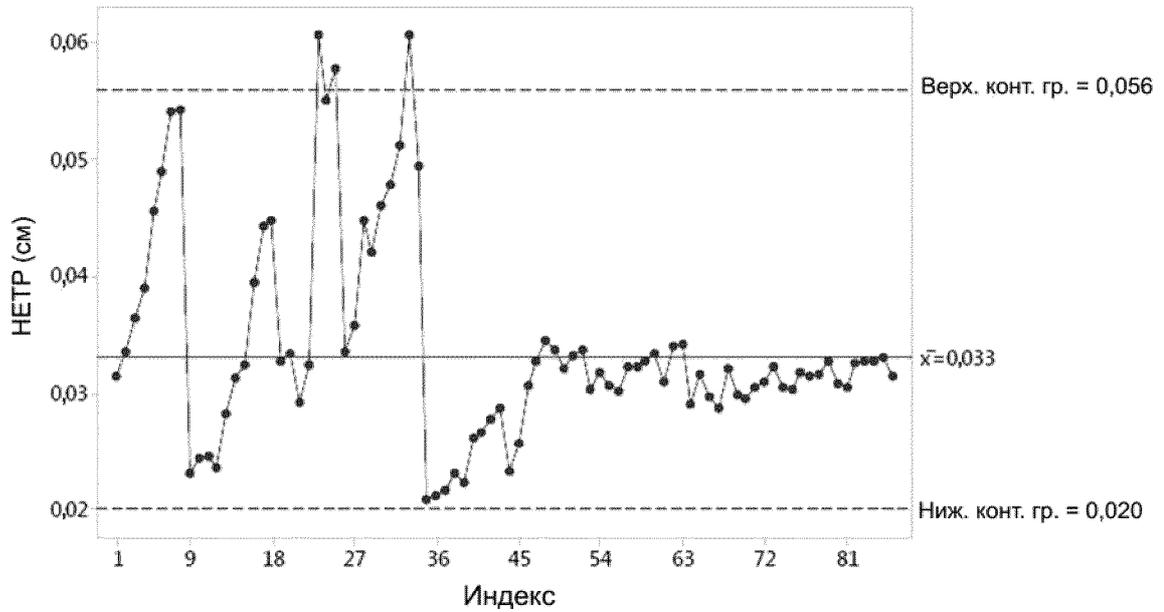
ФИГ. 33

График временного распределения НЕТР для WFI-отмывки S



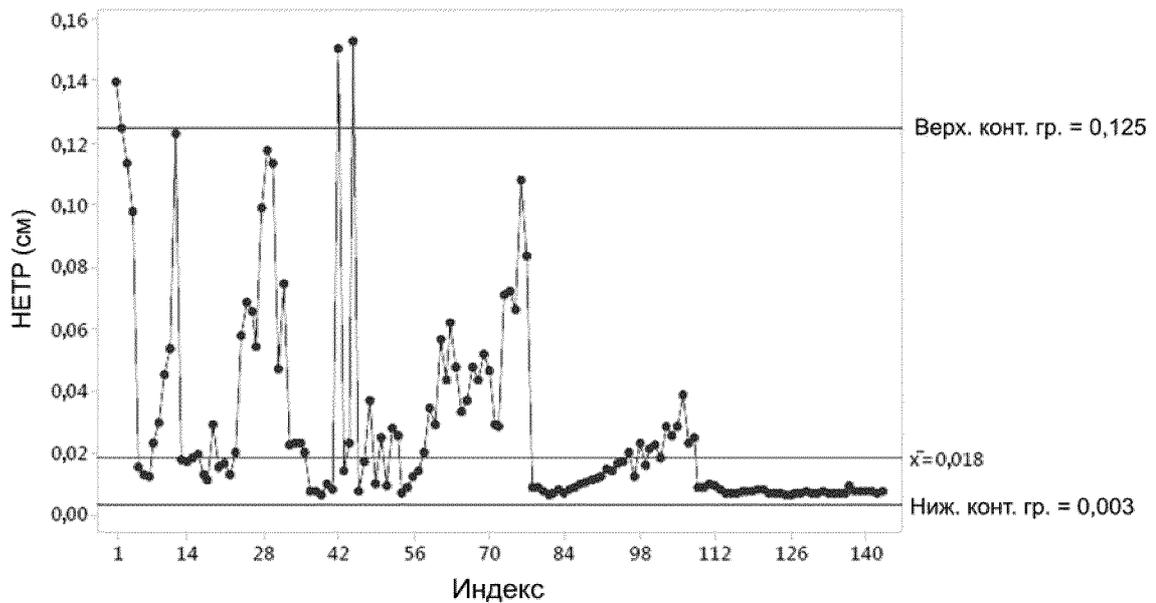
ФИГ. 34

График временного распределения НЕТР для раствора хранения S



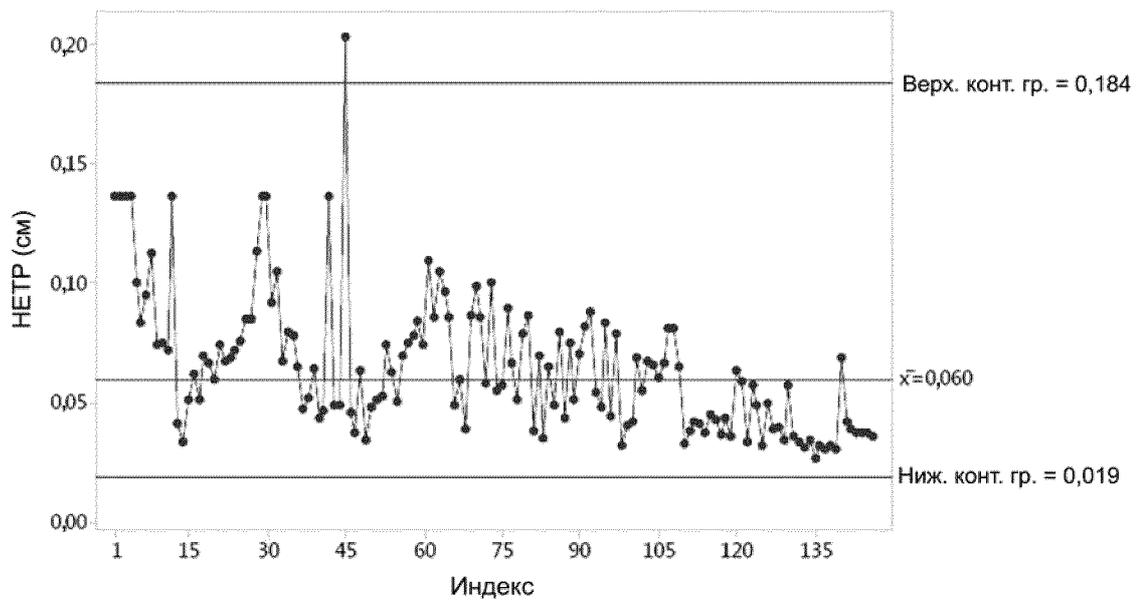
ФИГ. 35

График временного распределения НЕТР для уравновеш. Q2



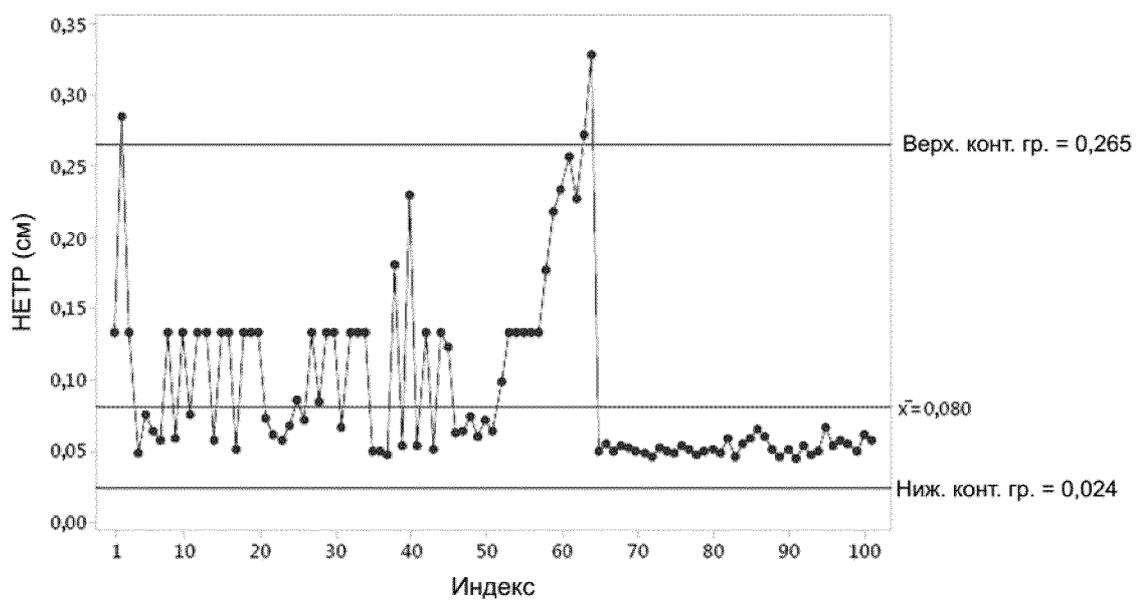
ФИГ. 36

График временного распределения НЕТР для десорбции Q2



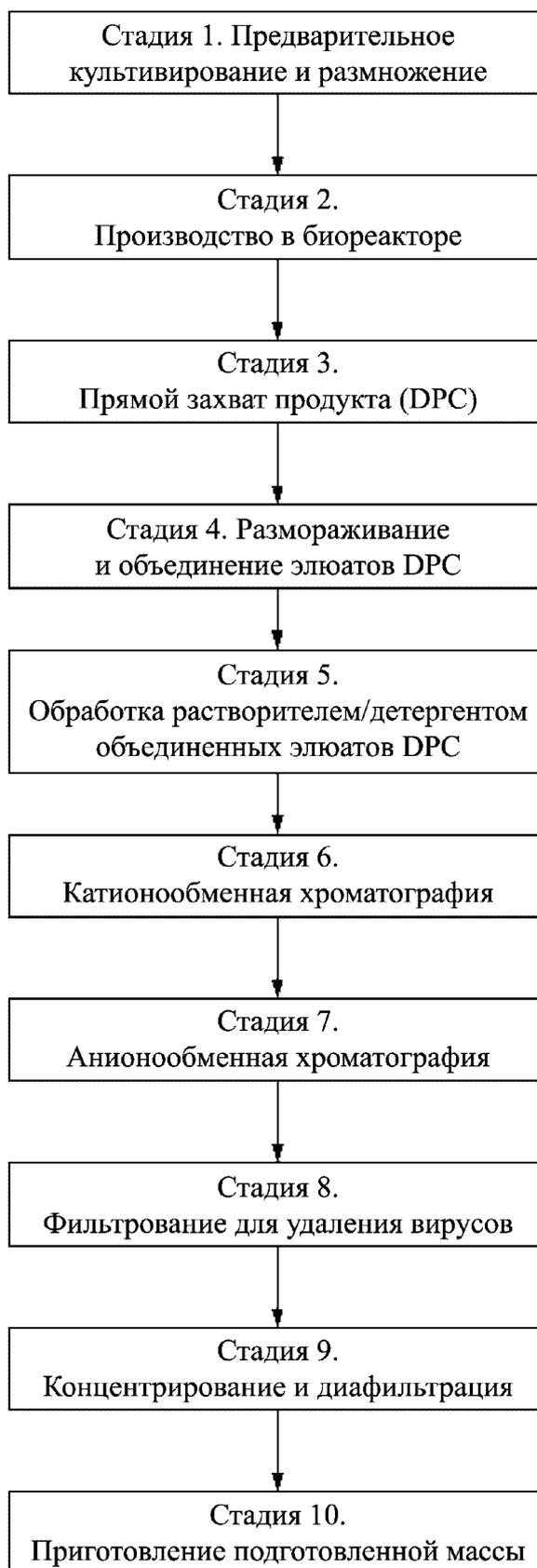
ФИГ. 37

График временного распределения НЕТР для раствора хранения Q2



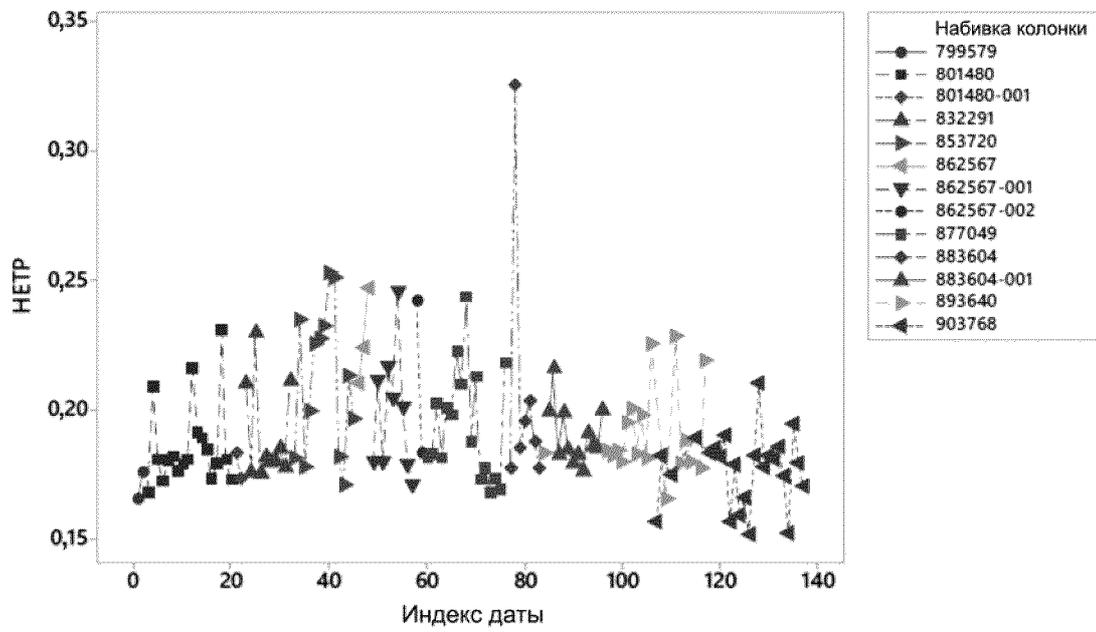
ФИГ. 38

## Обзор производственного процесса, стадии процесса



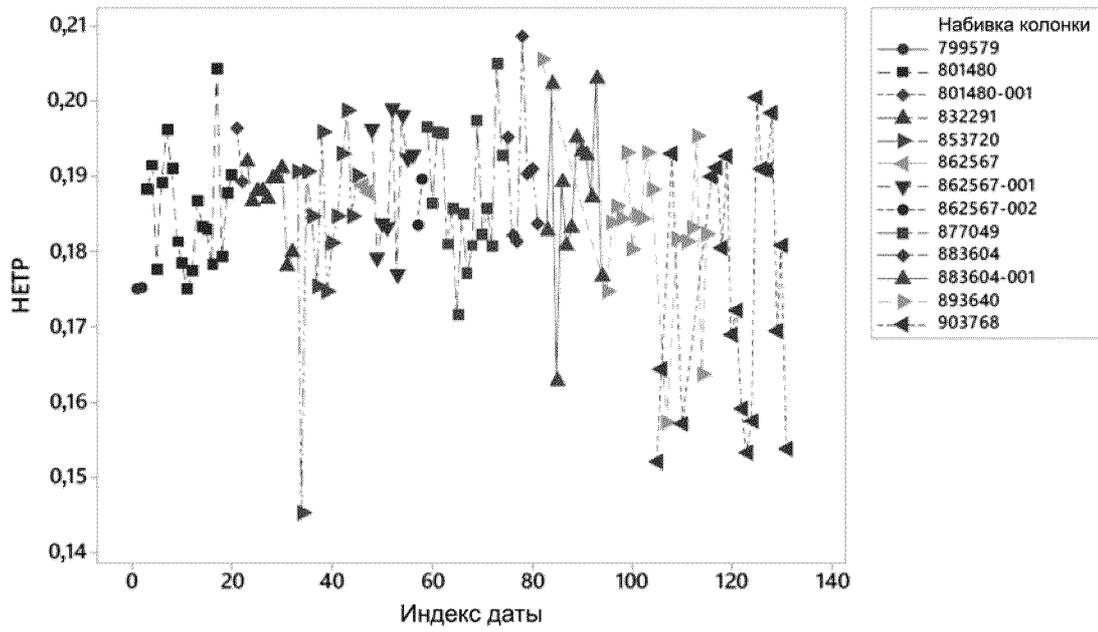
ФИГ. 39

Диаграмма разброса НЕТР в зависимости от индекса даты

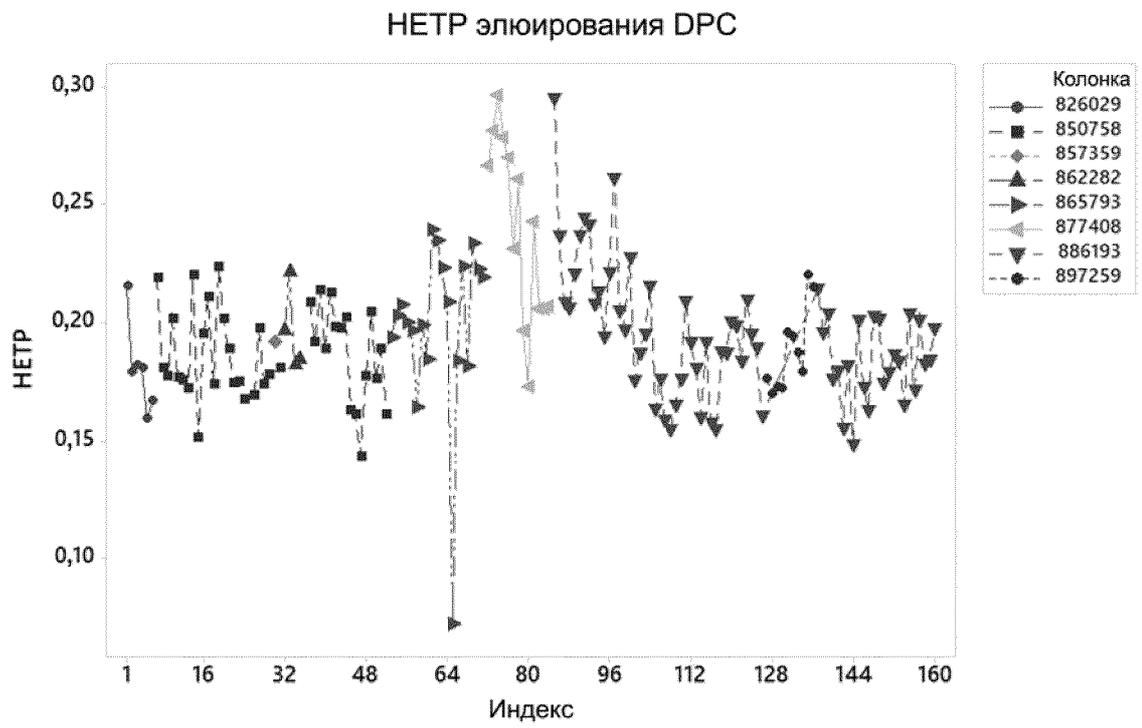


ФИГ. 40

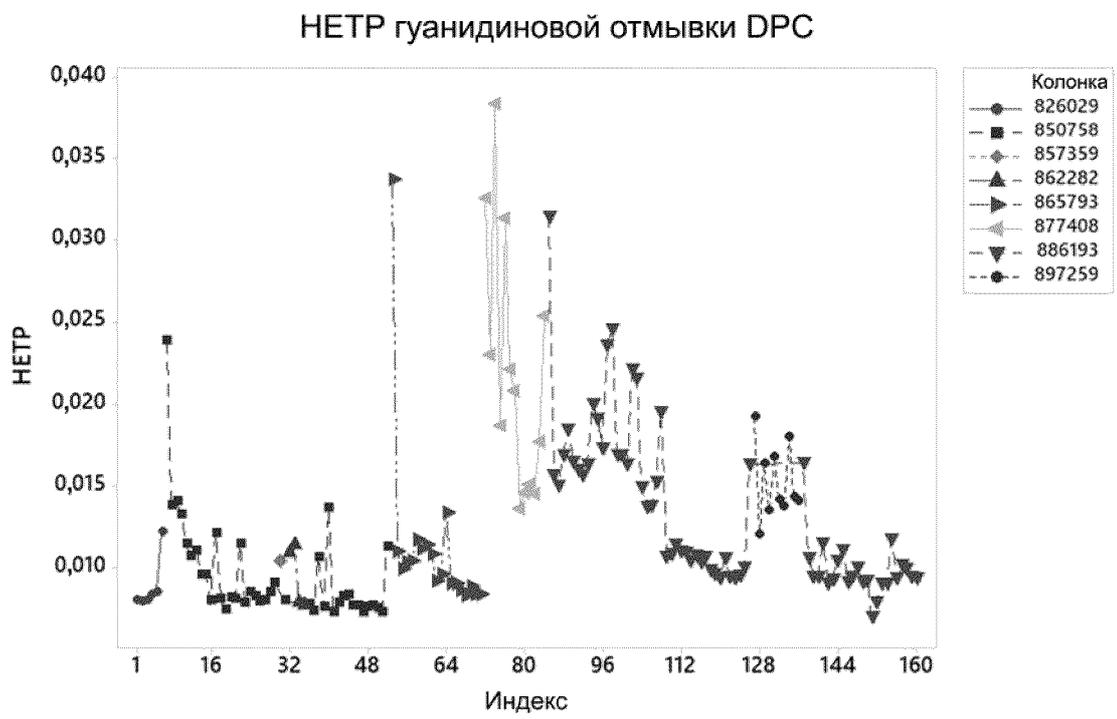
Диаграмма разброса НЕТР в зависимости от индекса даты



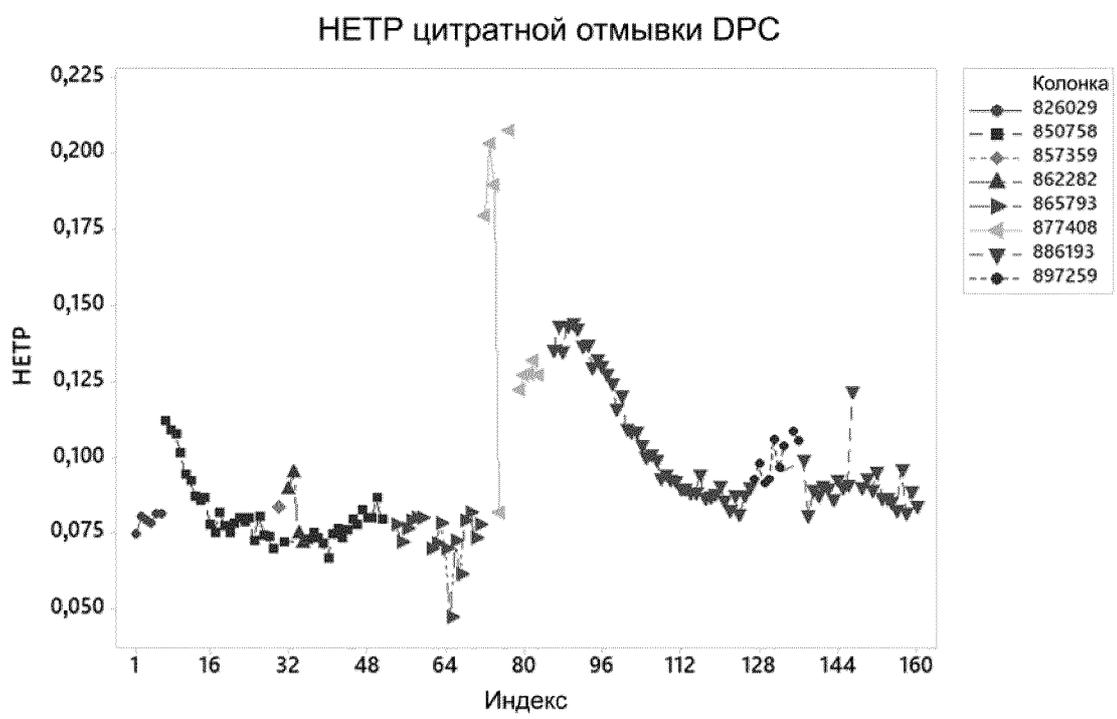
ФИГ. 41



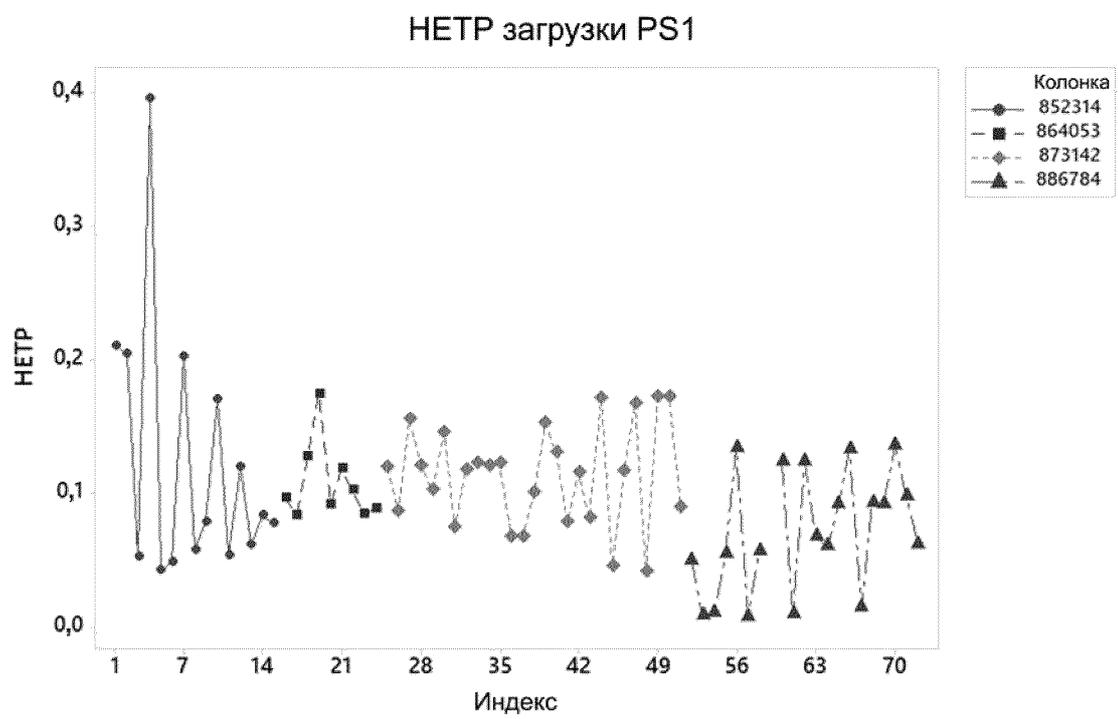
ФИГ. 42



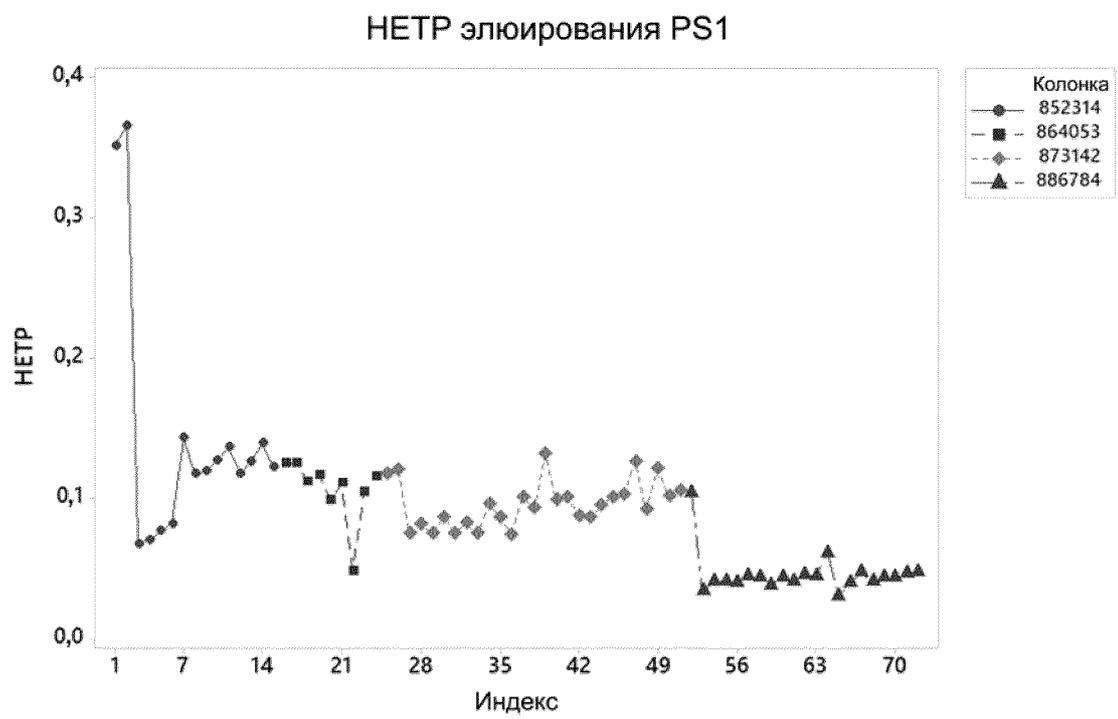
ФИГ. 43



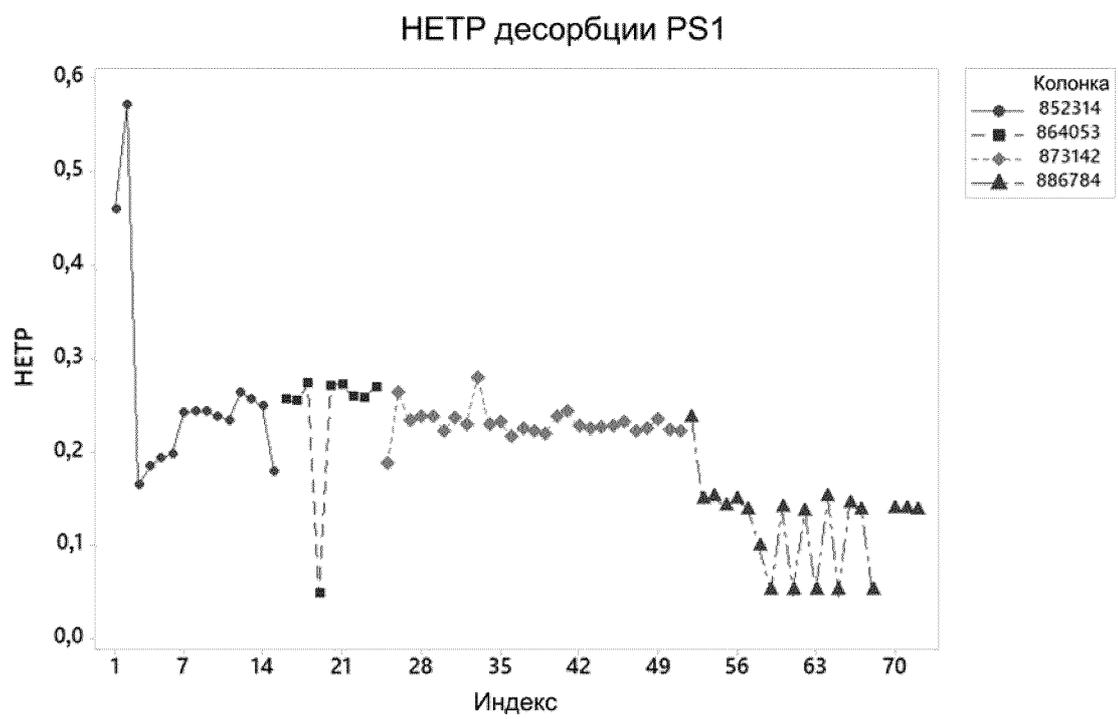
ФИГ. 44



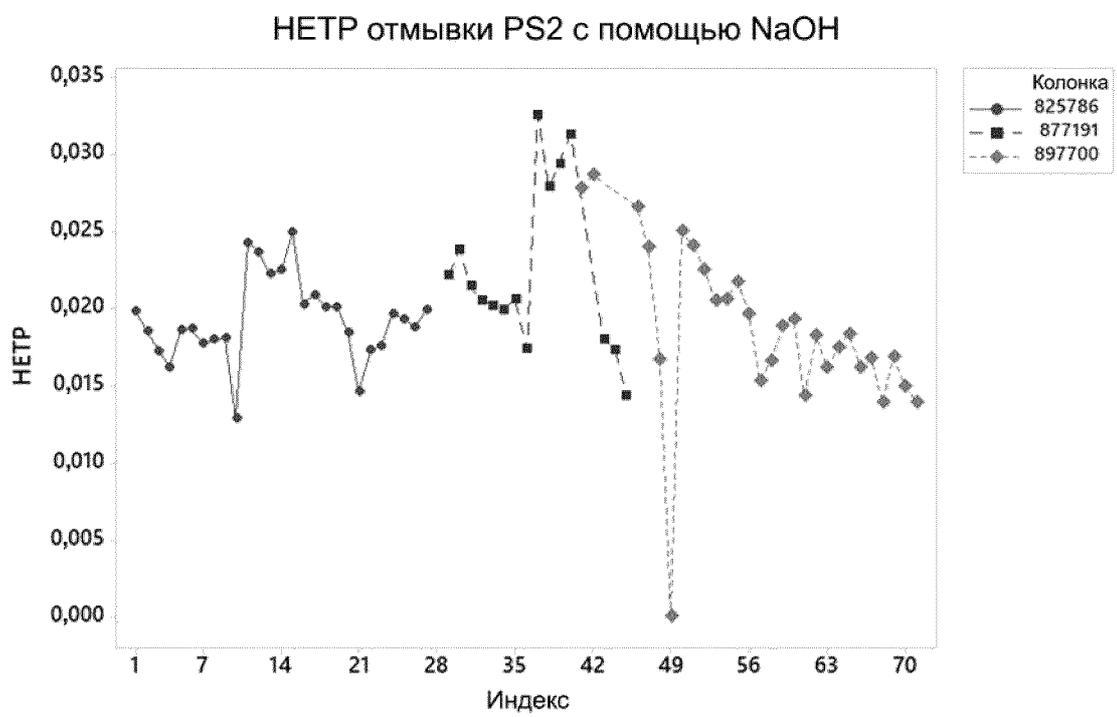
ФИГ. 45



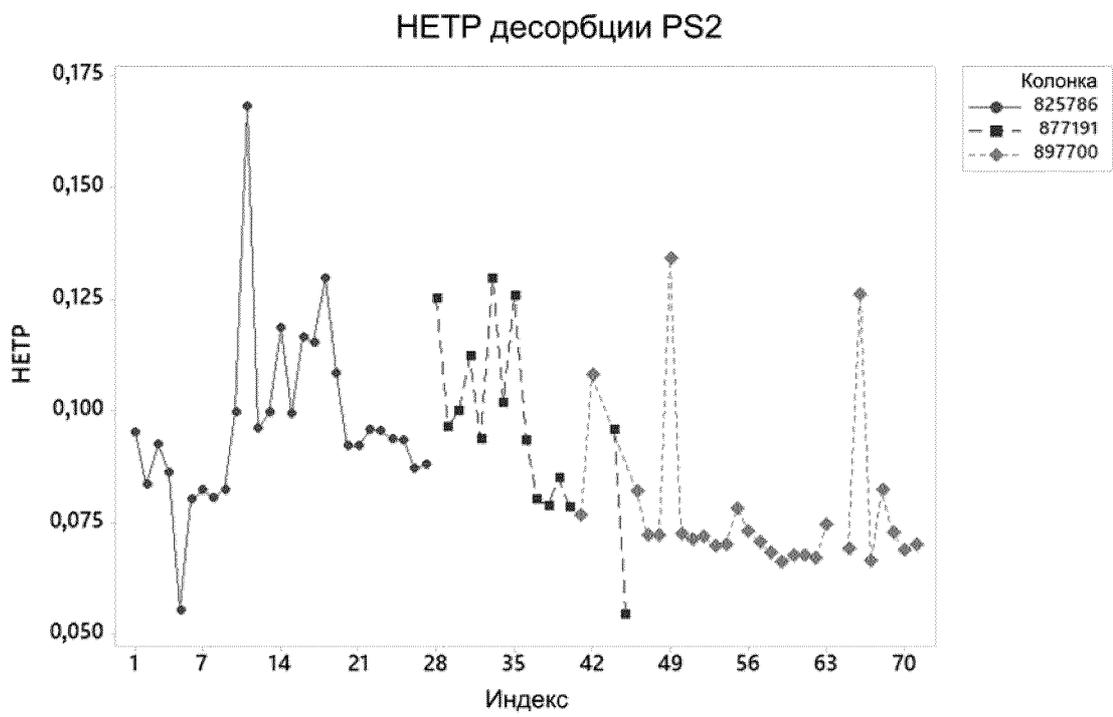
ФИГ. 46



ФИГ. 47



ФИГ. 48



ФИГ. 49