

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039041**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.25

(21) Номер заявки
202092510

(22) Дата подачи заявки
2019.04.19

(51) Int. Cl. **G01N 30/86** (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
G01N 30/56 (2006.01)

(54) **КВАЛИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ В СПОСОБАХ
ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ АНТИТЕЛ К TNF**

(31) **62/660,340**

(32) **2018.04.20**

(33) **US**

(43) **2020.12.30**

(86) **PCT/US2019/028314**

(87) **WO 2019/204721 2019.10.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Рэндолф Пол (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2007117490**
US-B2-8410928
WO-A2-2009094203

GRITTI FABRICE ET AL.: "The rationale for the optimum efficiency of columns packed with new 1.9[μ]m fully porous Titan-C18 particles- A detailed investigation of the intra-particle

diff", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1355, 11 June 2014 (2014-06-11), pages 164-178, XP029034342, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2014.05.076, the whole document

DEEMTER VAN J.J. ET AL.: "LONGITUDINAL DIFFUSION AND RESISTANCE TO MASS TRANSFER AS CAUSES OF NONIDEALITY IN CHROMATOGRAPHY", CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 5, 1 January 1956 (1956-01-01), pages 271-280, XP001040829, ISSN: 0009-2509, DOI: 10.1016/0009-2509(56)80003-1, page 272, right-hand column - page 277, left-hand column

LARSON T.M. ET AL.: "Use of process data to assess chromatographic performance in production-scale protein purification columns", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 19, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 485-492, XP002554312, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/BP025639G [retrieved on 2002-11-06], cited in the application, abstract, page 486, left-hand column

(57) Изобретение относится к способу эксплуатации колонки в промышленных способах изготовления антител к TNF, например антител к TNF- α SIMPONI® (голимумаб) и конкретных фармацевтических композиций антител. Этот способ включает регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время эксплуатации хроматографической колонки, содержащей насадку колонки. Модельную кумулятивную кривую гамма-распределения определяют на основе регистрируемого выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), рассчитывают по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием параметров кумулятивной кривой гамма-распределения, а качество насадки хроматографической колонки оценивают на основе рассчитанного значения ВЭТТ. Если во время регулярного мониторинга колонок наблюдают неблагоприятный тренд в ВЭТТ или превышение контрольных пределов, то для обеспечения качества продукта элюата следует оценить данные производительности процесса с использованием колонки и/или данные очистки примесей для обеспечения качества продукта из выявленной партии. Если качество продукта или производительность не соответствуют установленным критериям, перед запуском в дальнейшую эксплуатацию необходимо предпринять соответствующее корректирующее действие, такое как кондиционирование, повторное наполнение или замена колонки, и провести квалификацию.

B1**039041****039041****B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку

В заявке на данное изобретение испрашивается преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/660,340, поданной 20 апреля 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к способу квалификации хроматографической колонки для промышленных способов изготовления антител к TNF, например антител к TNF- α SIMPONI® (голимумаб) и конкретных фармацевтических композиций антител.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Изобретение содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде через EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII в виде файла с именем "JBI6083USNP1 Sequence Listing", созданного 12 апреля 2019 г., размером 7 КБ. Перечень последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Колоночная хроматография является важной методикой, используемой в процессах очистки для получения терапевтических белков. Производительность колонок необходимо поддерживать на должном уровне по мере масштабирования процесса от уровня лаборатории до уровня промышленного предприятия и на протяжении всего срока службы колонок. При масштабировании процесса могут возникать сложности в процедурах оценки колонки, потенциальные нарушения целостности насадок и сложности в логистике в связи с увеличением диаметра колонки, размера оборудования и потребления буфера.

С помощью текущего способа квалификации хроматографической колонки проводят по высоте, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) - показателю размывания после импульсного впрыска, путем расчета среднего значения по максимуму пика и стандартному отклонению от ширины пика на половине его высоты. Основное ограничение этого способа заключается в том, что он не обеспечивает получение точного показателя размывания (т.е. ВЭТТ), когда форма пика отклоняется от кривой гауссова распределения. Чтобы компенсировать отсутствие чувствительности, для оценки асимметрии проводят второе измерение. Для этого показателя сравнивают ширину переднего и заднего пиков на уровне 10% от максимальной высоты пика. Ограничения данного подхода обуславливают отсутствие чувствительности к изменениям в производительности колонки и часто приходится повторно заполнять или кондиционировать колонку, хотя характеристики колонки являются в действительности приемлемыми. Представлены и другие стратегии квалификации колонки. 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 № 9047438, выданные Belousov et al., и 8410928, выданный Ganguly). Подходы с использованием гауссова распределения имеют те же ограничения чувствительности, что и способ со впрыском, а описанные подходы с использованием негауссова распределения требуют сложных вычислений.

Для отслеживания изменений производительности хроматографической колонки во время повторяющейся работы и оценки эффективности, с которой колонка будет работать в течение срока ее службы, необходима улучшенная процедура квалификации с большей чувствительностью и более рационально определенными пределами. Настоящее изобретение относится к устранению этого недостатка в данной области.

Изложение сущности изобретения

Варианты осуществления изобретения определены соответственно независимыми и зависимыми пунктами формулы изобретения, приложенными 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 графическими материалами.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ эксплуатации хроматографической колонки в способах изготовления для получения антител к TNF, антитела к TNF содержат тяжелую цепь (ТЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (ЛЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее антигенсвязывающий фрагмент, а также специфические фармацевтические композиции антител. Этот способ включает регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала по меньшей мере одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции хроматографической колонки, содержащей насадку колонки. Этот способ дополнительно включает определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе зарегистрированного выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для переднего переходного фронта или формулы Ib для заднего переходного фронта:

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

или

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

где С представляет собой выходной сигнал колонки для заданного V;

V представляет собой суммарный поток, деленный на объем колонки;

k, θ и V_i представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для образования кривой.

Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), рассчитывают по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров кумулятивной кривой гамма-распределения k, θ :

$$\text{ВЭТТ} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \text{ Формула II}$$

где $\mu = k\theta + V_i$,

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

и

L = длина колонки.

Качество насадки хроматографической колонки оценивают на основании рассчитанного значения ВЭТТ. На основании этой оценки хроматографическую колонку повторно используют, кондиционируют, заменяют или повторно наполняют.

Был разработан новый способ оценки целостности колонки, называемый в настоящем документе анализом перехода гамма-распределения (GDТА). В новом способе используется математическая модель для аппроксимации кривой с помощью данных переходного фронта подвижной фазы, которые получают на регулярных этапах процесса эксплуатации колонок. Затем параметры модели кривой используют для расчета размывания при движении по слою колонки в качестве показателя качества колонки. Переходные фронты подвижной фазы возникают в результате дискретных стадий процесса очистки хроматографированием, в котором используют начальные буферные/промывочные растворы с различными свойствами, такими как проводимость, pH и/или буферизирующие компоненты. Способ по существу можно применять к любым одному или более переходным фронтам подвижной фазы, получаемым при обработке нормально-фазовой колонки.

Основное преимущество способа GDТА заключается в том, что он обеспечивает более чувствительное устройство измерения размывания при прохождении по слою колонки, чем способ оценки ВЭТТ способом Гаусса. При использовании GDТА больше не требуется измерять асимметрию, поскольку при применении модели GDТА получают правильные измерения размывания с помощью аппроксимированной кривой. Кроме того, применение функции гамма-распределения упрощает анализ фронтальных переходов по сравнению с ранее описанными альтернативными негауссовыми способами. Использование переходов подвижной фазы, уже присутствующих в хроматографическом процессе, позволяет избежать необходимости в дополнительных автономных этапах обработки. Более того, во многих случаях исторические данные позволяют установить исторические диапазоны эффективности колонки перед практическим применением. Наконец, способ GDТА может быть автоматизирован для обеспечения стабильного применения.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ эксплуатации хроматографической колонки для получения антител к TNF, причем антитела к TNF содержат тяжелую цепь (ТЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (ЛЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее антигенсвязывающий фрагмент, причем указанный способ включает

регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции хроматографической колонки, содержащей насадку колонки;

определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основании зарегистрированного выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для переднего переходного фронта или формулы Ib для заднего переходного фронта:

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

или

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

где С - выходной сигнал колонки для заданного V;

V представляет собой суммарный поток, деленный на объем колонки;

k, θ и V_i представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для образо-

вания кривой;

расчет значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров кумулятивной кривой гамма-распределения k , θ и V_i :

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

где $\mu = k\theta + V_i$;

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

L = длина колонки; и

оценка качества насадки хроматографической колонки на основе указанного рассчитанного значения ВЭТТ.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, дополнительно включающий кондиционирование, замену или повторное наполнение хроматографической колонки на основе указанной оценки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, дополнительно включающий

регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала для соответствующего переходного фронта подвижной фазы во время одного или более последующих применений насадки хроматографической колонки;

выполнение указанного определения и указанного вычисления с помощью выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока, зарегистрированных во время каждого из одного или более последующих применений насадки хроматографической колонки;

определение значения ВЭТТ насадки хроматографической колонки во время каждого из указанных одного или более последующих применений на основании указанного исполнения;

составление тренда определенных значений ВЭТТ насадки хроматографической колонки для двух или более последующих применений;

определение изменения качества насадки хроматографической колонки на основании указанного составленного тренда, причем указанное кондиционирование, замена или повторное наполнение хроматографической колонки основаны на указанном определении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором увеличение значения ВЭТТ насадки хроматографической колонки в одном или более последующих применениях указанной насадки колонки по сравнению со значением ВЭТТ насадки хроматографической колонки в одном или более ранних применениях указанной насадки колонки определяет снижение качества насадки хроматографической колонки.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором регистрируют выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока для двух или более различных фронтов перехода подвижной фазы во время указанной первой операции наполнения колонки, причем указанный способ включает

выполнение указанного определения и вычисления с помощью выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока, регистрируемых для каждого из двух или более различных фронтов перехода подвижной фазы независимо для вычисления значения ВЭТТ для каждого из двух или более различных фронтов перехода подвижной фазы;

оценку качества насадки хроматографической колонки на основе двух или более рассчитанных значений ВЭТТ, при этом указанное кондиционирование, замена или повторное наполнение хроматографической колонки зависят от указанной оценки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором хроматографическую колонку выбирают из группы, состоящей из колонки для аффинной хроматографии на белке А, колонки для катионообменной хроматографии и колонки для анионообменной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором колонка для аффинной хроматографии на белке А содержит колонку A MabSelect™, для аффинной хроматографии на белке катионообменной хроматографии содержит колонку UNOsphere S™ для катионообменной хроматографии, а колонка для анионообменной хроматографии содержит колонку Q Sepharose™ XL для анионообменной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором переходный фронт подвижной фазы в колонке для аффинной хроматографии на белке А создают из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образующегося при элюировании антител к TNF, фронта, образующегося при санации колонки гуанидин гидрохлоридом, фронта, образующегося при промывке колонки после санации 0,1 М цитрата натрия, pH 3,5.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, в котором переходный фронт подвижной фазы в колонке для катионообменной хроматографии образуется из одного

или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образующегося при загрузке обработанного растворителем/детергентом (Р/Д) материала, содержащего антитела к TNF, фронта, образующегося при элюировании антител к TNF, и фронта, образующегося в течение полосы колонки.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу, в котором переходный фронт подвижной фазы в колонке для катионообменной хроматографии образуется из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образующегося в процессе очистки колонны гидроксидом натрия, и фронта, образующегося в ходе снятия белка с колонки.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А, 1В представлены графики иллюстративной аппроксимированной кривой анализа перехода гамма-распределения. На фиг. 1А представлен график, на котором показана иллюстративная аппроксимированная кривая перехода гамма-распределения на основе данных перехода подвижной фазы. На фиг. 1В представлен график, на котором показана иллюстративная аппроксимированная кривая перехода гамма-распределения на основе данных перехода подвижной фазы с параметрами, полученными из этой кривой, используемыми для вычисления высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), в качестве показателя эффективности колонки.

На фиг. 2 представлена схема, на которой показана система квалификации хроматографической колонки, описанной в настоящем документе.

На фиг. 3 представлен график плотности вероятности ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А без преобразования.

На фиг. 4 показан график плотности вероятности суммы квадратов (СК) для фронта уравнивания колонки на белке А без преобразования.

На фиг. 5 представлен график плотности вероятности ВЭТТ для фронта промывки колонки на белке А без преобразования.

На фиг. 6 показан график плотности вероятности СК для фронта промывки колонки на основе связывания с белком А без преобразования.

На фиг. 7 представлен график плотности вероятности ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$).

На фиг. 8 представлен график плотности вероятности СК для фронта уравнивания колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$).

На фиг. 9 представлен график плотности вероятности ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$).

На фиг. 10 представлен график плотности вероятности СК для фронта уравнивания колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$).

На фиг. 11 показан график плотности вероятности средней величины (V_m) для уравнивания колонки на белке А.

На фиг. 12 показан график плотности вероятности среднего значения (V_m) для фронта промывки колонки на белке А.

На фиг. 13 представлена контрольная диаграмма ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$). UCL = верхний контрольный предел; LCL = нижний контрольный предел. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 14 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А. Верхний контрольный предел получен на основе преобразованных данных, показанных на фиг. 13.

На фиг. 15 представлена контрольная диаграмма СК для фронта уравнивания колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$). Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 16 представлен график временных рядов СК для фронта уравнивания колонки на белке А. Верхний контрольный предел получен на основе преобразованных данных, показанных на фиг. 15.

На фиг. 17 показана контрольная диаграмма среднего значения (V_m) для фронта уравнивания колонки на белке А. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 18 представлена контрольная диаграмма ВЭТТ для фронта промывки колонки на белке А с

преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$). Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 19 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта промывки колонки на белке А. Верхний контрольный предел получен на основе преобразованных данных, показанных на фиг. 18.

На фиг. 20 представлена контрольная диаграмма СК для фронта промывки колонки на белке А с преобразованием на основе натурального логарифма ($\lambda=0$). Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 21 представлен график временных рядов СК для фронта промывки колонки на белке А. Верхний контрольный предел получен на основе преобразованных данных, показанных на фиг. 20.

На фиг. 22 показана контрольная диаграмма среднего значения (V_m) для фронта промывки колонки на белке А. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 23 представлен график временных рядов результатов ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А с прямым связыванием продукта (ПСП), сгруппированных в зависимости от системы колонки.

На фиг. 24 представлен график временных рядов результатов ВЭТТ для фронта промывки колонки на белке А с ПСП, сгруппированных в зависимости от системы колонки.

На фиг. 25 представлен график временных рядов результатов ВЭТТ для фронта уравнивания колонки на белке А с ПСП, сгруппированных в зависимости от установки.

На фиг. 26 представлен график временных рядов результатов ВЭТТ для фронта промывки колонки на белке А, сгруппированных в зависимости от установки.

На фиг. 27 представлен график, показывающий среднюю скорость потока для уравнивания колонки на белке А с ПСП. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 28 представлен график, показывающий среднее предколоночное давление во время уравнивания. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 29 представлен график, показывающий среднюю скорость потока промывочного раствора для фронта промывки колонки на белке А с ПСП. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 30 представлен график, показывающий среднее давление промывочного раствора для фронта промывки колонки на белке А с ПСП. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 31 представлен график, оказывающий ВЭТТ до и после изменения скорости потока промывочного раствора. Пронумерованные точки на графике показывают выбросы и/или тренды, очевидные для результатов ВЭТТ, на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, т.е. 1 обозначает выход одной точки за контрольные пределы, 2 обозначает восемь точек на одной стороне от центральной линии, а 3 обозначает шесть последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

На фиг. 32 представлен график временных рядов ВЭТТ для двух различных насадок колонок на белке А, при оценке на основе фронта уравнивания для 45 партий препарата REMICADE® (инфликсимаб).

На фиг. 33 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта уравнивания колонки SP-Sepharose High Performance (SPHP). Контрольные пределы рассчитывали на основе данных преобра-

зования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма.

На фиг. 34 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта промывки водой для инъекций колонки с SPHP. Контрольные пределы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма.

На фиг. 35 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта раствора для консервации колонки с SPHP. Контрольные пределы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма.

На фиг. 36 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта раствора уравнивания колонки Q2. Контрольные пределы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма.

На фиг. 37 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта раствора уравнивания колонки Q2 при снятии белка с колонки. Контрольные пределы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма.

На фиг. 38 представлен график временных рядов ВЭТТ для фронта раствора консервации колонки Q2. Контрольные пределы рассчитывали на основе данных преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма.

На фиг. 39 показан обзор девяти этапов способа изготовления голимумаба.

На фиг. 40 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 3 колонки для аффинной хроматографии на белке MabSelect™ для фронта, образующегося во время элюирования препарата SIMPONI® (голимумаба). ПСП обозначает прямое связывание продукта SIMPONI® (голимумаб) на колонке Mab Select™ на белке А.

На фиг. 41 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 3 для колонки Mab Select™ для аффинной хроматографии на белке А для фронта, образующегося во время санации гуанидин гидрохлоридом. ПСП обозначает прямое связывание продукта SIMPONI® (голимумаб) на колонке Mab Select™ на белке А.

На фиг. 42 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 3 для колонки Mab Select™ для аффинной хроматографии на белке для фронта, образующегося во время промывки 0,1 М цитратом натрия с pH 3,5 после санации. ПСП обозначает прямое связывание продукта SIMPONI® (голимумаб) на колонке Mab Select™ на белке А.

На фиг. 43 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 6 для колонки для катионообменной хроматографии UNOsphere S™ для фронта, образующегося во время загрузки материала, обработанного растворителем /детергентом (P/D), содержащего SIMPONI® (голимумаб). PS1 обозначает этап 1 заключительной очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке UNOsphere S™.

На фиг. 44 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 6 для колонки UNOsphere S™ для катионообменной хроматографии для фронта, образующегося во время элюирования препарата SIMPONI® (голимумаба). PS1 обозначает этап 1 заключительной очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке UNOsphere S™.

На фиг. 45 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 6 для колонки для катионообменной хроматографии UNOsphere S™ для фронта, образующегося во время снятия белка с колонки. PS1 обозначает этап 1 заключительной очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке UNOsphere S™.

На фиг. 46 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 7 для колонки для анионообменной хроматографии Q Sepharose™ XL для фронта, образующегося во время очистки едким натром. PS2 обозначает этап 2 заключительной очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке Q Sepharose™ XL.

На фиг. 47 представлена диаграмма, показывающая результаты ВЭТТ на стадии 7 для колонки для анионообменной хроматографии Q Sepharose™ XL для фронта, образующегося во время снятия белка с колонки. PS2 обозначает этап 2 заключительной очистки для SIMPONI® (голимумаба) на колонке Q Sepharose™ XL.

Подробное описание изобретения

Настоящее описание относится к усовершенствованной процедуре квалификации для отслеживания изменений в слоях заполненных хроматографических колонок во время повторяющейся операции колонки в промышленных способах изготовления антител к TNF, например антитела к TNF- α SIMPONI® (голимумаб) и конкретных фармацевтических композиций антител. Данный способ, независимо от масштаба, представляет собой практическое средство для оценки эффективности, с которой колонка будет работать в течение всего ее срока эксплуатации.

Эффективность разделения в хроматографической колонки часто характеризуют с использованием хроматографической модели теоретических тарелок. При использовании этого подхода хроматографическая колонка воспринимается как состоящая из ряда ступеней или теоретических тарелок. Каждая тарелка представляет собой расстояние, на котором компоненты образца достигают равновесия между под-

вижной и неподвижной фазами (см. Van Deemter, Zuiderweg and Klinkenberg, "Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography," Chem. Engng. Sci. 5:271-289 (1956), содержание которой полностью включено в данный документ путем отсылки). Эффективность колонки измеряют количеством теоретических тарелок в колонке N_p , где большее количество тарелок в колонке означает большее число уравниваний, меньшее число размываний хроматографических полос, более узкие пики и более качественное разделение. Чем больше количество тарелок в данной колонке, тем ниже высота тарелки. Соответственно, эффективность колонки также может быть измерена путем вычисления высоты пластины, которая называется "высотой, эквивалентной теоретической тарелке" или ВЭТТ. При таком подходе, чем меньше значение ВЭТТ, тем выше эффективность разделения колонки.

ВЭТТ рассчитывают путем деления длины хроматографической колонки L на число теоретических тарелок N_p :

$$ВЭТТ = L/N_p$$

Исторически сложилось так, что число имеющихся в колонке теоретических тарелок определяли путем изучения хроматографического пика после импульсного впрыска с использованием следующей формулы:

$$N_p = \frac{5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2}{}$$

где t_R представляет собой время удержания;

$w_{1/2}$ представляет собой ширину пика на половине высоты.

Однако такой подход не обеспечивает точный показатель эффективности колонки, когда форма пика, используемого для вычисления N_p , отклоняется от гауссова распределения. Чтобы компенсировать отсутствие чувствительности, для оценки асимметрии пика проводят второе измерение. Для этого показателя сравнивают ширину переднего и заднего пиков на уровне 10% от максимальной высоты пика. Как описано выше, эта модель не обладает чувствительностью к обнаружению изменений в производительности колонки.

Способ, описанный в настоящем документе, обеспечивает альтернативное и более точное измерение ВЭТТ, которое основано на гамма-распределении по одному или более фронтам перехода подвижной фазы, которые происходят во время стандартной эксплуатации хроматографической колонки. Таким образом, настоящее описание относится к способу эксплуатации хроматографической колонки. Этот способ включает регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервалов по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции на хроматографической колонке, включающей заполнение колонки. Этот способ дополнительно включает определение модельной кумулятивной кривой гамма распределения на основе зарегистрированных выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для переднего переходного фронта или формулы Ib для заднего фронта:

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

или

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

Что касается формулы Ia и формулы Ib, C представляет собой выходной сигнал колонки для заданного V , V представляет собой суммарный поток, деленный на объем колонки, а k , θ и V_i представляют собой форму, параметры масштаба и смещения, используемые для образования кривой. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), рассчитывают по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров кумулятивной кривой гамма-распределения k , θ и V_i :

$$ВЭТТ = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \text{ Формула II}$$

где $\mu = k\theta + V_i$;

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

L = длина колонки.

Качество насадки хроматографической колонки оценивают на основании рассчитанного значения ВЭТТ. На основании оценки качества колонки определяют, является ли хроматографическая колонка приемлемой для последующего использования или ее необходимо кондиционировать, заменить или повторно заполнить.

Способ квалификации колонки, описанный в настоящем документе, может быть применен к любой хроматографической колонке. Примеры хроматографических колонок включают, помимо прочего, ко-

лонки, используемые для жидкостной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, молекулярно-ситовой хроматографии, сверхкритической жидкостной хроматографии, газовой хроматографии, эксклюзионной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии, двумерной хроматографии, жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ), противоточной хроматографии, хиральной хроматографии, водной нормально-фазовой (НФ) хроматографии, хроматографии со смешанным режимом и псевдоаффинной хроматографии. Иллюстративная насадка колонки включает, помимо прочего, насадку для аффинной хроматографии (например, насадку для аффинной хроматографии на основе белка А или белка G), насадку для ионообменной хроматографии (например, катионообменные смолы (карбоксиметильные смолы), анионообменные смолы (аминоэтильные смолы) и насадку для хроматографии со смешанным режимом), насадку для адсорбционной хроматографии (например, силикагеля или насадки на основе оксида алюминия), насадку для гидрофобной хроматографии (например, насадки из фенил-сефарозы, азаренофильных смол или м-аминофенилбороновой кислоты), насадку для металл-хелатной аффинной хроматографии (например, Ni(II)- и Cu(II)-аффинные материалы), насадку для эксклюзионной хроматографии (например, насадку для гель-электрофореза или капиллярного электрофореза) или насадку для молекулярно-ситовой хроматографии (например, полистирол).

Описанный в настоящем документе способ может быть применен в ходе операций стандартной эксплуатации хроматографической колонки, например, в ходе выделения, очистки или идентификации химических или биологических соединений в пробе. Такие соединения могут включать, например, помимо прочего, белки (например, антитела и их фрагменты), нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, органические малые молекулы, неорганические малые молекулы, вирусы, липосомы и гибриды или варианты любых таких соединений.

В отличие от предыдущих способов квалификации колонки, в которых при проведении испытаний колонка должна быть отключена от производственного процесса, например, в способе импульсного впрыска, описанный в настоящем документе способ применяют во время стандартной эксплуатации колонки. В настоящем способе используется преимущество переходов процесса подвижной фазы, включающих начальные буферы и растворы с различными свойствами, которые проявляются в ходе стандартного процесса очистки в колонке.

В соответствии со способом по настоящему изобретению "подвижная фаза" представляет собой жидкую фазу в колоночной хроматографии, которая окружает и перемещается через неподвижный хроматографический материал насадки хроматографической колонки. Во время эксплуатации хроматографической колонки состав и свойства подвижной фазы часто изменяются на каждом этапе процесса, например уравнивания, промывки и т.д. Изменения свойств подвижной фазы можно обнаруживать и измерять в элюате, т.е. в подвижной фазе, которая вымывается из колонки после перемещения через неподвижную фазу. В настоящем документе термин "выходной сигнал колонки" означает сигнал о физическом или химическом свойстве элюата из подвижной фазы, который обнаруживают при элюировании элюата из колонки. Физическим или химическим свойством, обеспечивающим выходной сигнал колонки, может быть любое свойство, такое как pH, проводимость, светопоглощение, флуоресценция, заряд, концентрация соли, поляриметрия, показатель преломления, электрохимическая реакция, отношение массы к заряду, т.е. свойство, которое можно измерить с помощью любого типичного хроматографического детектора. Хроматографические детекторы, подходящие для измерения выходного сигнала колонки, включают, помимо прочего, масс-спектрометр, инфракрасный спектрометр, спектрометр в видимой области спектра, ультрафиолетовый спектрометр, ИК-Фурье-спектрофотометр, пламенно-ионизационный детектор, детектор рассеяния лазерного излучения под малым углом, диодно-матричный детектор, флуоресцентный спектрометр, детектор pH, детектор электропроводности, электрохимический детектор и рефрактометрический детектор.

На выходе колонки регистрируют сигнал элюата. Дополнительно, кроме регистрации выходного сигнала колонки также регистрируют "суммарный поток". "Суммарный поток" представляет собой общий объем текучей среды, элюируемой из колонки с течением времени. Это значение делят на объем колонки, который выражают в единицах объема колонки.

Переходный фронт образуется при изменении выходного сигнала колонки относительно суммарного потока. Переходный фронт возникает в результате последовательного введения в колонку различных подвижных фаз, имеющих одно или более различных свойств (например, проводимость, pH и т.д.). В соответствии со способом, описанным в настоящем документе, выходной сигнал колонки на переходном фронте можно нормализовать, так что максимальное значение составляет 1 и минимальное значение составляет 0. Как упомянуто в настоящем документе, "задний 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 последовательно вводимой подвижной фазы.

Используемый в настоящем документе термин "передний переходный фронт" означает переход подвижной фазы, в котором начальная подвижная фаза имеет более низкий уровень выходного сигнала колонки, например проводимости, чем уровень выходного сигнала колонки последовательно вводимой

подвижной фазы.

Переходный фронт создается путем добавления первой подвижной фазы в хроматографическую колонку, содержащую насадку колонки, для квалификации колонки в ходе ее эксплуатации. Через некоторое время после добавления первой подвижной фазы, например после начала элюирования первой подвижной фазы в хроматографическую колонку, содержащую насадку колонки, добавляют вторую подвижную фазу, имеющую обнаруживаемый выходной сигнал колонки, отличный от сигнала первой подвижной фазы. Переходный фронт обнаруживают путем регистрации выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока подвижной фазы через два или более интервала при переходах между первой и второй подвижными фазами.

В одном варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз составляет величину, превышающую фоновый шум. В другом варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз составляет величину, превышающую фоновый шум на 5%. В другом варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз составляет величину, превышающую фоновый шум по меньшей мере на 10%. В другом варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз составляет величину, превышающую фоновый шум по меньшей мере на 15%.

В одном варианте осуществления выходной сигнал колонки, обнаруживаемый на фронте перехода, представляет собой проводимость. В этом варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз предпочтительно составляет 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.

В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки, обнаруживаемый на фронте перехода, представляет собой рН. В этом варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз предпочтительно составляет 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 единиц рН.

В одном варианте осуществления выходной сигнал колонки, обнаруживаемый на фронте перехода, представляет собой поглощение УФ-излучения/видимого света. В этом варианте осуществления разница между выходными сигналами колонки первой и второй подвижных фаз предпочтительно составляет по меньшей мере на 0,01 единицы поглощения, по меньшей мере на 0,1 единицы поглощения, по меньшей мере на 0,5 единицы поглощения, по меньшей мере на 0,8 единицы поглощения или более чем на 0,8 единицы поглощения.

В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки, обнаруживаемый на фронте перехода, представляет собой поглощение инфракрасного излучения. В данном варианте осуществления разница между выходными сигналами первой и второй подвижных фаз предпочтительно составляет по меньшей мере на 1% пропускания, по меньшей мере на 10% пропускания, по меньшей мере на 20% пропускания, по меньшей мере на 30% или более чем на 30% пропускания.

В одном варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы образуется при замене подвижной фазы, содержащей денатурирующий агент, подвижной фазой, содержащей агент, который не является денатурирующим. В другом варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы образуется при замене подвижной фазы, содержащей агент, который не является денатурирующим, подвижной фазой, содержащей денатурирующий агент.

В другом варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы образуется при замене щелочной подвижной фазы на нейтральную или более кислую подвижную фазу. В альтернативном варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы образуется при замене кислой подвижной фазы на нейтральную или более щелочную подвижную фазу.

В другом варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы образуется при замене подвижной фазы, содержащей органический растворитель на водную подвижную фазу. В альтернативном варианте осуществления переходный фронт подвижной фазы образуется при замене водной подвижной фазы на подвижную фазу, содержащую органический растворитель.

Выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока регистрируют через различные интервалы в ходе переходного фронта подвижной фазы, выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока предпочтительно регистрируют по ходу всего переходного фронта подвижной фазы, от минимального выходного сигнала колонки до максимального выходного сигнала колонки, или наоборот. В одном варианте осуществления выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока регистрируют через нерегулярные интервалы, например, при обнаружении изменения выходного сигнала колонки. В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока регистрируют через регулярные интервалы в ходе всего переходного фронта подвижной фазы. Например, в одном варианте осуществления выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока регистрируют через интервал, составляющий 1 секунду, в ходе всего переходного фронта подвижной фазы. В другом варианте осуществления выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока регистрируют через интер-

валы, составляющие 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 се, в ходе перехода подвижной фазы.

В одном варианте осуществления данные о выходном сигнале колонки нормализуют, как описано выше, путем установки максимального значения, равного 1, и минимального значения, равного 0, в течение периода анализа. Поток также преобразуют в объемы колонок для стандартизации для сравнения данных между разными насадками колонок. Основываясь на этих данных, кумулятивная функция гамма-распределения (КФР) используется для построения кривой, наиболее соответствующей полученным точкам данных. Кумулятивную функцию гамма-распределения определяют по трем значениям: параметру формы k ; параметру шкалы θ (тета) и параметру смещения V_i с использованием следующей формулы I:

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

Согласно формуле I C представляет собой выходной сигнал колонки для заданного V , V представляет собой суммарный поток, деленный на объем колонки. Формулу Ia, полученную из формулы I, используют для определения величины функции гамма-распределения вдоль переднего переходного фронта:

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

где Γ представляет собой верхнюю неполную гамма-функцию;

γ представляет собой нижнюю неполную гамма-функцию.

В альтернативном варианте используют формулу Ib, полученную из формулы I, для определения величины функции гамма-распределения вдоль заднего переходного фронта:

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

На фиг. 1А представлен график, на котором показан иллюстративный нормализованный выходной сигнал колонки и данные объема колонки, собранные по переходному фронту колонки. Для построения аппроксимированной кривой на основе данных использовали формулу Ia.

Наиболее подходящие параметры кумулятивной функции гамма-распределения определяют путем манипулирования значениями k , θ и V_i для нахождения параметров, по которым строят модельную кривую с наименьшей суммой квадратов отклонений от данных. Эту кривую аппроксимируют через точки данных из всего переходного фронта для создания модели с наилучшей аппроксимацией. Параметры k , θ и V_i из этой кривой используют для расчета количества тарелок N_p в колонке или высоты тарелки, т.е. ВЭТТ, в качестве показателей эффективности колонки.

Количество тарелок N_p рассчитывают, исходя из среднего значения μ и дисперсии σ^2 модельной кривой. Среднее значение и дисперсию получают по данным кривой следующим образом:

среднее значение:

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

дисперсия:

$$\sigma^2 = k\theta^2$$

Количество тарелок рассчитывают на основе среднего значения и дисперсии следующим образом: количество тарелок:

$$N_p = \mu^2 / \sigma^2$$

ВЭТТ рассчитывают в соответствии с описанным выше, на основе длины колонки L в сантиметрах, деленной на число тарелок N_p , следующим образом.

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

На фиг. 1В показан тот же график, что и на фиг. 1А, с определенными параметрами среднего значения μ и дисперсии σ^2 .

Для оценки соответствия аппроксимированной модели данным, рассчитанным, как описано в настоящем документе, также могут быть определены среднее значение (V_m), сумма квадратов (СК) и мода. СК является прямым показателем отклонения модельной кривой от данных процесса, на основании которых она получена. Значение V_m представляет собой меру центральной точки перехода в единицах объема колонки. Это значение должно быть близким к единице, поскольку для перехода буфера обычно требуется один объем колонки. Как правило, на среднее значение не влияет форма фронта. Средние значения используют 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, где скорость изменения является наибольшей. При симметричной кривой перехода она будет равна среднему значению. Как правило, переходы асимметричны, и мода меньше среднего значения.

В дополнение к ВЭТТ другие факторы, которые могут быть рассчитаны по параметру k (форма), включают в себя асимметрию (γ_1), которая является мерой, связанной с асимметрией, и эксцесс (γ_2), ко-

торый является мерой резкости пика. Эти факторы могут быть использованы для определения изменений в производительности колонки:

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

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

В соответствии со способом, описанным в настоящем документе, выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока регистрируют для одного и того же перехода подвижной фазы при каждом запуске процесса эксплуатации колонки для вычисления ВЭТТ на основе кумулятивной функции гамма-распределения. Исторические данные, полученные при эксплуатации колонок, используемых на том же этапе процесса и с тем же масштабом, также могут быть извлечены и использованы для вычисления ВЭТТ. Данные ВЭТТ компилируют для определения трендов в значениях ВЭТТ соответствующих переходов во время исторических или текущих операций для определения верхнего и нижнего контрольных пределов значения ВЭТТ. Контрольными пределами являются высокие и низкие значения ВЭТТ, которые определяют диапазон приемлемых значений ВЭТТ, т.е. значений ВЭТТ, которые соответствуют приемлемой эффективности колонки. Эти верхний и нижний контрольные пределы можно установить на основании статистической оценки. Например, в одном варианте осуществления верхний и нижний контрольные пределы устанавливаются путем вычисления среднего значения стандартных отклонений ± 2 , 3 или 4. В другом варианте осуществления верхний и нижний контрольные пределы устанавливаются путем вычисления среднего значения стандартных отклонений ± 3 , как описано в примерах в настоящем документе. В другом варианте осуществления верхний и нижний контрольные пределы могут быть установлены с помощью расчета доверительного интервала по историческим данным. В одном варианте осуществления верхний и нижний контрольные пределы устанавливаются путем расчета 95%-ного, 96%-ного, 97%-ного или 98%-ного доверительного интервала по историческим данным. В другом варианте осуществления верхний и нижний контрольные пределы устанавливаются путем расчета 99%-ного доверительного интервала по историческим данным.

Верхний и нижний контрольные пределы используют для определения изменений эффективности колонки с течением времени при ее эксплуатации. Как правило, любое увеличение ВЭТТ, которое превышает верхний контрольный предел, может указывать на снижение эффективности колонки. Если во время регулярного мониторинга колонок наблюдают неблагоприятный тренд в ВЭТТ или превышение контрольных пределов, то для обеспечения качества продукта элюата, следует оценить данные производительности процесса с использованием колонки и/или данные очистки примесей для обеспечения качества продукта из выявленной партии. Если качество продукта или производительность не соответствуют установленным критериям, перед запуском в дальнейшую эксплуатацию необходимо предпринять соответствующее корректирующее действие, такое как кондиционирование, повторное наполнение или замена колонки, и провести квалификацию. Способы кондиционирования хроматографической колонки для перераспределения насадочного слоя будут варьироваться в зависимости от используемой колонки, но хорошо известны специалистам в данной области.

Контроль производительности колонки во время эксплуатации колонки может быть основан на одной или более чем одной фазе перехода, которые обычно включены в протокол очистки. Предпочтительно контроль основан на значениях ВЭТТ, рассчитанных на основе кумулятивной функции гамма-распределения двух, трех или более фаз перехода в ходе протокола очистки.

Как отмечалось ниже, расчет ВЭТТ с применением способа GDТА, описанного в настоящем документе, для определения производительности колонки может быть основан на исторических данных, полученных при эксплуатации колонок, используемых на том же этапе процесса и с тем же масштабом. Для оценки также можно использовать данные, полученные при работе квалифицированной модели уменьшенного масштаба на том же этапе процесса. Это позволяет оценить качество работы колонки по сравнению с данными квалификации.

На результаты, полученные способом GDТА, описанным в настоящем документе, могут влиять такие факторы, как скорость потока (эффект ван Деемтера), потенциальные взаимодействия буфера и дополнительный объем колонки, и их следует оценивать при установке контрольных пределов для GDТА. Переходные фронты, включенные в GDТА, предпочтительно удовлетворяют определенным критериям, таким как измерение обоих сигналов на выходе подвижной фазы из колонки в одном масштабе, разница измерения сигналов на выходе колонки между подвижными фазами, превышающая фоновый шум, и взаимодействие между подвижной фазой и смолу является постоянным и воспроизводимым.

Общие критерии оценки колонок, используемые для извлечения и мониторинга во время использования, должны быть определены путем оценки исторических данных, специфичных для оборудования и типа смолы. Примеры регулярных измерений качества продукта и производительности процесса, которые могут быть использованы для оценки взаимосвязи между результатами квалификации колонки и ее производительностью, приведены в табл. 1. Регулярные измерения качества и производительности процесса, используемые для оценки, не ограничиваются перечисленными в табл. 1, но список предназначен

для руководящих рекомендаций и должен быть основан на конкретных требованиях оцениваемого проекта и этапа процесса. Критерии приемлемости, касающиеся качества продукта и характеристик процесса, являются специфичными для проекта и определяются на основе требований процесса.

Таблица 1

Регулярные измерения качества и производительности этапа

Параметр	Аналитический способ
Объем предварительного элюирования (CV)	
Объем элюирования (CV)	
Выход стадии	
Хроматографический профиль	Визуальный осмотр
Концентрация элюата	A280
Мономер элюата	DW-SE-HPLC
Обработка примесей	Различные анализы

Способ анализа перехода гамма-распределения, описанный в настоящем документе, можно применять в режиме реального времени во время эксплуатации колонки. Этот способ включает регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока с помощью вычислительного устройства для квалификации колонки через два или более интервала по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции хроматографической колонки, содержащей насадку колонки; определение с помощью вычислительного устройства для квалификации колонки модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе зарегистрированного выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для переднего переходного фронта или формулы Ib для заднего переходного фронта:

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

или

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

Что касается формул Ia и Ib, C представляет собой выходной сигнал колонки для заданного V, V представляет собой суммарный поток, деленный на объем колонки, а k, θ и V_i представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для образования кривой. Этот способ дополнительно включает расчет с помощью вычислительного устройства для квалификации хроматографической колонки значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров кумулятивной кривой гамма-распределения k, θ , and V_i :

$$\text{ВЭТТ} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \text{ Формула II}$$

$$\text{где } \mu = k\theta + V_i;$$

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

L = длина колонки.

Способ дополнительно включает оценку качества насадки хроматографической колонки на основе указанного рассчитанного значения ВЭТТ с использованием вычислительного устройства для квалификации хроматографической колонки. На основании этой оценки оператор хроматографической колонки может определить, можно ли повторно использовать хроматографическую колонку или ее необходимо заменить, повторно наполнить или кондиционировать перед следующей эксплуатацией колонки.

На фиг. 2 представлена схема, на которой представлен обзор способа и системы эксплуатации хроматографической колонки и оценки эффективности колонки в реальном времени, как описано в настоящем документе. Как показано на фиг. 2 и описано выше, система 10 включает 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, интерфейс 22 связи, по которому передаются сигнал/данные от детектора 20, вычислительное устройство 24 для квалификации колонки и сервер 26.

Хроматографическую колонку 12 заполняют проницаемым, полупроницаемым или непроницаемым твердофазным материалом насадки колонки. Подходящие хроматографические колонки и материалы насадки колонки описаны выше. Элюент 14, содержащий представляющие интерес биомолекулы, вводят в хроматографическую колонку 12. Подвижную фазу 16 также вводят в хроматографическую колонку 12. Подвижная фаза 16 способствует разделению биомолекул при прохождении через неподвижную фазу хроматографической колонки 12 и элюирование биомолекул в элюате через выход 18 хроматографиче-

ской колонки. В соответствии со способом, описанным в настоящем документе, подвижная фаза 16 содержит последовательно введенные буферы колонки и/или промывочные реагенты, которые отличаются друг от друга одним или более физическими или химическими свойствами, как описано ниже, например, pH, проводимость, концентрация солей. Эти различия в одном или более физических или химических свойствах обнаруживают с помощью детектора 20 в элюате.

Детектор 20 соединен с выходом 18 хроматографической колонки 12. Соответственно, с помощью детектора 20 мониторируют и регистрируют выходной сигнал колонки через элюат хроматографической колонки 12. Подходящие детекторы и свойства элюата, т.е. обнаруженного выходного сигнала колонки, описаны выше. Детектор соединен с блоком 22 интерфейса связи, по которому происходит передача данных, собранных с помощью детектора 20 (например, выходной сигнал и параметры суммарного потока), на вычислительное устройство 24 для квалификации колонки для обработки данных и/или сервер 26 для хранения.

Вычислительное устройство 24 для квалификации колонки описываемой в настоящем документе системы может представлять собой любое вычислительное устройство, например компьютер, персональное вычислительное устройство, смартфон, т.е. устройство, содержащее центральный процессор (ЦП) или процессор 32, запоминающее устройство 30, сетевой интерфейс 28 и интерфейс 34 пользователя, которые соединены друг с другом шиной 36 или другим каналом связи. Вычислительное устройство 24 для квалификации колонки может включать другие типы и/или другое количество компонентов и элементов в других конфигурациях.

Процессор 32 в вычислительном устройстве 24 для квалификации колонки выполняет программу сохраненных команд для одного или более аспектов анализа перехода гамма-распределения, описанных и проиллюстрированных 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 квалификации колонки. В другом варианте осуществления процессор распределен между детектором 20 и вычислительным устройством 24 для квалификации колонки. Например, в одном варианте осуществления процессор 32 компьютерного устройства 24 для квалификации колонки содержит микроконтроллер, соединенный с детектором. В данном 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 квалификации в колонке. Микроконтроллер, соединенный с одним или более детекторами, способен выполнять одну или более функций обработки вычислительного устройства 24 для квалификации колонки.

В запоминающем устройстве 30 вычислительного устройства 24 для квалификации колонки хранятся эти запрограммированные команды для одного или более аспектов GDTA, как описано в настоящем документе. Множество различных типов запоминающих устройств, таких как оперативное запоминающее устройство (ОЗУ) и/или постоянное запоминающее устройство (ПЗУ) в процессоре синхронизации или гибкий диск, жесткий диск, CD ROM, DVD ROM, или можно использовать в качестве запоминающего устройства 30 другой машиночитаемый носитель, считываемый магнитной, оптической или другой системой считывания и записи, соединенный с процессором 32 в вычислительном устройстве 24 для квалификации в колонке.

Сетевой интерфейс 28 вычислительного устройства 24 для квалификации колонки функционально соединяет и способствует обмену данными между вычислительным устройством 24 для квалификации колонки и детектором 20, хотя могут быть использованы и другие типы и/или другое количество сетей или систем связи с другими типами и/или другим количеством соединений и конфигураций.

Вычислительное устройство 24 для квалификации колонки может дополнительно содержать пользовательский интерфейс 34, такой как, например, графический пользовательский интерфейс, сенсорный пользовательский интерфейс или пользовательский интерфейс на основе веб-технологии. Пользовательский интерфейс выполнен с возможностью отображения пользователю информации о параметрах качества хроматографической колонки. Пользовательский интерфейс также выполнен с возможностью получения входных данных от пользователя относительно параметров хроматографической колонки.

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 вместе посредством шины или другой линии связи, аналогичной описанной для вычислительного устройства 24 квалификации колонки. Сервер 26 может включать другие типы и/или другое количество компонентов и элементов в других конфигурациях.

Интерфейс(ы) 22 связи описанной в настоящем документе системы может(могут) включать одну или более локальных сетей (LAN) и/или глобальных сетей (WAN). Только в качестве примера интерфейс(ы) 22 связи может(могут) использовать TCP/IP по протоколу Ethernet и промышленным стандартам, включая гипертекстовый протокол передачи данных (HTTP) и/или безопасный HTTP (HTTPS), хотя можно использовать и другие типы и/или другое количество сетей связи.

Другой аспект настоящего описания относится к машиночитаемому носителю с постоянной памя-

тью, имеющему хранящиеся в нем команды для квалификации хроматографических колонок с использованием анализа перехода гамма-распределения. Эти команды содержат исполняемый код, который при исполнении процессором приводит к выполнению процессором этапов, включающих регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервалов по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции хроматографической колонки, содержащей насадку колонки; определение модели кумулятивной кривой гамма-распределения на основе зарегистрированного выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia, как описано выше, для переднего переходного фронта или формулы Ib, как описано выше, для заднего фронта; расчет значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II, как описано выше, и параметров кумулятивной кривой гамма-распределения k , θ и V_i , как описано в настоящем документе; и оценку качества насадки хроматографической колонки на основе указанного рассчитанного значения ВЭТТ.

Другой аспект настоящего описания относится к устройству квалификации хроматографической колонки. Это устройство содержит процессор и запоминающее устройство, соединенное с процессором. Запоминающее устройство выполнено с возможностью выполнения программных команд, хранящихся в запоминающем устройстве. Эти инструкции включают регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции хроматографической колонки, содержащей насадку колонки; определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основе зарегистрированного выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для переднего переходного фронта или формулы Ib для заднего переходного фронта, как описано выше; рассчитывают значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II, как описано выше, и параметры модельной кривой гамма-распределения k , θ и V_i , как описано в настоящем документе, и оценивают качество насадки хроматографической колонки на основе указанного рассчитанного значения ВЭТТ.

Примеры

Пример 1. Применение анализа перехода гамма-распределения для квалификации колонки для колонок для хроматографии на белке А, используемых при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб).

Общее описание.

Процесс изготовления терапевтического антитела REMICADE® (инфликсимаб) включает несколько этапов, четыре из которых включают хроматографическую очистку. Анализ перехода гамма-распределения (GDТА) для квалификации колонки применяли к двум или трем переходам на каждом из этих этапов изготовления с использованием колонки. В этом примере описано применение способа GDТА на этапе очистки на колонке на белке А, используемого при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб). Процесс очистки включает два переходных фронта, т.е. уравнивание и промежуточную промывку, которые подходят для применения GDТА, как описано в настоящем документе.

GDТА выполняли на 129 фронтах после последовательной очистки 69 партий препарата REMICADE® (инфликсимаб), содержащих 60 фронтов уравнивания и 69 фронтов промывки. Анализ гамма-распределения фронта проводили одновременно с изготовлением, и его проведение не влияло на процесс изготовления. Все процессы изготовления, мониторинга и контроля выполняли с использованием современных эффективных процедур. При очистке колоночной хроматографией препарата REMICADE® (инфликсимаб) регистрировали проводимость (т.е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т.е. суммарный поток).

В дополнение к проведению GDТА при эксплуатации колонки в режиме реального времени, также регистрировали и анализировали исторические данные для 285 партий, обработанных в течение четырех предыдущих лет, как описано в настоящем документе. Набор данных включал 253 фронта уравнивания и 285 фронтов промывки, всего 538 исторических фронтов. Фронты уравнивания не получали для 32 партий, которые проходили санацию перед использованием. Этот набор данных выбирали так, чтобы обеспечить равномерное распределение по всему сроку эксплуатации колонок, и он представляет собой 11 систем колонок.

Протокол GDТА.

Для каждого переходного фронта во время очистки на колонке на белке А, т.е. промывки и уравнивания, регистрировали проводимость и суммарный поток. Определение начальной точки проводили путем оценки трендов для предколоночной проводимости и давления, чтобы определить точку, в которой колонка включена в производственную линию. Создана электронная таблица и настроена для получения данных о потоке и проводимости с сервера с использованием расчетного интервала 10 с в качестве продолжительности фронта.

Данные по проводимости нормализовали путем установки максимального значения на 1 и минимального значения на 0 и пропорционального масштабирования других точек. Кроме того, данные потока преобразовывали в данные объема колонки.

Рассчитывали начальную кумулятивную функцию гамма-распределения, используя те же начальные параметры k - θ и V_i , что и для модуля PI. V_i вычитали из каждого значения объема в члене x функции гамма-распределения. Чтобы нормализовать проводимость, которая возрастала в процессе очистки, устанавливали значения проводимости на 0 для объемов меньше V_i , а максимум устанавливали на 1.

Для каждой точки объема вычисляли разницу (погрешность) между каждым значением проводимости и аппроксимированной моделью. Кроме того, вычисляли сумму квадратов отклонений в диапазоне от 0,5 до 1,8 CV. Рассчитывали параметры наилучшей аппроксимации кумулятивной функции гамма-распределения с использованием решателя Excel Solver для нахождения параметров k , θ и V_i , по которым строили модельную кривую с минимальным значением для суммы квадратов, используя

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

Вычисления на решателе проводили с 10,000 итерациями с использованием нелинейного способа GRG с ограничениями $k \geq 0,0001$ и $V_i \geq 0$ для обеспечения наилучшей аппроксимации.

Из конечных значений k , θ , и V_i рассчитывали следующие параметры:

Среднее значение

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

Дисперсия

$$\begin{aligned} \sigma^2 \text{ (квадрат сигма)} &= k\theta^2 \\ \text{Мода} &= (k-1)\theta + V_i \\ \text{ВЭТТ} &= \frac{L}{N_p} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L = \frac{k\theta^2 L}{(k\theta + V_i)} \end{aligned}$$

Рассчитывали среднюю скорость потока и предколонное давление за период от 0,5 до 1,8 CV для каждого фронта.

Анализ и оценка критериев приемлемости.

Нормальность.

Результаты ВЭТТ и СК как для фронта уравнивания, так и для фронта промывки оценивали на нормальность путем построения графика плотности вероятности. На графиках плотности вероятности (фиг. 3-12) точки данных (результаты ВЭТТ или СК) представляют собой фактическое кумулятивное распределение, наблюдаемое в пробе. Линии представляют аппроксимированное кумулятивное распределение, а также верхний и нижний доверительные интервалы на основе нормального распределения с использованием параметров, оцененных по пробе. Шкалу процентилей преобразуют так, что аппроксимированное распределение образует прямую линию. Каждый из наборов данных ВЭТТ и СК ограничен 0 на нижнем конце, однако модель нормального распределения указывает на отрицательные значения. Полученные графики плотности вероятности имеют криволинейную форму, см. фиг. 3-6. Таким образом, лучшую аппроксимацию результатов получают при использовании логарифмического преобразования, см. фиг. 7-10 для графика плотности вероятности логарифмически преобразованных данных.

Данные для среднего значения (V_m) также были оценены на нормальность. На фиг. 11 и 12 показано, что данные соответствуют нормальному распределению и имеют всего несколько выбросов. Таким образом, никакого преобразования не требуется. Этот параметр не указан в протоколе, но обеспечивает полезное подтверждение достоверности аппроксимированной кривой. По результатам этого анализа также будут получены контрольные пределы для этого параметра.

Идентификация выбросов и причин вариаций.

Для идентификации выбросов и оценки изменчивости результатов, строили контрольные диаграммы для каждого параметра, см. фиг. 13-22. В контрольных диаграммах использовали преобразованные данные ВЭТТ и СК, где применяли преобразование на основе натурального логарифма. Данные также нанесены на график в виде временного ряда с преобразованным верхним контрольным пределом для каждого из этих параметров.

ВЭТТ: В результатах ВЭТТ наблюдают ряд выбросов и трендов как для фронта уравнивания, так и для фронта промывки. Кроме того, на фиг. 13 и 18 показаны тренды в данных на основании правил контрольных карт Шухарта 1, 2 и 3, представленных квадратами на фигурах и пронумерованных в соответствии со следующим.

Испытание	Правило
1	1 точка выходит за контрольные пределы.
2	8 точек на одной стороне от центральной линии.
3	6 последовательных точек с постоянным возрастанием или снижением.

Партии, в которых наблюдали этими отклонениями, не исключали из анализа, поскольку они характерны для приемлемого процесса.

На обеих контрольных диаграммах (фиг. 13 и 18) показано множество нарушений правила 1 контрольных карт Шухарта, что также выходит за контрольные пределы. В каждом случае проблемы идентифицировали и корректировали путем повторного кондиционирования колонок.

Как и ожидалось, ряд прогонов соответствовал критериям правил 2 и 3 из-за различий в системах колонок. Для дальнейшей оценки трендов были подготовлены графики временных рядов данных, сгруппированных в зависимости от системы колонки (фиг. 23, 24) и установки (фиг. 25, 26). Эти диаграммы показывают, что большая часть специальных причин изменчивости относится к деградации колонки и некоторым отдельным отклонениям. Тренды увеличения ВЭТТ очевидны для каждой колонки с течением времени для фронта уравнивания (фиг. 23). Отклонения, наблюдаемые для фронта промывки, по-видимому, происходят в разных установках в разное время (фиг. 26), на основании чего можно предположить, что источник изменчивости производительности колонки находится в установке.

Сумма квадратов (СК): Сумма квадратов представляет собой показатель того, насколько близко данные гамма-распределения соответствуют данным процесса. Этот показатель позволяет убедиться в достоверности результата ВЭТТ. Контрольные диаграммы для преобразованных данных показаны на фиг. 15 и 20 для уравнивания и промывки соответственно. Этот показатель имеет только верхний контрольный предел. На фиг. 15 показаны шесть точек, выходящих за верхний контрольный предел. Четыре из них связаны с более высоким показателем ВЭТТ. При использовании серия 880572M наблюдали прерывание потока во время фронта, что вызывало высокий показатель СК, но не повлияло на ВЭТТ.

Оценка потока и давления.

Для определения любых выбросов оценивали среднюю скорость потока и предколоночное давление для набора данных. Устанавливали взаимосвязь между выявленными различиями и оценивали результаты.

Тренды скорости потока и предколоночного давления представлены на фиг. 27-30. Диаграммы показывают превосходный контроль скорости потока на каждом из этапов. Во время данной оценки изменяли скорость потока промывочного раствора. Отмечены вариации предколоночного давления, относящиеся к установке и колонкам, но по существу оно стабильно в пределах диапазона. На фиг. 31 показано, что изменение скорости потока промывочного раствора не оказывает значимого влияния на значение ВЭТТ.

Контрольные пределы для колонки на белке А.

ВЭТТ: Показатель ВЭТТ непосредственно связан с характеристиками колонки, а также зависит от других факторов в системе, которые могут увеличивать размывание. Результат должен составлять >0 . Контрольные пределы для ВЭТТ наилучшим образом определяют с использованием преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма ($\lambda=0$), как показано на фиг. 13 для фронта уравнивания и на фиг. 18 для фронта промывки. На контрольных диаграммах показаны контрольные пределы для преобразованных данных, рассчитанных по Minitab с применением средних стандартных отклонений ± 3 (см. также табл. 2). Стандартное отклонение определяют на основе среднего скользящего размаха. Для учета вариаций производительности колонки в течение срока эксплуатации колонки выбран скользящий размах, составляющий 100. Проводят обратное преобразование (e^x) верхнего и нижнего контрольных пределов для определения контрольных пределов для непреобразованных данных.

График временных рядов для результатов ВЭТТ и контрольных пределов для каждого фронта показан на фиг. 14 и 19. Ожидается, что эксплуатация в этих пределах приведет к получению приемлемых хроматографических характеристик на основе обзора исторических данных. Значения, выходящие за верхние контрольные пределы, могут указывать на проблемы с потоком колонки и должны пройти дополнительную оценку. Значения, выходящие за нижние контрольные пределы, могут указывать на ошибку в расчетах.

Сумма квадратов (СК).

Сумма квадратов представляет собой показатель того, насколько близко модель гамма-распределения соответствует данным. Этот показатель применяют для обеспечения того, что значения ВЭТТ, рассчитанные с помощью метода GDТА, соответствуют данным процесса. Нижний предел отсутствует, и результат должен составлять >0 . Контрольный предел для СК наилучшим образом определяют с использованием преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма ($\lambda=0$), как показано на фиг. 15 для фронта уравнивания и на фиг. 20 для фронта промывки. На контрольных диаграммах показаны контрольные пределы для преобразованных данных, рассчитанных по Minitab с применением средних стандартных отклонений ± 3 . Стандартное отклонение определяют на основе среднего скользящего размаха. Для учета вариаций производительности колонки в течение срока эксплуатации колонки выбран скользящий размах, составляющий 100. Контрольные диаграммы показывают верхние контрольные пределы для преобразованных данных, которые подвергли обратному преобразованию для получения значений 0,050 и 0,989 для фронта уравнивания и фронта промывки соответственно (см. табл. 2). График временных рядов для результатов СК и контрольных пределов для каждого фронта

показан на фиг. 16 и 20. Результаты, не выходящие за пределы, обеспечивают соответствие модели данным, а также историческим результатам. Если результат выходит за пределы этого диапазона, существует вероятность специальной причины.

Среднее значение.

Среднее значение добавляли в качестве второго показателя точности модели гамма-распределения. Среднее значение представляет собой теоретический центр массы фронта и всегда должно составлять около 1 объема колонки, если в системе не присутствуют другие факторы, вызывающие ее сдвиг, такие как большой дополнительный объем колонки или взаимодействие между подвижной фазой и смолой. Средние значения как для фронта уравнивания, так и для фронта промывки примерно равномерно распределены и не нуждаются в преобразовании, см. фиг. 11 и 12. Среднее значение фронта уравнивания плотно распределено на уровне приблизительно 1,07 CV, при этом некоторые выбросы отмечены с обеих сторон, и с верхней стороны они приближаются к 1,2, см. фиг. 17. Фронт промывки демонстрирует несколько большие вариации с центром на 0,99 CV, при этом несколько нижних выбросов приближаются к 0,8 (см. фиг. 22). Рекомендуют применять контрольные пределы от 0,80 до 1,20 CV для среднего значения для обоих фронтов (см. табл. 2). Это приемлемо, поскольку среднее значение не является показателем производительности колонки, но его используют для проверки правильности анализа. Более жесткие контрольные пределы могут привести к ненужной чувствительности для этой проверки.

Таблица 2

Рекомендуемые значения ВЭТТ, СК и средних контрольных пределов для очистки на колонке на белке А во ходе изготовления препарата REMICADE® (инфликсимаб)

Фронт	Параметр	Верхний контрольный	Нижний контрольный
		предел	предел
Равновесное состояние	ВЭТТ	0,243	0,027
	СК	0,050	Н/п
	Среднее	1,20	0,80
Промывка	ВЭТТ	0,352	0,011
	СК	0,989	Н/п
	Среднее	1,20	0,80

Пример 2. Применение анализа перехода гамма-распределения для обнаружения субоптимальной производительности колонок для хроматографии на белке А, используемых при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб).

Процесс изготовления терапевтического антитела REMICADE® (инфликсимаб) включает несколько этапов, четыре из которых включают хроматографическую очистку. Анализ перехода гамма-распределения (GDТА) для квалификации колонки применяли к двум или трем переходам на каждом из этих этапов изготовления с использованием колонки. В этом примере описано применение способа GDТА на этапе очистки на колонке на белке А, применяемого при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб). Процесс очистки включает два переходных фронта, т.е. уравнивание и промежуточную промывку, которые подходят для применения GDТА, как описано в настоящем документе.

GDТА выполняли на 45 фронтах уравнивания, полученных при последовательной очистке 45 партий препарата REMICADE® (инфликсимаб), содержащих 23 партии, обработанные на системе колонок 883333M001, и 22 партии, обработанные на системе колонок 885473M001. Анализ гамма-распределения фронта проводили одновременно с изготовлением, и его проведение не влияло на процесс изготовления. Все процессы изготовления, мониторинга и контроля выполняли с использованием современных эффективных процедур. При очистке колоночной хроматографией препарата REMICADE® (инфликсимаб) регистрировали проводимость (т.е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т.е. суммарный поток).

Тренд результатов ВЭТТ при уравнивании для 45 партий (см. фиг. 32) показал значимую разницу между системами колонок. Существующие средства контроля при оценке колонки не выявили никаких различий между двумя системами колонок. Оценка выхода партии показала значимое ($p=0,001$) различие между партиями, обработанными в двух системах колонок, оцениваемое как на 4,3% ниже для систем колонок с более высокими значениями ВЭТТ. Провели оценку других потенциальных факторов, и они не показали корреляции с разницей в выходе. Таким образом, вывод из этого анализа заключается в том, что разница в производительности колонки привела к снижению выхода продукта. Основываясь на этих данных, перед продолжением эксплуатации колонку с меньшим выходом кондиционировали для улучшения насадки колонки. Этот пример демонстрирует чувствительность метода GDТА при оценке качества хроматографической колонки.

Пример 3. Применение анализа перехода гамма-распределения для квалификации колонки для хроматографических колонок с SP-Sepharose High Performance, используемых при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб).

Общее описание.

Как обсуждалось выше, процесс изготовления препарата REMICADE® (инфликсимаб) включает несколько этапов, четыре из которых включают хроматографическую очистку. В этом примере описано применение способа GDТА на этапе очистки на колонке с SP-Sepharose High Performance (SPHP), применяемого при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб). Колонка SPHP представляет собой колонку для катионообменной хроматографии. Процесс очистки включает три переходных фронта, т.е. фронта уравнивания, фронта промывки водой для инъекций и фронта консервации, которые подходят для применения GDТА, как описано в настоящем документе.

GDТА выполняли на 69 фронтах после очистки 23 партий препарата REMICADE® (инфликсимаб), содержащих 23 фронта уравнивания, промывки водой для инъекций и консервации. Анализ гамма-распределения фронта проводили одновременно с изготовлением, и его проведение не влияло на процесс изготовления. Все процессы изготовления, мониторинга и контроля выполняли с использованием современных эффективных процедур. При очистке колоночной хроматографией препарата REMICADE® (инфликсимаб) регистрировали проводимость (т.е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т.е. суммарный поток).

В дополнение к проведению GDТА при эксплуатации колонки в режиме реального времени, также регистрировали и анализировали исторические данные для 189 переходных фронтов, обработанных в течение четырех предыдущих лет, как описано в настоящем документе. Набор данных включал 64 фронта уравнивания, 63 фронта промывки водой для инъекций и 62 фронта консервации. Этот набор данных выбирали так, чтобы обеспечить равномерное распределение по всему сроку эксплуатации колонок, и он представляет собой 6 насадок колонки.

GDТА для фронтов колонки SPHP проводили в соответствии с описанием в примере 1 выше. В ходе этого анализа получены измерения ВЭТТ, СК и среднего значения для каждого фронта. Контрольные пределы, выведенные для каждого из этих трех параметров на основании статистической оценки, перечислены в табл. 3.

Контрольные пределы для колонки SPHP.

ВЭТТ: Показатель ВЭТТ непосредственно связан с характеристиками колонки, а также зависит от других факторов в системе, которые могут увеличивать размывание. Результат должен составлять >0 . Контрольные пределы для ВЭТТ наилучшим образом определяют с использованием преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма ($\lambda=0$). Контрольные пределы для преобразованных данных рассчитывали по Minitab с применением средних стандартных отклонений ± 3 . Стандартное отклонение определяют на основе среднего скользящего размаха. Для учета вариаций производительности колонки в течение срока эксплуатации колонки выбран скользящий размах, составляющий 25. Проводят обратное преобразование (e^x) верхнего и нижнего контрольных пределов для определения контрольных пределов для непреобразованных данных. График временных рядов для результатов ВЭТТ и контрольных пределов для каждого фронта показан на фиг. 33 (фронт уравнивания), фиг. 34 (фронт промывки водой для инъекций) и фиг. 35 (фронт консервации). Ожидается, что эксплуатация в этих пределах приведет к получению приемлемых хроматографических характеристик на основе обзора исторических данных. Значения, выходящие за верхние контрольные пределы, могут указывать на проблемы с потоком колонки и должны пройти дополнительную оценку. Значения, выходящие за нижние контрольные пределы, могут указывать на ошибку в расчетах.

Сумма квадратов (СК).

Сумма квадратов представляет собой показатель того, насколько близко модель гамма-распределения соответствует данным. Этот показатель применяют для обеспечения того, что значения ВЭТТ, рассчитанные с помощью способа GDТА, соответствуют данным процесса. Нижний предел отсутствует, и результат должен составлять >0 . Верхний контрольный предел для СК наилучшим образом определяют с использованием преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма ($\lambda=0$). Контрольные пределы для преобразованных данных рассчитывали по Minitab с применением средних стандартных отклонений ± 3 . Стандартное отклонение определяют на основе среднего скользящего размаха. Для учета вариаций производительности колонки в течение срока эксплуатации колонки выбран скользящий размах, составляющий 100. Проводили обратное преобразование верхних контрольных пределов для преобразованных данных так, чтобы получить 0,110 для фронта уравнивания, 0,027 для фронта промывки водой для инъекций и 0,073 для фронта консервации (см. табл. 3). Результаты, не выходящие за пределы, обеспечивают соответствие модели данным, а также историческим результатам. Если результат выходит за пределы этого диапазона, существует вероятность специальной причины.

Среднее значение.

Среднее значение добавляли в качестве второго показателя точности модели гамма-распределения.

Среднее значение представляет собой теоретический центр массы фронта и всегда должно составлять около 1 объема колонки, если в системе не присутствуют другие факторы, вызывающие ее сдвиг, такие как большой дополнительный объем колонки или взаимодействие между подвижной фазой и смолой. Средние значения для фронтов уравнивания, промывки водой для инъекций и консервации имеют неправильное распределение и не получают преимуществ от преобразования. Рекомендуют применять контрольные пределы от 0,80 до 1,20 CV для среднего значения для каждого из фронтов (см. табл. 3). Это приемлемо, поскольку среднее значение не является показателем производительности колонки, но его используют для проверки правильности анализа. Ожидают, что эти пределы будут достаточными для выявления значимых отклонений от ожидаемых результатов расчета. Более жесткие контрольные пределы приводят к ненужной чувствительности для этой проверки, которая, как видно, варьируется в зависимости от системы колонки.

Таблица 3
Рекомендуемые ВЭТТ, СК и средние контрольные пределы
для очистки на колонке с SPHP в ходе изготовления
препарата REMICADE® (инфликсимаб)

Фронт	Параметр	Верхний контрольный предел	Нижний контрольный предел
Равновесное состояние	ВЭТТ	0,081	0,018
	СК	0,110	Н/п
	Среднее	1,20	0,80
Промывка водой для инъекций	ВЭТТ	0,066	0,015
	СК	0,027	Н/п
	Среднее	1,20	0,80
Промывка	ВЭТТ	0,056	0,020
	СК	0,073	Н/п
	Среднее	1,20	0,80

Пример 4. Применение анализа перехода гамма-распределения для квалификации колонки для хроматографических колонок Q2, используемых при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб).
Общее описание.

В этом примере описано применение способа GDТА на этапе вторичной очистки на анионообменной колонке (Q2), применяемого при изготовлении препарата REMICADE® (инфликсимаб). Колонка Q2 представляет собой колонку для анионообменной хроматографии. Процесс очистки включает три переходных фронта, т.е. фронт уравнивания, фронт снятия белка с колонки и фронт консервации, которые подходят для применения GDТА, как описано в настоящем документе.

GDТА выполняли на 68 фронтах, содержащих 23 фронта уравнивания и снятия белка с колонки и 22 фронта консервации. Анализ гамма-распределения фронта проводили одновременно с изготовлением, и его проведение не влияло на процесс изготовления. Все процессы изготовления, мониторинга и контроля выполняли с использованием современных эффективных процедур. При очистке колоночной хроматографией препарата REMICADE® (инфликсимаб) регистрировали проводимость (т.е. выходной сигнал колонки) и поток элюента (т.е. суммарный потока).

В дополнение к проведению GDТА при эксплуатации колонки в режиме реального времени, также регистрировали и анализировали исторические данные для 324 переходных фронтов, обработанных в течение четырех предыдущих лет, как описано в настоящем документе. Набор данных включал 121 фронт уравнивания, 124 фронта снятия белка с колонки и 79 фронтов консервации. Этот набор данных выбирали так, чтобы обеспечить равномерное распределение по всему сроку эксплуатации колонок, и он представляет собой 10 систем колонок.

GDТА для фронтов колонки Q2 проводили в соответствии с описанием в примере 1 выше. В ходе этого анализа получены измерения ВЭТТ, СК и среднего значения для каждого фронта. Контрольные пределы, выведенные для каждого из этих трех параметров на основании статистической оценки, перечислены в табл. 4.

Контрольные пределы для колонки Q2.

ВЭТТ: Показатель ВЭТТ непосредственно связан с характеристиками колонки, а также зависит от других факторов в системе, которые могут увеличивать размывание. Результат должен составлять >0. Контрольные предел для ВЭТТ наилучшим образом определяют с использованием преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма ($\lambda=0$). Контрольные пределы для преобразованных данных рассчитывали по Minitab с применением средних стандартных отклонений ± 3 . Стандартное отклонение определяют на основе среднего скользящего размаха. Для учета вариаций производительности

колонки в течение срока эксплуатации колонки выбран скользящий размах, составляющий 100. Проводят обратное преобразование (e^x) верхнего и нижнего контрольных пределов для определения контрольных пределов для преобразованных данных.

График временных рядов для результатов ВЭТТ и контрольных пределов для каждого фронта показан на фиг. 36 (фронт уравнивания), фиг. 37 (фронт снятия белка с колонки) и фиг. 38 (фронт консервации). Ожидается, что эксплуатация в этих пределах приведет к получению приемлемых хроматографических характеристик на основе обзора исторических данных. Значения, выходящие за верхние контрольные пределы, могут указывать на проблемы с потоком колонки и должны пройти дополнительную оценку. Значения, выходящие за нижние контрольные пределы, могут указывать на ошибку в расчетах.

Сумма квадратов (СК).

Сумма квадратов представляет собой показатель того, насколько близко модель гамма-распределения соответствует данным. Этот показатель применяют для обеспечения того, что значения ВЭТТ, рассчитанные с помощью способа GDТА, соответствуют данным процесса. Нижний предел отсутствует, и результат должен составлять >0 . Верхний контрольный предел для СК наилучшим образом определяют с использованием преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма ($\lambda=0$). Контрольные пределы для преобразованных данных рассчитывали по Minitab с применением средних стандартных отклонений ± 3 . Стандартное отклонение определяют на основе среднего скользящего размаха. Для учета вариаций производительности колонки в течение срока эксплуатации колонки выбран скользящий размах, составляющий 100. Стандартное отклонение определяли по совокупным данным для фронта сохранения, поскольку при применении способов скользящего размаха получали большее стандартное отклонение. Контрольные пределы представлены в табл. 4. Результаты, не выходящие за пределы, обеспечивают соответствие модели данным, а также историческим результатам. Если результат выходит за пределы этого диапазона, существует вероятность специальной причины.

Среднее значение.

Среднее значение добавляли в качестве второго показателя точности модели гамма-распределения. Среднее значение представляет собой теоретический центр массы фронта и всегда должно составлять около 1 объема колонки, если в системе не присутствуют другие факторы, вызывающие ее сдвиг, такие как большой дополнительный объем колонки или взаимодействие между подвижной фазой и смолой. Средние значения для фронтов уравнивания, снятия белка с колонки и хранения имеют неправильное распределение и не получают преимуществ от преобразования. Рекомендуют применять контрольные пределы от 0,80 до 1,20 CV для среднего значения для каждого из фронтов (см. табл. 4). Это приемлемо, поскольку среднее значение не является показателем производительности колонки, но его используют для проверки правильности анализа. Ожидают, что эти пределы будут достаточными для выявления значимых отклонений от ожидаемых результатов расчета. Более жесткие контрольные пределы приводят к ненужной чувствительности для этой проверки, которая, как видно, варьируется в зависимости от системы колонки.

Таблица 4
Рекомендуемые ВЭТТ, СК и средние контрольные пределы
для очистки на колонке с Q2 в ходе изготовления
препарата REMICADE® (инфликсимаб)

Фронт	Параметр	Верхний контрольный предел	Нижний контрольный предел
Равновесное состояние	ВЭТТ	0,125	0,003
	СК	0,344	Н/п
	Среднее	1,20	0,80
Промывка водой для инъекций	ВЭТТ	0,184	0,019
	СК	0,156	Н/п
	Среднее	1,20	0,80
Промывка	ВЭТТ	0,265	0,024
	СК	0,691	Н/п
	Среднее	1,20	0,80

Пример 5. Промышленные способы изготовления препарата SIMPONI® (голимумаб).
Справочные сведения о препарате голимумаб.

Терапия ингибиторами TNF- α успешно применялась при лечении воспалительных артритов, но ранние ингибиторы TNF- α имели ограничения, связанные с безопасностью, режимом дозирования, стоимостью и/или иммуногенностью. Для устранения некоторых ограничений разработано полностью чело-

вещеское моноклональное антитело к TNF- α , получившее название SIMPONI® (голимумаб). Голимумаб (также известный как CNTO 148 и rTNV148B) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело с изотипом тяжелой цепи иммуноглобулина G 1 (IgG1) (аллотип G1m[z]) и изотипом легкой цепи каппа. Голимумаб имеет тяжелую цепь (ТЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (ЛЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Молекулярная масса голимумаба составляет от 149,802 до 151,064 Да.

Голимумаб образует высокоаффинные, стабильные комплексы как с растворимыми, так и с трансмембранными биоактивными формами фактора некроза опухоли человека альфа (TNF- α) с высокой аффинностью и специфичностью, что предотвращает связывание TNF- α с его рецепторами и нейтрализует биологическую активность TNF- α . Связывания с другими лигандами суперсемейства TNF- α не наблюдали; в частности голимумаб не связывает или не нейтрализует человеческий лимфотоксин. TNF- α синтезируется главным образом активированными моноцитами, макрофагами и Т-клетками в виде трансмембранного белка, который самоассоциируется с образованием биоактивного гомотримера, быстро высвобождающегося с поверхности клетки путем протеолиза. Связывание TNF- α с TNF-рецепторами p55 или p75 приводит к кластеризации цитоплазматических доменов рецептора и инициирует сигнализацию. Фактор некроза опухоли α был идентифицирован как ключевой сигнальный цитокин, который продуцируется в ответ на различные стимулы и вследствие этого стимулирует воспалительный ответ посредством активации пути каспаза-зависимого апоптоза и ядерного фактора транскрипции (NF)- κ B и активирующего белка-1 (AP-1). Фактор некроза опухоли α также модулирует иммунный ответ за счет его роли в организации иммунных клеток внутри зародышевых центров. Повышенная экспрессия TNF- α была связана с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит (РА), а также с спондилоартропатиями, такими как псориатический артрит (ПА) и анкилозирующий спондилит (АС), и является важным медиатором воспаления и структурного повреждения суставов, характерного для этих заболеваний.

Клинические испытания с использованием голимумаба.

В глобальном рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании фазы 3 голимумаб вводили подкожно (п/к) субъектам с анкилозирующим спондилитом (АС) (исследование C0524T09), голимумаб продемонстрировал эффективность с улучшением признаков и симптомов, физической функции и качества жизни, обусловленного состоянием здоровья (HRQOL), у субъектов, страдающих анкилозирующим спондилитом (АС). Кроме того, анализ безопасности показал, что голимумаб п/к в целом хорошо переносился и продемонстрировал профиль безопасности, аналогичный профилю безопасности, наблюдаемому при применении других ингибиторов TNF- α .

Учитывая известную безопасность и эффективность голимумаба при п/к введении предположили, что голимумаб при в/в введении также будет иметь приемлемый профиль безопасности, соответствующий другим ингибиторам TNF- α , применяющимся при ревматических заболеваниях, таких как РА, ПА и АС. Голимумаб для внутривенного введения окончательно изучали в исследовании фазы 3 (CNTO148ART3001), результаты которого легли в основу одобрения препарата для лечения РА. Исследование CNTO148ART3001 представляло собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое двустороннее исследование эффективности и безопасности в/в применения голимумаба в дозе 2 мг/кг в виде инфузий, вводимых в течение 30 ± 10 мин в недели 0, 4 и после этого каждые 8 недель (один раз в 8 недель), у субъектов с активным РА, несмотря на сопутствующую терапию метотрексатом (MT). Субъектов с активным РА, несмотря на MT, рандомизировали для получения либо инфузий плацебо, либо голимумаба внутривенно, вводимого в дозе 2 мг/кг в недели 0, 4 и каждые 8 недель до недели 24. Начиная с недели 24 всем субъектам вводили в/в голимумаб до недели 100. Продemonстрировано, что голимумаб при в/в введении обеспечивал значительные преимущества в улучшении признаков и симптомов РА, физической функции и качества жизни, обусловленного состоянием здоровья, а также замедление прогрессирования структурного повреждения. Голимумаб, вводимый внутривенно при лечении РА (CNTO148ART3001), показал высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности при низкой частоте реакций на инфузии.

Недавно спланированы два исследования фазы 3 для оценки эффективности и безопасности голимумаба при внутривенном (в/в) введении в лечении субъектов с активным анкилозирующим спондилитом (АС) и активным псориатическим артритом (ПА). Проводят оценку способа введения у субъектов, поскольку доступные в настоящее время ингибиторы TNF- α для в/в введения имеют ограничения, связанные с иммуногенностью и реакциями на инфузию и для них требуется более длительное время инфузий (от 60 до 120 мин) по сравнению с длительностью инфузий голимумаба для в/в введения, составляющей 30 ± 10 мин. Пациенты также могут предпочитать поддерживающую схему в/в введения голимумаба, чем более частые п/к введения препаратов.

Последовательности.

Пример последовательностей антитела к TNF- α - SIMPONI® (голимумаб).

CDR (комплементарно детерминированная область) тяжелой цепи (HCDR) и CDR легкой цепи (LCDR) подчеркнуты в тяжелой цепи и легкой цепи голимумаба (определяемых по Кабату).

Тяжелая цепь (ТЦ) SEQ ID NO: 1.

```

1   QVQLVES VVQPGRSL SCAASGFI SYAMHWV PGNGLEW MSYDGSN
      GGG      RL      FS      RQA      VAF      KKY
61  ADSVKGR SRDNSKNT LQMNSLR TAVYYCA GIAAGGN YGMDVW
      FTI      LY      AED      RDR      YYY      GQGT
121 TVTVSSAS GPSVFPLA SKSTSGGT LGCLVKD EPVTVSW ALTSGVHT
      TK      PS      AA      YFP      NSG      FP
181 AVLQSSGL LSSVVTVP SLGTQTYI VNHKPSNT DKKVEPKS KTHTCPPC
      YS      SS      CN      KV      CD      PA
241 PELLGGPS LFPPKPKD MISRTPEV VVVDVSH EVKFNWY VEVHNAK
      VF      TL      TC      EDP      VDG      TKP
301 REEQYNST VVSVLTVL DWLNGKE KVSNKALP IEKTISKAK QPREPQVY
      YR      HQ      YKC      AP      G      TL
361 PPSRDELT QVSLTCLV FYPSDIAV ESNGQPEN KTTTPVLD GSFFLYSK
      KN      KG      EW      NY      SD      LT
421 VDKSRWQ VFSCSVM LHNHYTQ SLSPGK      456
      QGN      HEA      KSL

```

Легкая цепь (ЛЦ) SEQ ID NO:2

```

      EIVL      LSL      LSCR      SYLA      GQAP      ASNR
TQSPAT PGERAT ASQSVY WYQQKP RLLIYD ATGIPA
      RFSG      FTLTI      EDFA      RSN      PGTK      VAAP
1 SGSGTD SSLEP VYYCQQ WPPFTFG VDIKRT SVFIFP
      PSDE      ASVV      YPRE      VDN      QESV      DSTY
21 QLKSGT CLLNNF AKVQWK ALQSGNS TEQDSK SLSSTL
      TLSK      KVY      GLSS      NRGE
81 ADYEKN ACEVTHQ PVTKSF C

```

Кассеты рекомбинантной экспрессии.

В настоящем изобретении применяются кассеты рекомбинантной экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту. Последовательность нуклеотидов, например последовательность кДНК или геномной ДНК, кодирующую антитело по 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.

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.

Настоящее изобретение также относится к векторам, включающим выделенные молекулы нуклеиновых кислот, клеткам-хозяевам, созданным методом геной инженерии с применением рекомбинантных векторов, и к выработке по меньшей мере одного антитела КТНФ- α с применением хорошо известных специалистам рекомбинантных способов.

Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективируемый маркер, с целью 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, то его можно упаковать *in vitro* с помощью пригодной упаковывающей линии клеток, а затем ввести в клетки-хозяева.

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, экс-

прессуемая конструктами, предпочтительно содержит иницирующий трансляцию 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.

Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно, включают по меньшей мере один отбираемый маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничения, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе (DHFR, патенты США № 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017, ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или глутаминсинтетазе (GS) (патенты США № 5122464; 5770359; 5827739) 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 питательные среды и условия для вышеуказанных клеток-хозяев известны специалистам в данной области. Приемлемые векторы, разумеется, известны специалистам в данной области. Введение векторного конструкта в клетку-хозяина может осуществляться путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных методов. Такие способы хорошо известны и хорошо описаны в данной области.

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 секреторные сигналы, но также и дополнительные гетерологичные функциональные области. Например, к N-концу антитела можно добавлять область дополнительных аминокислот, в особенности 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 способы хорошо известны и хорошо описаны в данной области.

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 № 5580734, 5641670, 5733746 и 5733761.

Клеточные культуры, используемые для получения антител, их определенных частей или вариантов, включают клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто культивируют в виде монослоев клеток, но клетки также можно адаптировать для выращивания в суспензии, например, во встряхиваемых колбах или биореакторах. В данной области разработано несколько подходящих линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности линии клеток COS-1 (например, ATCC® CRL-1650), COS-7 (например, ATCC® CRL1651), HEK293, ВНК21 (например, ATCC® CCL-10), BSC-1 (например, ATCC® CCL-26) клетки яичника китайского хомячка (CHO), HEK G2, P3X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, клетки HeLa и т.п., например, производства American Type Culture Collection, Манассас, штат Вирджиния, США (www.atcc.org). В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева включают 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).

Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничения, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5168062; 5385839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1-альфа (патент США № 5266491), 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 T-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. Для продукции 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) либо из других известных или коммерческих источников.

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 последовательности сплайсинга является интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al., "Expression of a recomputed 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 специалистам в данной области.

Линии CHO-клеток.

Несмотря на доступность линий клеток нескольких других млекопитающих, большинство производимых в настоящее время рекомбинантных терапевтических белков получают в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (Jayapal K.P., et al. "Recombinant protein theo rapeutics 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). Их преимущества включают, например, надежный рост в виде прикрепленных клеток или в суспензии, способность адаптироваться к бессывороточным и средам с заданным химическим составом, высокую продуктивность и признанную историю одобрения регулирующих органов его использования для получения терапевтического рекомбинантного белка. Они также легко поддаются генетическим модификациям, и способы трансфекции клеток, экспрессии рекомбинантного белка и селекции клонов хорошо изучены. Клетки CHO также могут обеспечивать совместимые с человеком посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин "клетки CHO" включает, помимо прочего, например, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-M, CHO-S, нокаут CHO, а также их модификации и производные.

Клонирование и экспрессия в клетках CHO.

Одним вектором, обычно используемым для экспрессии в клетках CHO, является рС4. Плазмида рС4 является производным плазмиды рSV2-dhfr (ATCC® 37146). Плазмида содержит мышинный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника или другие клетки китайского хомячка, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гайтерсбург, штат Мэриленд, США) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексат. Амплификация генов DHFR в клетках, устойчивых к метотрексату (MT), хорошо задокументирована (см., например, F.W. Alt, et al., "Selective reduction of dihydrofolate reductase gene in methotrexate-resistant varieties of cultured mouse 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-III in Chinese hamster ovary cells". *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MT, развивается устойчивость к этому ЛС 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.

Для экспрессии представляющего интерес гена плазмида рС4 содержит сильный промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., "Functional analysis of the transcription control region located within the avian retroviral long terminal repeat". *Molec. 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. Сзади этих сайтов клонирования плазмида 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, в том числе ВИЧ и HTLV-I. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и аналогичные системы также можно использовать для регулируемой экспрессии белков в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, "Tight control of gene expression in 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 представляющий интерес ген, интегрированный в хромосомы, также можно отбирать после котрансфекции с селективируемым маркером, таким как gpt, G418 или гигромицин. Преимуществом является использование вначале более одного селективируемого маркера, например G418 плюс метотрексат.

Основные способы очистки.

Антитело к TNF- α может быть восстановлено и очищено из рекомбинантных клеточных культур хорошо известными способами, включая, помимо прочего, очистку белком А, осаждение сульфатом аммония или спиртом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилпатите и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

При использовании в настоящем документе термины "антитело" или "антитела" включают молеку-

лы биоподобных антител, утвержденные в соответствии с Законом о конкуренции и инновации 2009 (Закон ВРСІ) и аналогичными законами и нормами всех стран. В соответствии с Законом ВРСІ антитело может быть биоподобным, если данные показывают, что оно является "очень схожим" с эталонным препаратом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и от его применения "ожидают" получение того же клинического результата, что и от применения эталонного препарата, с точки зрения безопасности, чистоты и активности (R. Dolinar, F. Lavernia и S. Edelman. "A GUIDE TO FOLLOW-ON BIOLOGICS AND BIOSIMILARS WITH A FOCUS ON INSULIN". Endocrine Practice: February 2018, Vol. 24, No. 2, p. 195-204). Эти биоподобные молекулы антител регистрируют по сокращенной процедуре, при котором заявитель ссылается на клинические данные инновационного референтного препарата для получения одобрения регулирующих органов. По сравнению с оригинальным инновационным референтным антителом, одобренным FDA на основании успешных клинических исследований, биоподобная молекула антитела в настоящем документе называется "биоподобным лекарственным препаратом". Как представлено в настоящем документе, SIMPONI® (голимумаб) представляет собой оригинальное инновационное референтное антитело к TNF- α , которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований. Голимумаб продается в США с 2009 года.

При использовании в настоящем документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, 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 полную структуру 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 процесса изготовления.

Препарат SIMPONI® (голимумаб) изготавливают в ходе процесса, состоящего из 9 стадий, который включает непрерывное перфузионное культивирование клеток с последующей очисткой. Обзор производственного процесса представлен на фиг. 39.

Используемые в настоящем документе термины "культура", "культивирование", "культивированный" и "клеточная культура" относятся к популяции клеток, которая суспендирована в среде в условиях, подходящих для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет очевидно из контекста для обычных специалистов в данной области, эти термины, используемые в настоящем документе, также относятся к комбинации, содержащей популяцию клеток и среду, в которой популяция суспендирована. Клеточная культура включает, например, клетки, выращенные способами культивирования с подпиткой или перфузионного культивирования клеток и т.п. В определенных вариантах осуществления клеточная культура представляет собой культуру клеток млекопитающих.

Клеточные линии для применения в настоящем изобретении включают клеточные линии млекопитающих, включая, помимо прочего, клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO), человеческие эмбриональные клетки почек (клетки HEK), клетки почки новорожденного хомяка (клетки ВНК), клетки мышечной миеломы (клетки NS0 и клетки Sp2/0) и клетки человеческой сетчатки (например, клетки PER.C6).

Используемые в настоящем документе термины "среда с заданным химическим составом", "среды с заданным химическим составом", "среда для культивирования гибридом с заданным химическим составом" или "среды для культивирования гибридом с заданным химическим составом" относятся к синтетической среде для выращивания с известными характеристиками и концентрацией всех компонентов. Среды с заданным химическим составом не содержат бактериальных, дрожжевых, животных или растительных экстрактов, сыворотки крови животных или плазмы крови животных, хотя они могут включать или не включать в себя отдельные компоненты растительного или животного происхождения (например, белки, полипептиды и т.д.). Среды с заданным химическим составом могут содержать неорганические соли, такие как фосфаты, сульфаты и т.п., необходимые для поддержания роста. Определен источник углерода, который, 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 качестве буфера в некоторых средах с заданным химическим составом также используют фосфатные соли, можно использовать другие буферные растворы, такие как цитрат, триэтанолламин и т.п. Примеры коммерчески доступных сред с заданным химическим составом включают, помимо прочего, среды для культивирования гибридом с заданным химическим составом CD Hybridoma Medium и среду CD Hybridoma AGT™ Medium компании ThermoFisher, различные среды Игла в модификации Дульбекко (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC

Biosciences, Inc), питательную смесь Хэма (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), их комбинации и т.п. Способы получения сред с заданным химическим составом известны в данной области, например в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217 и публикациях заявок на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770.

Используемый в настоящем документе термин "биореактор" относится к любому сосуду, используемому для выращивания клеточной культуры. Биореактор может быть любого размера при условии, что он подходит для культивирования клеток. В определенных вариантах осуществления такие клетки представляют собой клетки млекопитающих. Как правило, объем биореактора будет составлять по меньшей мере 1 л и может составлять 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 л или более или любой промежуточный объем. Внутренние условия биореактора, в том числе, помимо прочего, pH и температура, можно дополнительно контролировать в течение периода культивирования. Биореактор может состоять из любого материала, который подходит для хранения 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 для изготовления представляющего интерес полипептида или гликопротеина. Объем производственного биореактора, как правило, составляет по меньшей мере 500 л и может составлять 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 л или более или любой промежуточный объем. Специалист в данной области техники будет знать и сможет выбрать подходящие биореакторы для применения на практике настоящего изобретения.

Прекультивирование, размножение клеток и продукцию клеток выполняют на стадиях 1 и 2. На стадии 1 иницируют прекультивирование из одного флакона с рабочим банком клеток трансфицированных клеток Sp2/0, экспрессирующих последовательности ТЦ и ЛЦ голимумаба, клетки размножают в культуральных колбах, одноразовых культуральных мешках и либо в перфузионном биореакторе для выращивания посевного материала вместимостью 50 л, оборудованном внутренним центробежным фильтром, либо в перфузионном биореакторе для выращивания посевного материала вместимостью 200 л, оборудованном системой удержания клеток с мембранной фильтрацией с переменным тангенциальным потоком (ATF). Клетки культивируют до тех пор, пока не будут получены плотность и объем клеток, необходимые для посева в производственный биореактор вместимостью 500 или 1000 л. На стадии 2 клеточную культуру непрерывно перфузируют в производственном биореакторе вместимостью 500 или 1000 л с использованием системы ATF. Фильтрат (сбор) клеточной культуры забирают из системы ATF, в то время как клетки возвращают в биореактор, и в культуру подливают свежую среду. Биомасса, удаленная из биореактора, может быть объединена с извлеченным из системы ATF сбором, а затем очищена для получения объединенного сбора для дальнейшей обработки.

Очистку голимумаба из сбора клеточной культуры выполняют на стадиях 3-8 с помощью комбинации этапов аффинной и ионообменной хроматографии и этапов для инактивации или удаления потенциального вирусного загрязнения (обработка растворителем/моющим средством и фильтрация для удаления вируса). На стадии 3 сбор и/или объединенный сбор процеживают и очищают с использованием аффинной хроматографии на белке А. Элюат, получившийся в результате прямого связывания продукта (ПСП), замораживают до дальнейшей обработки. Элюаты ПСП фильтруют и объединяют в пул на стадии 4 после размораживания, а затем на стадии 5 обрабатывают три-н-бутилфосфатом (TNBP) и полисорбатом 80 (PS 80) для инактивации любых потенциально присутствующих вирусов в липидной оболочке.

На стадии 6 из продукта голимумаба удаляют реагенты TNBP и PS 80 и примеси с помощью катионообменной хроматографии. Продукт голимумаба дополнительно очищают с помощью анионообменной хроматографии на стадии 7 для удаления ДНК, потенциально присутствующих вирусов и примесей. На стадии 8 очищенный продукт голимумаба разбавляют и фильтруют через удерживающий вирусы фильтр.

Окончательное получение голимумаба выполняют на стадии 9. Продукт голимумаба концентрируют на этапе ультрафильтрации, а на этапе диафильтрации добавляют эксципиенты состава и удаляют внутрипроизводственные буферные соли. Добавляют PS 80 и основное промежуточное соединение фильтруют в поликарбонатные контейнеры для хранения в замороженном виде.

Партию определяют как количество материала, промежуточного или готового продукта, которое должно быть однородным по характеру и качеству и которое произведено в ходе определенного цикла изготовления. Термин "партия" применяется к следующему.

Прекультивирование

Реактор для выращивания посевного материала 50 л/производственный биореактор для производства 500 л.

Биореактор для выращивания посевного материала 200 л.

Производственный биореактор 1000 л.

Прямое связывание продукта.

Даунстрим-процессинг.

На нескольких стадиях процесса изготовления назначают различные номера партий. Ниже представлено краткое описание стадий процесса изготовления, на которых определяют партии.

Первой стадией в процессе изготовления является начало прекультивирования из флакона с рабочим банком клеток (РБК). Каждую прекультуру или резервную прекультуру идентифицируют как партию.

Когда прекультура соответствует критериям посева, прекультуру переносят в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л и содержимое одного биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 л переносят в один производственный биореактор вместимостью 500 л, каждая комбинация биореакторов вместимостью 50 и 500 л идентифицируют как партию. Биомасса, удаленная из биореактора, может быть объединена с извлеченным из системы ATF сбором, а затем очищена для получения объединенного сбора для дальнейшей обработки. Всему супернатанту клеточной культуры или объединенного субстрату, полученному из одного биореактора вместимостью 500 л, присваивают номер партии биореактора плюс расширение, соответствующее конкретной среде (т.е. 001, 002 и т.д.).

Прекультуру можно также переносить в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 200 л, и содержимое одного биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 200 л переносят в один производственный биореактор вместимостью 1000 л. Каждый из отдельных биореакторов вместимостью 200 и 1000 л определяют как партию. Всему сбору супернатанта клеточной культуры, полученному из одного биореактора вместимостью 1000 л, присваивают номер партии биореактора плюс расширение, соответствующее конкретной среде (т.е. 001, 002 и т.д.).

Объединение в пул сбора супернатанта клеточной культуры из множества биореакторов позволяет провести очистку на этапе хроматографии на белке А с прямым связыванием продукта (ПСП). Каждый прогон ПСП идентифицируют как партию. Для ПСП можно использовать колонку диаметром 28, 40, 60 или 80 см. Каждая партия может содержать различные количества исходного материала голимумаба, и используют колонки различных диаметров в зависимости от количества исходного материала голимумаба. Несколько партий ПСП объединяют для инициирования даунстрим-процессинга (ДСП) партии, которая может быть инициирована с различными количествами голимумаба.

Процесс массового изготовления продукции позволяет объединить в пул любой сбор, соответствующий критериям приемлемости внутрипроизводственного контроля, для дальнейшей обработки хроматографированием на белке А (стадия 3). Аналогичным образом, любая партия ПСП, соответствующая спецификациям внутрипроизводственного контроля, может быть объединена в пул (стадия 4), чтобы инициировать последующую партию. Однако средневзвешенный по массе возраст клеточной культуры, добавленной в пул ПСП, должен составлять от 15 до 51 дней включительно.

Средневзвешенный по массе возраст пула ПСП определяют как сумму массы голимумаба, полученную в каждом сборе, умноженную на число суток среды, деленное на общую массу голимумаба в пуле ПСП:

$$\text{Средневзвешенная масса} = \frac{(m_1d_1 + m_2d_2 + m_3d_3 + \dots m_id_i)}{(m_1 + m_2 + \dots m_i)}$$

где М - масса голимумаба, вносимая в пул каждого сбора;

d - день работы биореактора, когда завершено собирание серии сбора.

Переменные процесса, включая как входные данные (т.е. технологические параметры), так и выходные данные (т.е. данные внутрипроизводственного контроля [IPC] и испытания мониторинга технологических процессов [PMT]), контролируют на протяжении процесса изготовления и регистрируют в протоколах производственной партии для обеспечения единообразия как процесса, так и продукта.

Подробное описание процесса изготовления и технологического контроля.

Стадия 1.

Прекультивирование и размножение.

Первой стадией в продукции SIMPONI® (голимумаб) является инициация прекультивирования из флакона с рабочим банком клеток (WCB) трансфицированных клеток Sp2/0, экспрессирующих последовательности ТЦ и ЛЦ голимумаба, и последующее размножение клеточной культуры в культуральных колбах, одноразовых культуральных мешках и в биореакторе для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л. Клетки культивируют до тех пор, пока не будут получены плотность и объем клеток, необходимые для посева в производственный биореактор вместимостью 500 или 1000 л.

Процедура изготовления.

Криофлакон с РБК размораживают и разбавляют средой для культивирования гибридом с заданным химическим составом с добавлением 6 мМ L-глутамин, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (среда CDH-A) до плотности посева $0,2-0,4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Жизнеспособность культуры при размораживании должна составлять >50%. Первоначальный пассаж поддерживают в культуральной(-ых) колбе(-ах) в увлажненном инкубаторе с CO₂, температуру и CO₂ контролируют в пределах диапазонов, определенных в протоколе партии. Культуру инкубируют в течение 2-3 дней до получения минимальной клеточной плотности $0,6 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

Масштабирования достигают путем последовательного размножения культуры в культуральных

флаконах и одноразовых культуральных мешках. Каждый пассаж начинали с клеточной плотности $0,2-0,4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл путем разведения средой CDH-A. Пассажи инкубируют в течение 2-3 дней на каждом этапе размножения до получения минимальной плотности клеток $0,6 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. После достижения достаточного объема культуры в одноразовом пакете для культивирования при $>0,8 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл и $>80\%$ жизнеспособности культуры, культуру можно засеивать в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л.

Образцы каждого пассажа прекультивирования отбирают для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л образцы прекультивируют для оценки бионагрузки. Прекультивирование можно поддерживать в течение максимум 30 дней после размораживания. Прекультивирование прекращают при обнаружении микробного загрязнения или превышении максимальной продолжительности. Резервная прекультура может быть сохранена при посеве в биореактор для выращивания посевного материала или может быть иницирована при размораживании нового флакона с РБК. Резервную прекультуру размножают, как описано выше, и подвергают воздействию при тех же параметрах внутрипроизводственного контроля и функционирования, что и первичные культуры. Резервную прекультуру могут поддерживать и использовать для посева в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л при необходимости.

Когда прекультура соответствует критериям посева, содержимое одноразового(ых) культурально-го(ых) мешка(ов) для культивирования переносят в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л для достижения плотности посева $\geq 0,3 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л подпитывают культуральной средой CDH-A и до достижения полного рабочего объема эксплуатируют в режиме перфузии. Для поддержания клеточного роста контролируют pH, температуру и концентрацию растворенного кислорода культуры. Культуру в биореакторе для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л размножают до получения клеточной плотности $\geq 2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл при $\geq 80\%$ жизнеспособности культуры. На протяжении всего процесса забирают образцы культуры из биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л для определения VCD, жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в производственный биореактор вместимостью 500 или 1000 л отбирают образцы из биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л для оценки бионагрузки. Если показатель VCD в образцах из биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л достигает $\geq 2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, а производственный биореактор вместимостью 500 или 1000 л не готов к посеву, можно продолжить перфузионное культивирование клеток до максимальной продолжительности культивирования, составляющей 6 дней после посева в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л и 7 дней после посева в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 200 л. Эксплуатацию биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л прекращают при обнаружении микробного загрязнения или превышении максимальной продолжительности.

Стадия 2.

Продукция биореактора.

Второй стадией производственного процесса является перфузионное культивирование клеток в производственном биореакторе вместимостью 500 или 1000 л. Фильтрат (сбор) клеточной культуры забирают из производственного биореактора, в то время как клетки удерживаются с помощью устройства удержания клеток с мембранной фильтрацией с переменным тангенциальным потоком (ATF), после чего культуру пополняют свежей средой.

Процедура изготовления.

Посев в производственном биореакторе вместимостью 500 или 1000 л выполняют путем переноса содержимого биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 или 200 л в производственный биореактор вместимостью 500 или 1000 л, содержащий среду для культивирования гибридом с заданным химическим составом, обогащенную 6 мМ L-глутамина, 0,5 мг/л микофенольной кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (среда CDH-A). Переносимый объем должен быть достаточным, чтобы получить плотность посева $\geq 0,3 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Культуры поддерживают при температуре 34,0-38,0°C, pH 6,80-7,40 и концентрации растворенного кислорода 10-80%. Отбор образцов проводят в течение всего процесса культивирования в производственном биореакторе вместимостью 500 или 1000 л для контроля плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры, бионагрузки и концентрации иммуноглобулина G (IgG).

После посева скорость подачи среды в культуру увеличивают в соответствии с предварительно заданным графиком до тех пор, пока не будет достигнута максимальная скорость подачи. Максимальную скорость подачи поддерживают на уровне 0,80-1,50 объемов реактора в сутки. При достижении полного рабочего объема биореактора запускают перфузия с помощью системы ATF для выделения клеток из фильтрата. Фильтрат непрерывно отбирают через фильтр ATF, в то время как клеточная культура циркулирует между системой ATF и биореактором. Фильтрат ATF собирают в контейнеры для биопротесса

(BPC).

Меняют питающую среду в биореакторе с CDH-A на CD Hybridoma medium с прибавлением 6 мМ L-глутамина, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина, 50 мг/л ксантина и 10 мМ ацетата натрия (среда CDH-B), когда VCD достигает $\geq 8,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, но не позднее чем через на 15 день после посева в реактор вместимостью 500 или 1000 л. Плотность жизнеспособных клеток в биореакторе контролируют до целевой концентрации, составляющей по меньшей мере $12,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл при помощи регулируемого потока для удаления биомассы из культуры.

Биомассу, удаленную из биореактора, можно выбросить или объединить с фильтратом ATF и очистить путем фильтрации.

Фильтрат ATF обозначают как поток среды сбора. В поток среды сбора прибавляют этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) до достижения концентрации 5-20 мМ. Сбор хранят в контейнерах для биопроцесса (BPC) в среде с температурой 2-8°C в течение максимального периода времени 21 дней после извлечения из биореактора. Перед прямым связыванием продукта отбирали образцы из контейнеров для биопроцесса для каждого сбора для контроля концентрации IgG, эндотоксина и бионагрузки (стадия 3).

Операция по перфузионному культивированию клеток в производственном биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л продолжают до 60 дней после посева. В последний день работы производственного биореактора вместимостью 500 или 1000 л отбирают образцы культуры для тестирования на микоплазму и занесенный вирус. Концентрацию IgG в биореакторе контролировали и регистрировали только для информации.

Стадия 3.

Прямое связывание продукта (ПСП).

На стадии 3 сбор из одного или более производственных биореакторов вместимостью 500 или 1000 л фильтруют и очищают с использованием колонки MabSelect™ для аффинной хроматографии на белке А (GE Healthcare Bio-Sciences, г. Питтсбург, штат Пенсильвания, США) и установки для автоматической хроматографии. Продукт голиумаба связывают из сбора и удаляют связанные с процессом примеси, включая компоненты среды и связанные с клетками-хозяевами примеси (например, ДНК и белок клетки-хозяина), и потенциально присутствующие вирусы. Элюат, получившийся в результате прямого связывания продукта (ПСП), замораживают до дальнейшей обработки.

Подготовка и регенерация колонки на белке А.

Перед загрузкой сбора уравнивают колонку MabSelect™ на белке А с помощью 50 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 0,1% полисорбата 80 (PS 80), pH 7,3 (уравнивающий буфер). Контролируют pH и проводимость в эффлюенте колонки, чтобы убедиться, что колонка уравновешена.

После применения колонку MabSelect™ на белке А можно регенерировать с помощью введения 6 М гуанидин гидрохлорида с последующей промывкой 0,1 М цитрата натрия, pH 3,5, с последующей промывкой в уравнивающем буферном растворе. Альтернативная процедура регенерации, которая также может быть использована, включает применение уравнивающего буфера с последующим введением 6 М гуанидин гидрохлорида, затем уравнивающего буфера с последующим введением 0,1 М цитрата натрия, pH 3,5, и затем уравнивающего буфера. При необходимости смолу MabSelect™ хранят в 20% этаноле.

Процедура изготовления.

Сбор пропускали через фильтр 0,45 мкм и загружали в колонку на белке А с нагрузкой 20-50 г/л. После промывки колонки уравнивающим буфером до тех пор, пока поглощение ультрафиолетового излучения при 280 нм (A_{280}) не вернется к значению длины пути ≤ 100 мАЕ/мм, колонку со связанным продуктом голиумаба промывают дополнительными 2-6 объемами колонки (CV) уравнивающего буфера. После этого выполняют промежуточную промывку, используя 4,5-7,0 объемов колонки 0,1 М цитрата натрия, pH 5,0.

Продукт голиумаба элюируют с использованием 0,1 М буфера цитрата натрия, pH 3,5. Сбор элюированного продукта начинают с восходящего канала сигнала A_{280} с длиной пути ≥ 50 мАЕ/мм и останавливают на нисходящем сигнале A_{280} с длиной пути ≥ 50 мАЕ/мм. Скорость потока, применяемая во время загрузки, промывки и элюирования, составляет 150-500 см/ч.

После сбора элюат ПСП голиумаба нейтрализуют до pH 6,0-6,5 с помощью прибавления 1,0 М трис-буфера (без титрования) и при необходимости 1,0 М лимонной кислоты (без титрования). Во время регулирования pH элюат ПСП перемешивают для обеспечения однородности раствора. Элюат голиумаба ПСП с доведенным значением pH отбирают для анализа бионагрузки перед фильтрацией через 0,2-мкм фильтр. Вторая фильтрация через фильтр 0,2 мкм может быть выполнена, если фильтр 0,2 мкм, использованный во время первой фильтрации через фильтр 0,2 мкм, не прошел испытание на целостность.

Отфильтрованный элюат ПСП аликвотируют в поликарбонатные контейнеры. Отфильтрованный элюат ПСП отбирают для анализа содержания мономера, бионагрузки, эндотоксина и концентрации белка (на основании которой рассчитывают выход этапа, который должен составлять $\geq 55\%$). Отфильтрован-

ный элюат ПСП можно хранить в течение совокупного времени ≤ 48 ч при температуре 15-25°C и 168 ч при температуре 2-8°C перед хранением при температуре 40°C.

Стадия 4.

Размораживание и объединение элюатов прямого связывания продукта (ПСП).

На стадии 4 несколько элюатов прямого связывания продукта (ПСП) размораживают, фильтруют и объединяют перед обработкой растворителем/детергентом.

Процедура изготовления.

Элюаты ПСП выбирают таким образом, что средневзвешенный по массе возраст пула ПСП составлял от 15 до 51 дня включительно. Замороженные элюаты ПСП размораживают при температуре 15-25°C. Размораживание считается завершенным, когда элюаты визуальным образом не содержат льда. Размораживание не должно превышать 120 ч. После размораживания, объединения и смешивания проверяли pH объединенных элюатов ПСП и при необходимости доводили значение pH до 5,9-6,5 с помощью добавления либо 1,0 М трис-буфера (без титрования), либо 1,0 М лимонной кислоты (без титрования). После достижения конечного значения pH отбирают образцы пула элюатов ПСП для анализа бионагрузки. Концентрацию белка в пуле рассчитывают на основе общего объема пула и общего количества белка в пуле. Объединенные элюаты ПСП затем фильтруют через фильтр 0,2 мкм в смесительный сосуд. Отфильтрованные и объединенные в пул элюаты ПСП можно хранить в течение совокупного времени < 48 ч при температуре 15-25°C и 168 ч при температуре 2-8°C перед дальнейшей обработкой на стадии 5.

Стадия 5.

Обработка растворителем/детергентом (Р/Д) элюатов ПСП.

На стадии 5 объединенные элюаты прямого связывания продукта (ПСП) инкубируют с три-н-бутилфосфатом (TNBP) и полисорбатом 80 (PS 80) (обработка растворителем/детергентом [Р/Д]) для инактивации любых потенциально присутствующих вирусов с липидной оболочкой.

Процедура изготовления.

Маточный раствор Р/Д, содержащий 2% TNBP/10% PS 80 (по массе), переносят в смесительный сосуд с пулом элюатов ПСП до достижения соотношения 0,08-0,12 (по объему). Раствор перешивают для обеспечения однородности раствора и впоследствии переносят в сосуд для инактивации. После переноса выполняют инактивацию вирусов с помощью инкубации в течение по меньшей мере 90 мин при температуре 15-25°C. Загрузку обработанного Р/Д продукта голиумаба в колонку для катионообменной хроматографии (стадия 6) выполняют в течение < 20 ч после добавления химических агентов Р/Д (стадия 5).

Стадия 6.

Катионообменная хроматография.

На стадии 6 материал стадии 5, обработанный растворителем/детергентом (Р/Д), очищают с использованием колонки UNOsphere STM для катионообменной хроматографии (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния, США) и установки для автоматической хроматографии. Стадия 6 выполнена с возможностью удаления технологических химических веществ Р/Д (три-н-бутилфосфат [TNBP] и полисорбат 80 [PS 80]) и других примесей из продукта.

Подготовка и регенерация хроматографической колонки.

Перед загрузкой упакованную колонку уравнивают 30 мМ фосфатным натрием буфером с pH 6,5 (уравнивающий буфер). Контролируют pH и проводимость в эффлюенте колонки, чтобы убедиться, что колонка уравновешена.

После применения катионообменную колонку UNOsphere STM регенерируют, промывая 50 мМ трис, 1,0 М NaCl буфером с pH 7,6-8,0, а затем проводят санацию с помощью 1,0 М NaOH и при необходимости хранят в растворе (0,1 М NaOH).

Процедура изготовления.

Во время загрузки продукт, обработанный Р/Д, разбавляют в технологической линии водой для впрыска с целью достижения нагрузочной проводимости 1,5-4,5 мСм/см. После загрузки колонки до нагрузки 35-55 г голиумаба/л колонку промывают 1,6-6,7 объемами колонки (CV) уравнивающего буфера, а затем 5,2-9,8 объемами колонки 50 мМ трис-буфера, pH 7,6-8,0.

Затем материал элюируют из катионообменной колонки с использованием 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфера с pH 7,6-8,0. Сбор элюированного продукта начинают с восходящего сигнала поглощения ультрафиолетового излучения при 280 нм (A_{280}) с длиной пути ≥ 30 мАЕ/мм и останавливают на нисходящем сигнале A_{280} с длиной пути ≥ 75 мАЕ/мм. Скорость потока, применяемая во время загрузки, промывки и элюирования, составляет 45-150 см/ч.

Элюированный материал отбирают для анализа бионагрузки, белков клетки-хозяина, остаточного белка А, агрегатов и концентрации белка. Выход этапа рассчитывают по концентрации белка, и он должен соответствовать $\geq 80\%$. Затем продукт фильтруют через 0,2-мкм фильтр перед дальнейшей обработкой на стадии 7.

В альтернативном варианте осуществления образцы элюируемого материала отбирают для оценки бионагрузки, продукт фильтруют через 0,2 мкм фильтр и отбирают образцы для анализа концентрации белков клетки-хозяина, остаточного белка А, агрегата и белка. Выход этапа рассчитывают по концентра-

ции белка, и он должен соответствовать >80%. Затем на стадии 7 материал подвергают дальнейшей обработке.

На стадиях 6-8 для голимумаба подтвержденный допустимый диапазон (PAR) совокупного времени обработки и выдержки составляет менее чем 115 или равен 115 ч, технологический диапазон (MOR) составляет 70-90 ч при контролируемой комнатной температуре (15-25°C). Совокупное время обработки и выдержки определяют, начиная с окончания элюирования продукта на стадии 6 и заканчивая на начале концентрации продукта на стадии 9, и это время включает этапы активной обработки, а также промежуточное время выдержки между этапами. Не установлен никакой специфичный для конкретной стадии предел для стадий 6, 7 или 8 с учетом того, что условия материала не изменяются для стадий 3. Таким образом, параметры технологического контроля основаны на общем времени на трех стадиях.

Стадия 7.

Анионообменная хроматография.

На стадии 7 материал стадии 6 очищают с использованием колонки Q Sepharose™ XL для анионообменной хроматографии (GE Healthcare Bio-Sciences, г. Питтсбург, штат Пенсильвания, США) и установки для автоматической хроматографии. Голимумаб протекает через смолу, при этом удерживаются ДНК, другие примеси и вирусы (если они присутствуют).

Подготовка и регенерация хроматографической колонки.

Перед загрузкой упакованную колонку уравнивают 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0 (уравнивающий буфер). Контролируют pH и проводимость в эффлюенте колонки, чтобы убедиться, что колонка уравновешена.

После применения колонку Q Sepharose™ XL для анионообменной хроматографии регенерируют, промывая 50 мМ трис, 1,0 М NaCl буфером с pH 7,6-8,0 с последующей санацией с помощью 2,0 М NaOH и последовательными промывками водой для инъекций. 3,0 М KCl, водой для инъекций или (только в Janssen Biologics BV [JBV]) с последующей санацией с помощью 1,0 М NaOH/1,0 М NaCl и промывкой водой для инъекций, при необходимости колонку хранят в растворе (0,1 М NaOH).

Процедура изготовления.

Материал, очищенный с помощью катионообменной хроматографии (стадия 6), загружают в анионообменную колонку со скоростью потока для наполнения 50-250 см/ч и нагрузкой 50-150 г/л. Голимумаб протекает через колонку (режим без связывания), и его собирают, как только поглощение ультрафиолетового излучения при 280 нм (A_{280}) увеличивается до ≥ 30 мАЕ/мм длины пути. После загрузки колонку промывают уравнивающим буфером со скоростью потока 50-250 см/ч. Сбор элюата продолжают до тех пор, пока показание A_{280} не возвращается к значению длины пути ≥ 80 мА/мм.

Образец элюата отбирают для анализа бионагрузки и концентрации белка. Выход этапа рассчитывают по концентрации белка, и он должен соответствовать $\geq 80\%$. Затем материал фильтруют через 0,2 мкм фильтр перед дальнейшей обработкой на стадии 8.

В альтернативном варианте осуществления проводят забор образцов элюата для анализа бионагрузки, после чего материал фильтруют через 0,2 мкм фильтр и отбирают образцы для определения концентрации белка. Выход этапа рассчитывают по концентрации белка, и он должен соответствовать $\geq 80\%$. Затем, если требуется для обработки на стадии 8, материал разбавляют 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0 до концентрации белка $\leq 6,5$ г/л и смешивают перед дальнейшей обработкой на стадии 8.

На стадиях 6-8 для голимумаба подтвержденный допустимый диапазон (PAR) совокупного времени обработки и выдержки составляет менее чем 115 или равен 115 ч, технологический диапазон (MOR) составляет 70-90 ч при контролируемой комнатной температуре (15-25°C). Совокупное время обработки и выдержки определяют, начиная с окончания элюирования продукта на стадии 6 и заканчивая на начале концентрации продукта на стадии 9, и это время включает этапы активной обработки, а также промежуточное время выдержки между этапами. Не установлен никакой специфичный для конкретной стадии предел для стадий 6, 7 или 8 с учетом того, что параметры технологического контроля основаны на общем времени на трех стадиях.

Стадия 8.

Фильтрация для удаления вируса.

На стадии 8 материал стадии 7, очищенный анионообменной хроматографией, фильтруют через удерживающий вирусы фильтр NFP™. Целью этой стадии является удаление потенциально присутствующих мелких и крупных вирусов.

Подготовка фильтра NFP™.

Перед использованием фильтры NFP™ устанавливают в систему фильтрации NFP™, промывают водой для инъекций и автоклавируют. После автоклавирования фильтры промывают водой для инъекций, а затем испытывают на проницаемость. Фильтры уравнивают 50 мМ, трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0. Контролируют pH и проводимость в фильтрате, чтобы убедиться, что фильтр NFP™ уравновешен.

После фильтрации продукта и промывки буфера фильтры NFP™ проверяют индивидуально на целостность.

Процедура изготовления.

При необходимости продукт, очищенный с помощью анионообменной хроматографией (на стадии 7), разбавляли 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0 до концентрации белка $\leq 6,5$ г/л перед его фильтрацией. После разбавления получившийся раствор перемешивают, а затем фильтруют через фильтр 0,2 мкм.

Разбавленный продукт затем фильтруют через уравновешенные фильтры NFP™ при давлении $\leq 3,1$ бар. На мембраны прикладывают нагрузку ≤ 725 г/м². Начальную скорость потока для фильтрации продукта могут регистрировать в течение 20 мин после начала фильтрации продукта для этого процесса. Первоначальный поток фильтрации продукта может быть зарегистрирован в пределах ≤ 54 л для 9 фильтров или ≤ 171 л для 10 фильтров после начала фильтрации продукта. Контролируют снижение скорости потока, чтобы обеспечить сокращение по сравнению с начальной скоростью потока (определяемой как снижение скорости потока 0%), не превышающее 74%. В случае, когда снижение скорости потока достигает предела 74% (определяемого как предел снижения скорости потока), могут отсоединить фильтр и остановить подачу продукта к этому фильтру. Отсоединенный фильтр возвращают в технологическую линию на этап промывки буфера после загрузки. Во время фильтрации, если снижение скорости потока достигает предела 74% (определяется как предел снижения скорости потока), фильтрацию можно остановить и немедленно выполнить промывку буфером.

После завершения фильтрации систему, включающую фильтры, промывают 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0, в общем количестве $\leq 10,1$ л/м², при давлении фильтрации $\leq 3,1$ бар. Буфер, использованный для промывки, собирают, объединяют и смешивают с остальной частью продукта, фильтрованного через фильтр NFP™, и отбирают образцы для оценки биоагрузки и концентрации белка. Выход этапа рассчитывают по концентрации белка, и он должен соответствовать $\geq 90\%$. Объединенный фильтрат через фильтр NFP™ затем фильтруют через фильтр 0,2 мкм перед дальнейшей обработкой на стадии 9.

Образцы разбавленного материала со стадии 7 можно отбирать для анализа биоагрузки непосредственно перед фильтрованием через фильтр NFP™. После завершения фильтрации систему, включающую фильтры, промывают 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0, в общем количестве $\leq 10,1$ л/м², при давлении фильтрации $\leq 3,1$ бар. Буфер, использованный для промывки, собирают, объединяют и смешивают с остальной частью материала, фильтрованного через фильтр NFP™, и отбирают образцы для анализа концентрации белка. Выход этапа рассчитывают по концентрации белка, и она должна соответствовать $\geq 90\%$, перед дальнейшей обработкой на стадии 9.

На стадиях 6-8 для голимуаба подтвержденный допустимый диапазон (PAR) совокупного времени обработки и выдержки составляет менее чем 115 ч или равен 115 ч, технологический диапазон (MOR) составляет 70-90 ч при контролируемой комнатной температуре (15-25°C). Совокупное время обработки и выдержки определяют, начиная с окончания элюирования продукта на стадии 6 и заканчивая на начале концентрации продукта на стадии 9, и это время включает этапы активной обработки, а также промежуточное время выдержки между этапами. Не установлен никакой специфичный для конкретной стадии предел для стадий 6, 7 или 8 с учетом того, что параметры технологического контроля основаны на общем времени на трех стадиях.

Стадия 9.

Концентрация и диафильтрация для получения нерасфасованного продукта.

На стадии 9 материал стадии 8 концентрируют и диафильтруют для добавления эксципиентов в состав. Затем к концентрированному и диафильтрованному раствору голимуаба прибавляют полисорбат 80 (PS 80) с получением нерасфасованного продукта.

Подготовка системы ультрафильтрации.

Перед применением систему ультрафильтрации, включающую мембраны, уравновешивают 50 мМ трис, 50 мМ NaCl буфером с pH 7,6-8,0. Значение pH фильтрата и ретентата контролируют для обеспечения уравновешивания мембран.

После применения систему ультрафильтрации, включающую мембраны, санируют путем промывки водой для инъекций и 1,0 М NaOH. Затем систему промывают водой для инъекций и выполняют испытание на нормализованную водопроницаемость. При необходимости систему и мембраны хранят в подходящем растворе.

Процедура изготовления.

Продукт голимуаба, очищенный путем фильтрации для удаления вируса (на стадии 8), концентрировали до 40-90 г/л и диафильтровали, используя 8-12 диафильтрационных объемов буфера, содержащего 10 мМ гистидина, 4,5% сорбита, с pH 5,3 (диафильтрационный буфер). После диафильтрации тестируют pH, проводимость и осмоляльность фильтрата, чтобы убедиться в полной замене буфера. После замены буфера раствор сверхконцентрируют до ≤ 180 г/л, а затем извлекают путем опорожнения системы. В процессе концентрации, диафильтрации и сверхконцентрации давление подачи и ретентата можно регулировать так, что оно составляет $\leq 2,8$ и $\leq 2,1$ бар соответственно. В альтернативном варианте осуществления давление в мембране (TMP) можно регулировать на уровне $\leq 2,5$ бар во время концентрации,

диафильтрации и сверхконцентрации. Контролируют температуру бака-накопителя на уровне $\leq 35^{\circ}\text{C}$.

После определения концентрации белка в сверхконцентрированном продукте голимумаба оставшийся продукт извлекают из системы с помощью промывки буфером, используя $\leq 100\%$ от расчетного количества диафильтрационного буфера, необходимого для разведения. После определения концентрации белка в объединенном восстановленном буферном растворе для промывки и концентрированном голимумабе концентрацию продукта дополнительно корректируют путем добавления $\leq 100\%$ расчетного количества диафильтрационного буферного раствора, необходимого для разведения. Контролируют выход, и он должен составлять $>90\%$.

Затем получают нерасфасованный продукт путем прибавления 1% PS 80 в 10 мМ гистидина, 4,5% сорбита, буфере с pH 5,3 к концентрированному и диафильтрованному продукту голимумаба в соотношении буфер к продукту 0,013-0,017% (мас./об.). После добавления продукт голимумаба перемешивают для обеспечения гомогенности раствора. Отбирают образцы нерасфасованного продукта для анализа бионагрузки и фильтруют с помощью предварительного фильтра, после чего фильтруют через фильтр 0,2 мкм в поликарбонатные контейнеры. Образцы продуктов отбирают для испытаний голимумаба на олигосахариды и выход нерасфасованного продукта. Композицию олигосахаридов анализируют с помощью нормально-фазовой анионообменной ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. До и/или после последней фильтрации через фильтр 0,2 мкм нерасфасованный продукт можно выдерживать при температуре 15-25 $^{\circ}\text{C}$ или при 2-8 $^{\circ}\text{C}$ в течение в общей сложности ≤ 120 ч перед хранением при $\leq -40^{\circ}\text{C}$.

Пример 6. Применение анализа перехода гамма-распределения (GDТА) для квалификации колонки для хроматографических колонок, используемых при изготовлении препарата SIMPONI $^{\circledR}$ (голимумаб).

В этом примере описано применение способа GDТА к хроматографическим колонкам при очистке в процессе изготовления антител к TNF, например антител к TNF- α SIMPONI $^{\circledR}$ (голимумаб), например, с помощью аффинной хроматографии на белке А на стадии 3, катионообменной хроматографии на стадии 6 и анионообменной хроматографии на стадии 7.

Стадия 3. Колонка для аффинной хроматографии на белке А.

Для стадии 3 при использовании колонки MabSelect $^{\text{TM}}$ для аффинной хроматографии на белке А включали проанализированные переходные фронты, например фронт элюирования (фиг. 40), фронт, образованный во время санации гуанидин гидрохлоридом (фиг. 41), и фронт, образованный во время промывания после санации 0,1 М цитратом натрия с pH 3,5 (фиг. 42). Показанные результаты представляют собой данные анализа 160 партий препарата SIMPONI $^{\circledR}$ (голимумаб). Предварительная оценка трендов показывает некоторое смещение, очевидное для производительности колонки, и некоторые различия, наблюдаемые между системами колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными о производительности колонки, будет завершен для установления контрольных пределов для применения в будущем применения способа GDТА для мониторинга процесса в режиме реального времени.

Стадия 6. Колонка для катионообменной хроматографии.

Для стадии 6 с использованием колонки UNOsphere S $^{\text{TM}}$ для катионообменной хроматографии включали проанализированные переходные фронты, например фронт, образованный во время введения материала, обработанного растворителем/детергентом (Р/Д) (фиг. 43), фронт, образованный во время элюирования (фиг. 44), и фронт, образованный во время снятия белка с колонки (фиг. 45). Показанные результаты представляют собой данные анализа 72 партий препарата SIMPONI $^{\circledR}$ (голимумаб). Предварительная оценка трендов показывает некоторое смещение, очевидное для производительности колонки, и некоторые различия, наблюдаемые между системами колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными о производительности колонки, будет завершен для установления контрольных пределов для применения в будущем применения способа GDТА для мониторинга процесса в режиме реального времени.

Стадия 7. Колонка для анионообменной хроматографии.

Для стадии 7 с использованием колонки Q Sepharose $^{\text{TM}}$ XL для анионообменной хроматографии включены проанализированные переходные фронты например фронт, образованный во время очистки гидроксидом натрия (фиг. 46), и фронт, образованный во время снятия белка с колонки (фиг. 47). Показанные результаты представляют собой данные анализа 71 партии препарата SIMPONI $^{\circledR}$ (голимумаб). Предварительная оценка трендов показывает некоторое смещение, очевидное для производительности колонки, и некоторые различия, наблюдаемые между системами колонок. Полный анализ этих данных, включая сравнение с другой доступной информацией о партии и данными о производительности колонки, будет завершен для установления контрольных пределов для применения в будущем применения способа GDТА для мониторинга процесса в режиме реального времени.

Хотя предпочтительные варианты осуществления изображены и описаны подробно в данном документе, специалистам в соответствующей области техники будет очевидно, что различные модификации, дополнения, замены и тому подобное 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 эксплуатации хроматографической колонки в способах производства для получения антител к TNF, причем антитела к TNF содержат тяжелую цепь (ТЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (ЛЦ), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или их антигенсвязывающих фрагментов, при этом указанный способ включает

регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы во время первой операции хроматографической колонки, содержащей насадку колонки;

определение модельной кумулятивной кривой гамма-распределения на основании зарегистрированного выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы Ia для переднего переходного фронта или формулы Ib для заднего переходного фронта:

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

или

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

где C - выходной сигнал колонки для заданного V;

V представляет собой суммарный поток, деленный на объем колонки;

k, θ и V_i представляют собой параметры формы, масштаба и смещения, используемые для образования кривой;

расчет значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) по меньшей мере для одного переходного фронта подвижной фазы с использованием формулы II и параметров кумулятивной кривой гамма-распределения k, θ и V_i :

$$\text{ВЭТТ} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L$$

Формула II

где $\mu = k\theta + V_i$;

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

L = длина колонки; и

оценку качества насадки хроматографической колонки на основе указанного рассчитанного значения ВЭТТ.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий кондиционирование, замену или повторное наполнение хроматографической колонки на основании указанной оценки.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий

регистрацию выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока через два или более интервала для соответствующего переходного фронта подвижной фазы во время одного или более последующих применений насадки хроматографической колонки;

выполнение указанного определения и указанного вычисления с помощью выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока, зарегистрированных во время каждого из одного или более последующих применений насадки хроматографической колонки;

определение значения ВЭТТ насадки хроматографической колонки во время каждого из указанных одного или более последующих применений на основании указанного исполнения;

составление тренда определенных значений ВЭТТ насадки хроматографической колонки для двух или более последующих применений;

определение изменения качества насадки хроматографической колонки на основании указанного составленного тренда, причем указанное кондиционирование, замена или повторное наполнение хроматографической колонки основано на указанном определении.

4. Способ по п.3, где увеличение значения ВЭТТ насадки хроматографической колонки в одном или более последующих применениях указанной насадки колонки по сравнению со значением ВЭТТ насадки хроматографической колонки в одном или более ранних применениях указанной насадки колонки определяет снижение качества насадки хроматографической колонки.

5. Способ по п.1, где регистрируют выходной сигнал колонки и параметры суммарного потока для двух или более различных фронтов перехода подвижной фазы во время указанной первой операции наполнения колонки, причем указанный способ включает

выполнение указанного определения и вычисления с помощью выходного сигнала колонки и параметров суммарного потока, регистрируемых для каждого из двух или более различных фронтов перехода подвижной фазы независимо для вычисления значения ВЭТТ для каждого из двух или более различных фронтов перехода подвижной фазы;

оценку качества насадки хроматографической колонки на основе двух или более рассчитанных значений ВЭТТ, при этом указанное кондиционирование, замена или повторное наполнение хроматографи-

ческой колонки зависят от указанной оценки.

6. Способ по любому из пп.1-5, где хроматографическую колонку выбирают из группы, состоящей из колонки для аффинной хроматографии на белке А, колонки для катионообменной хроматографии и колонки для анионообменной хроматографии.

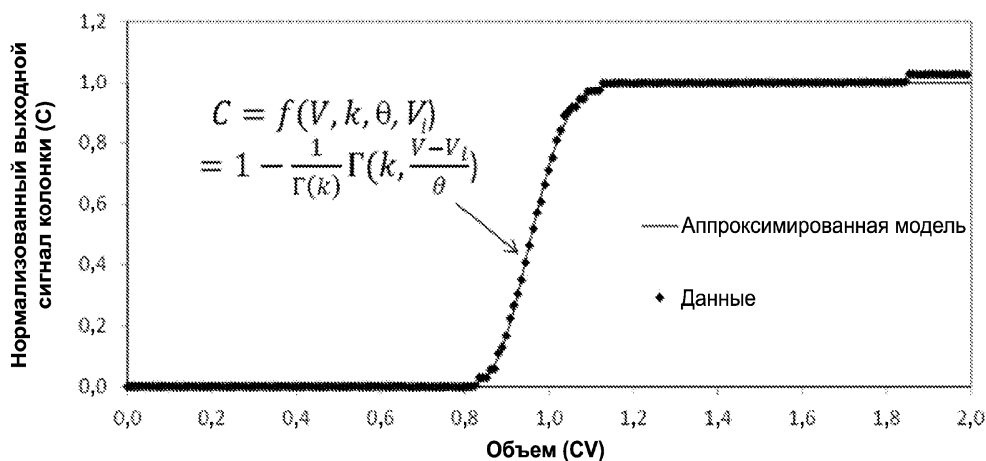
7. Способ по п.6, где колонка для аффинной хроматографии на белке А содержит колонку А MabSelect™ для аффинной хроматографии на белке, колонка для катионообменной хроматографии содержит колонку UNOsphere S™ для катионообменной хроматографии, а колонка для анионообменной хроматографии содержит колонку Q Sepharose™ XL для анионообменной хроматографии.

8. Способ по п.6, где переходный фронт подвижной фазы в колонке для аффинной хроматографии на белке А образуется из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образующегося при элюировании антител к TNF, фронта, образующегося при санации колонки гуанидин гидрохлоридом, фронта, образующегося при промывке колонки после санации 0,1 М цитрата натрия с рН 3,5.

9. Способ по п.6, где переходный фронт подвижной фазы в колонке для катионообменной хроматографии образуется из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образующегося при загрузке обработанного растворителем/детергентом (Р/Д) материала, содержащего антитела к TNF, фронта, образующегося при элюировании антител к TNF, и фронта, образующегося в течение снятия белка с колонки.

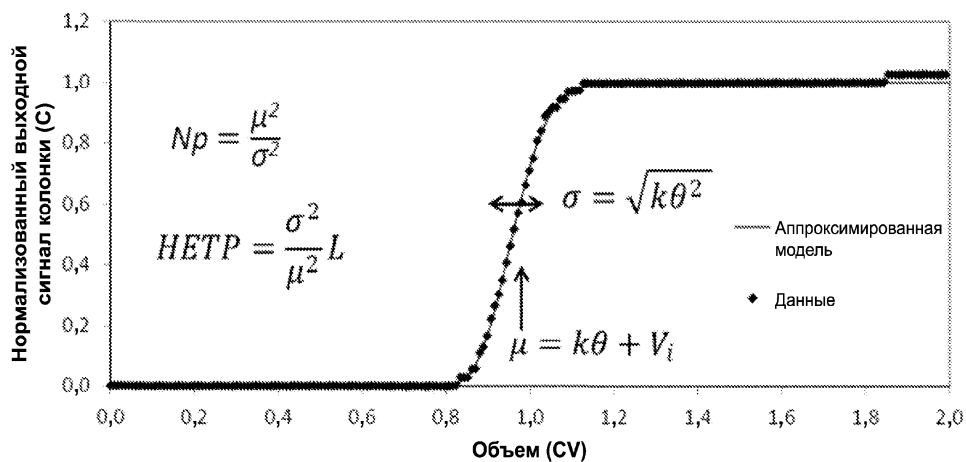
10. Способ по п.6, где переходный фронт подвижной фазы в колонке для анионообменной хроматографии образуется из одного или более фронтов, выбранных из группы, состоящей из фронта, образующегося в процессе очистки колонки гидроксидом натрия, и фронта, образующегося в ходе снятия белка с колонки.

Фронтальный анализ – колонка ПСП (промывка)

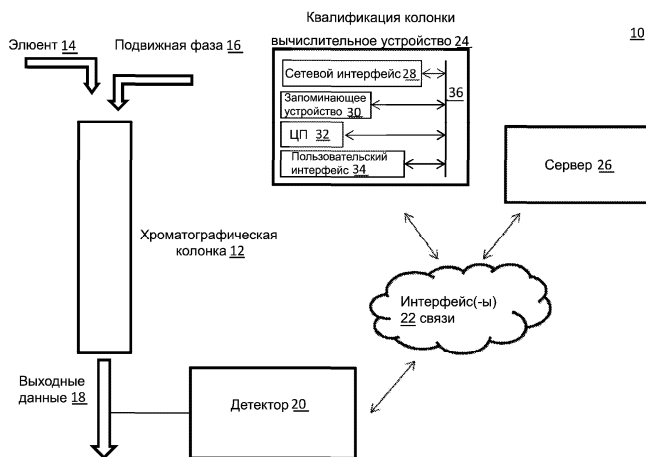


Фиг. 1А

Фронтальный анализ – колонка ПСП (промывка)

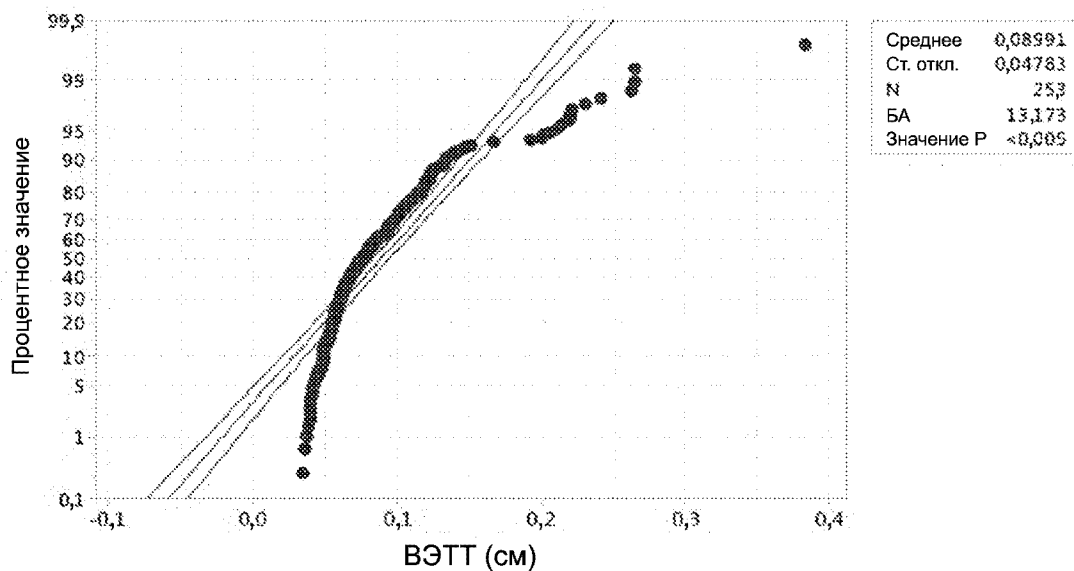


Фиг. 1В



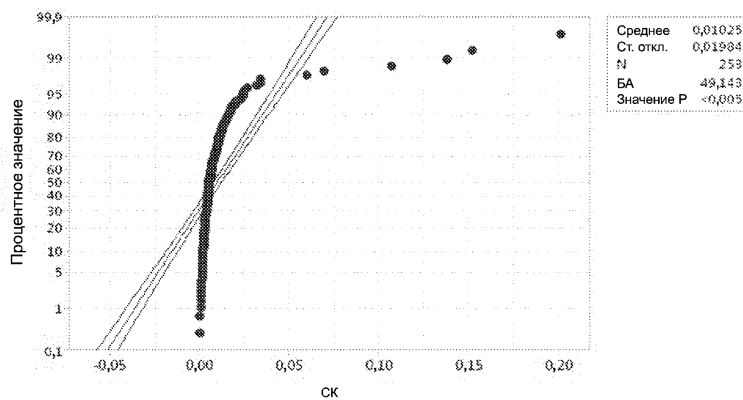
Фиг. 2

График плотности вероятности ВЭТТ для уравнивания – ПСП
Нормальное — ДИ 95%



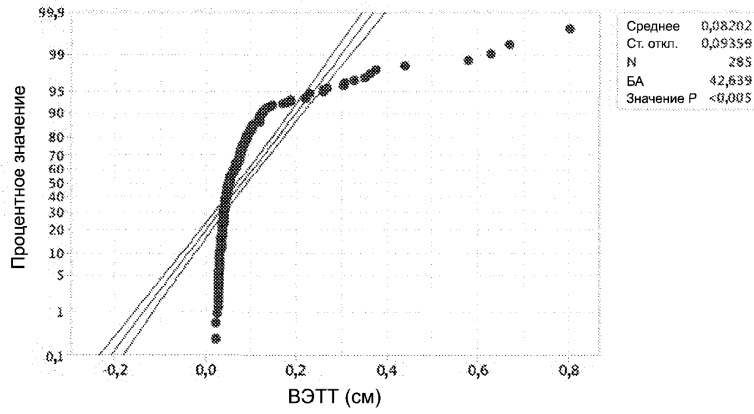
Фиг. 3

График плотности вероятности СК для уравнивания – ПСП.
Нормальное — ДИ 95%



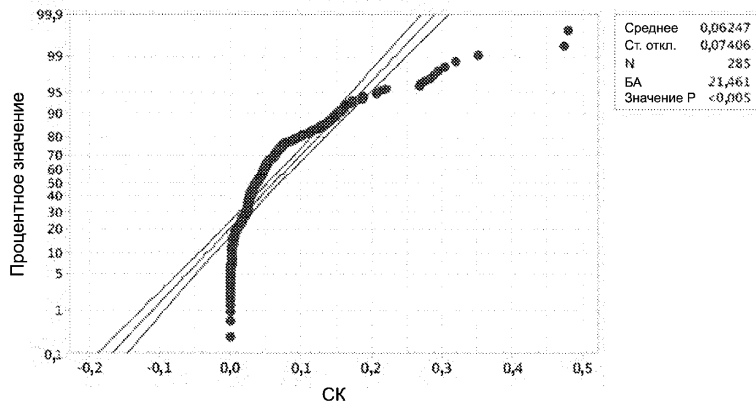
Фиг. 4

График плотности вероятности ВЭТТ для промывки – ПСП
 Нормальное — ДИ 95%



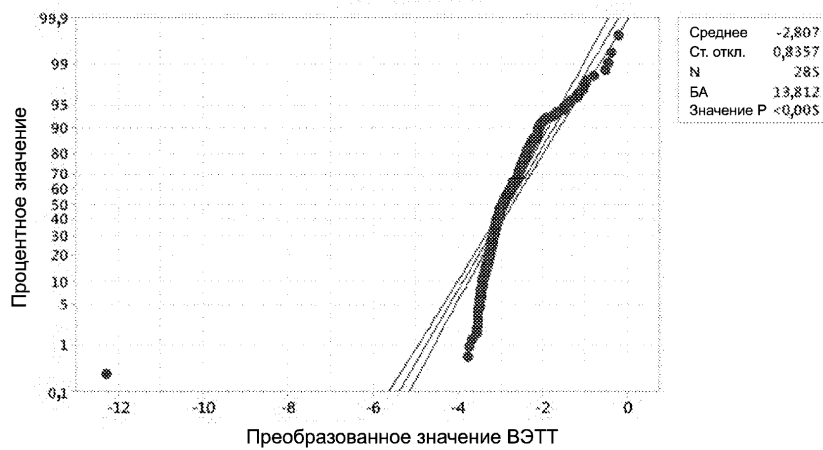
Фиг. 5

График плотности вероятности СК для промывки – ПСП
 Нормальное — ДИ 95%



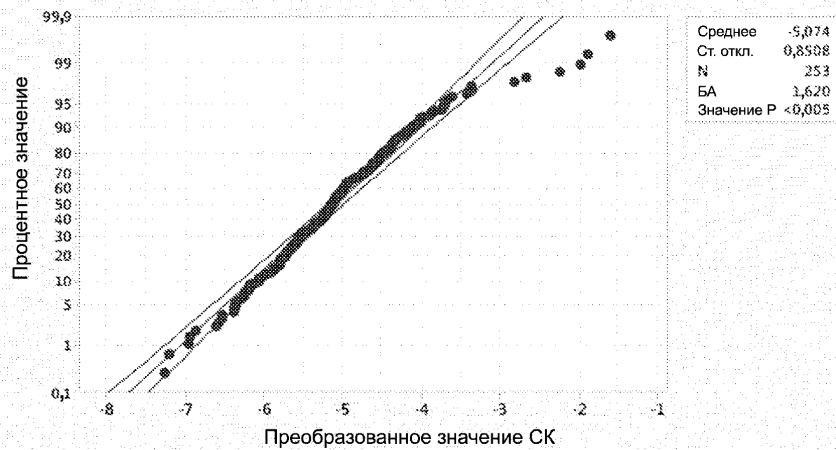
Фиг. 6

График плотности вероятности преобразованного значения ВЭТТ для уравнивания – ПСП
 Нормальное — ДИ 95%



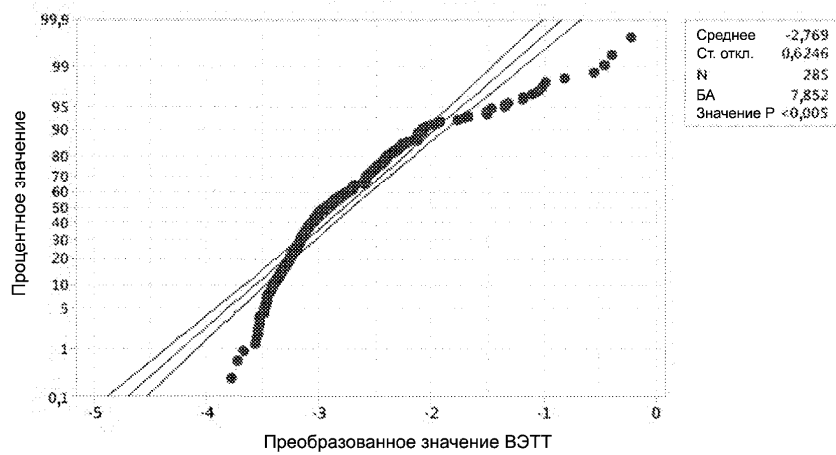
Фиг. 7

График плотности вероятности преобразованного значения СК для уравнивания – ПСП.
Нормальное — ДИ 95%



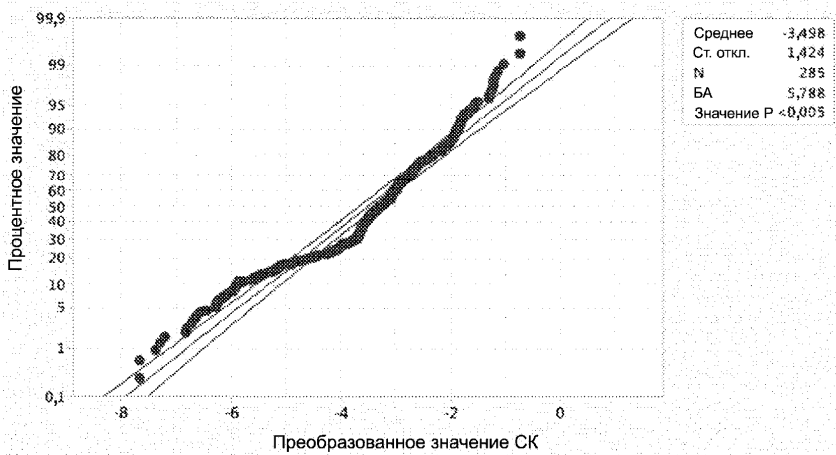
Фиг. 8

График плотности вероятности преобразованного значения ВЭТТ для промывки – ПСП
Нормальное — ДИ 95%

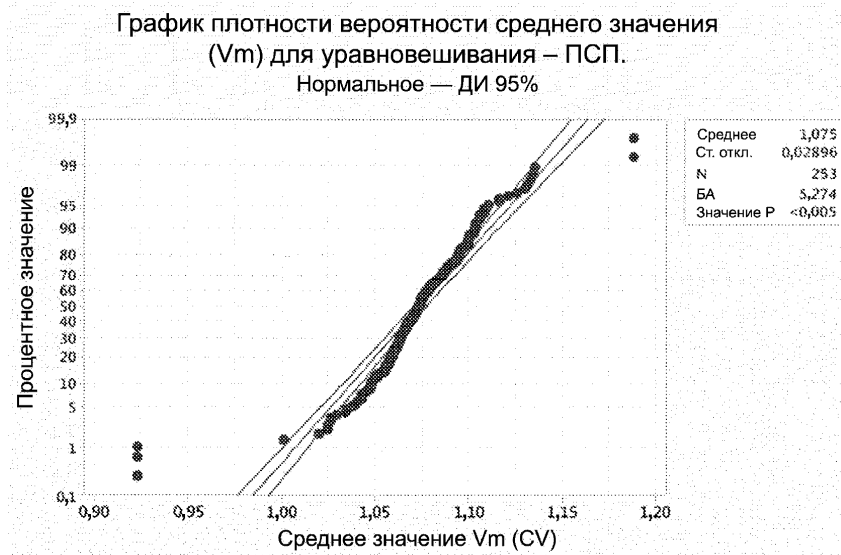


Фиг. 9

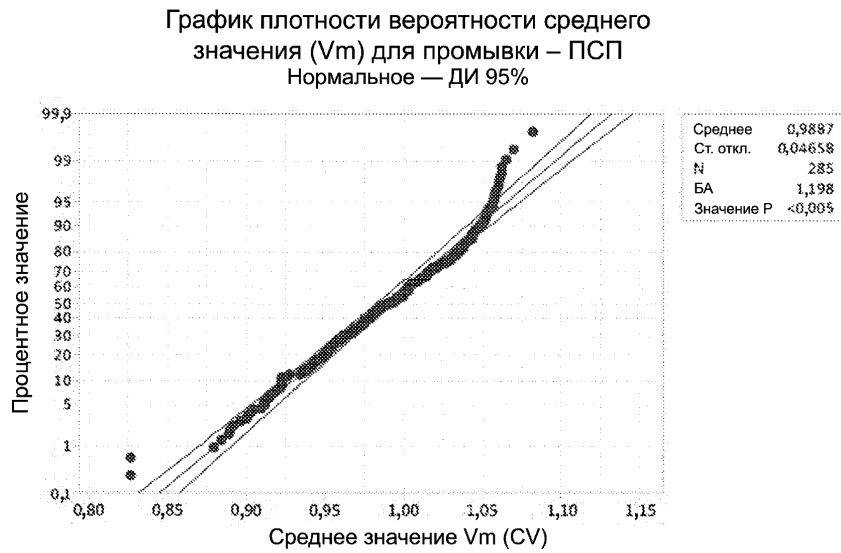
График плотности вероятности преобразованного значения СК для промывки – ПСП
Нормальное — ДИ 95%



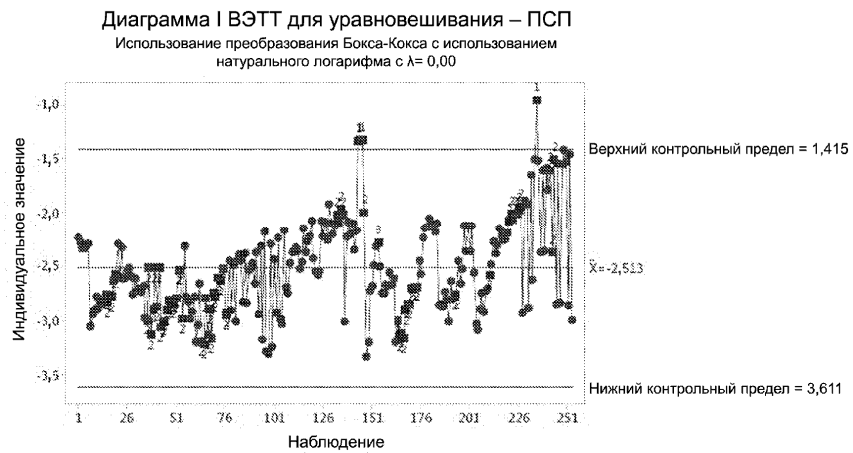
Фиг. 10



Фиг. 11

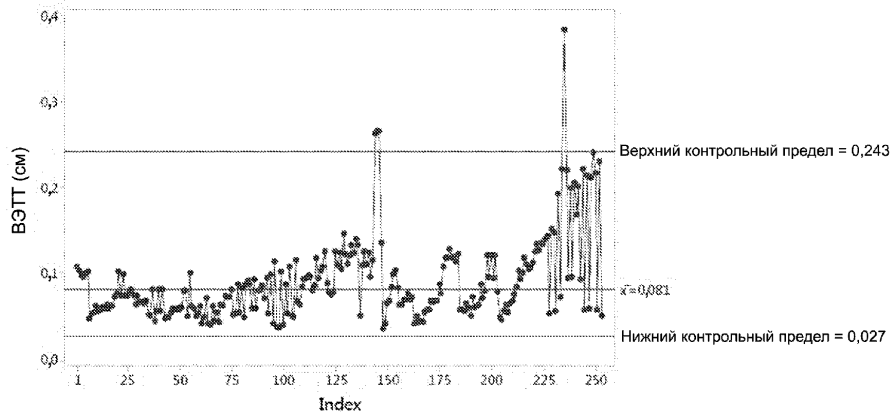


Фиг. 12



Фиг. 13

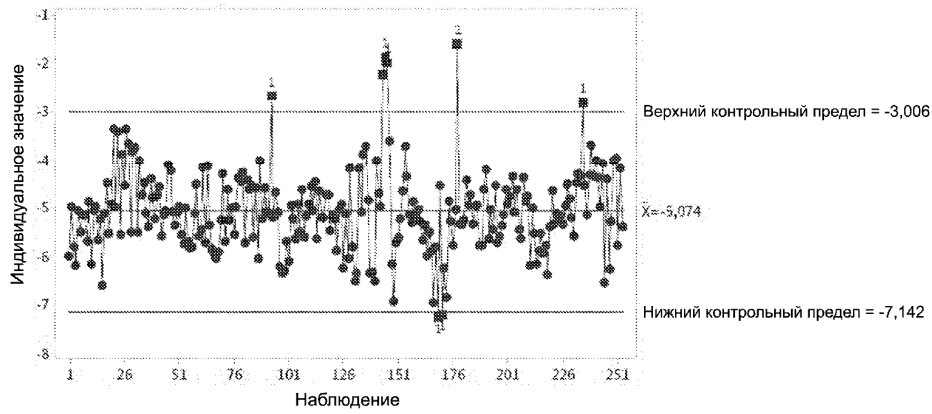
График временных рядов ВЭТТ для уравнивания – ПСП



Фиг. 14

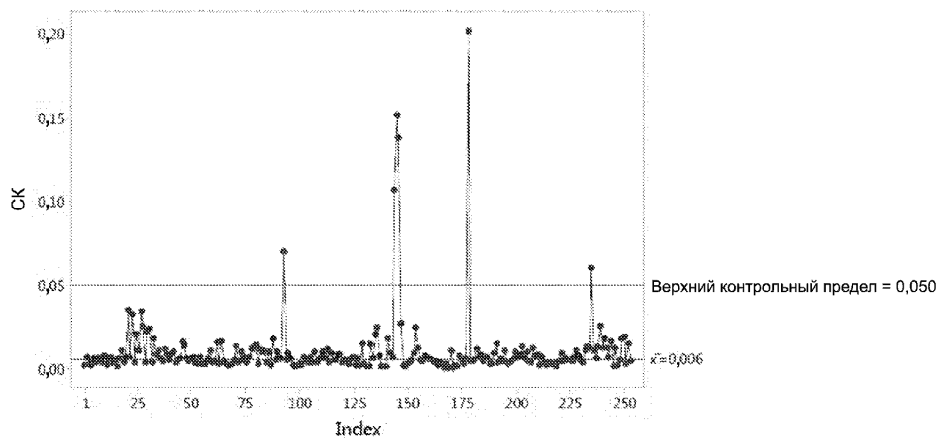
Диаграмма I СК для уравнивания – ПСП

Использование преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма с $\lambda=0,00$



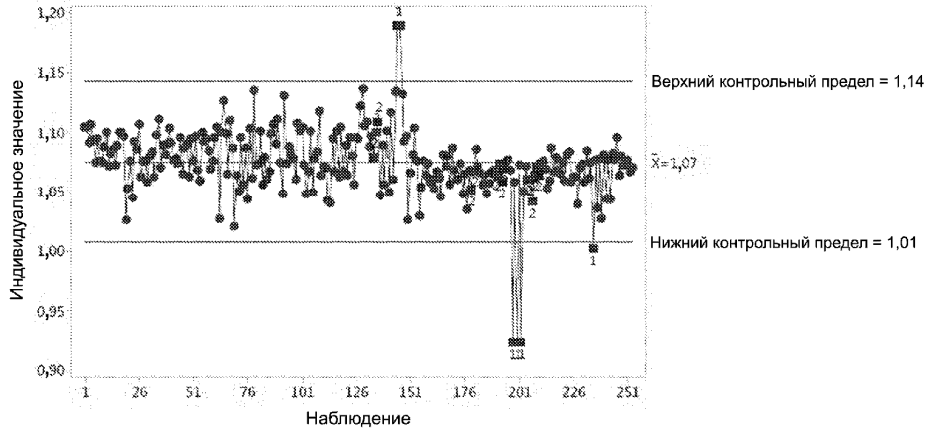
Фиг. 15

График временных рядов СК для уравнивания – ПСП



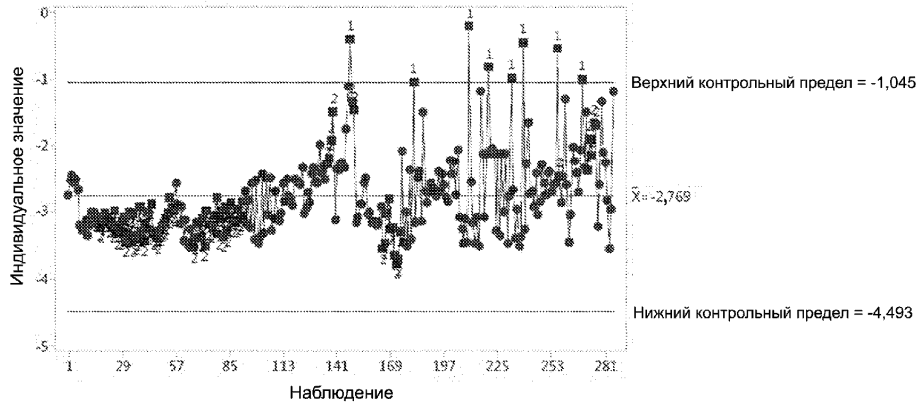
Фиг. 16

Диаграмма I среднего значения (V_m) для уравнивания – ПСП



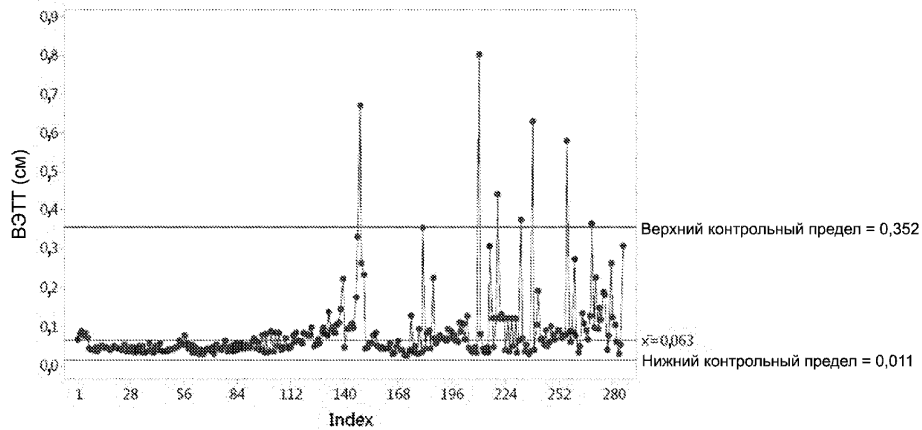
Фиг. 17

Диаграмма I ВЭТТ для промывки – ПСП
 Использование преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма с $\lambda = 0,00$



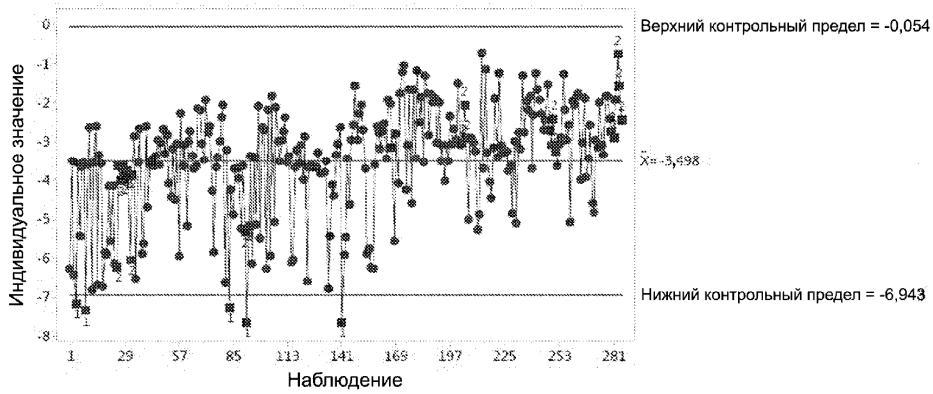
Фиг. 18

График временных рядов ВЭТТ для промывки – ПСП



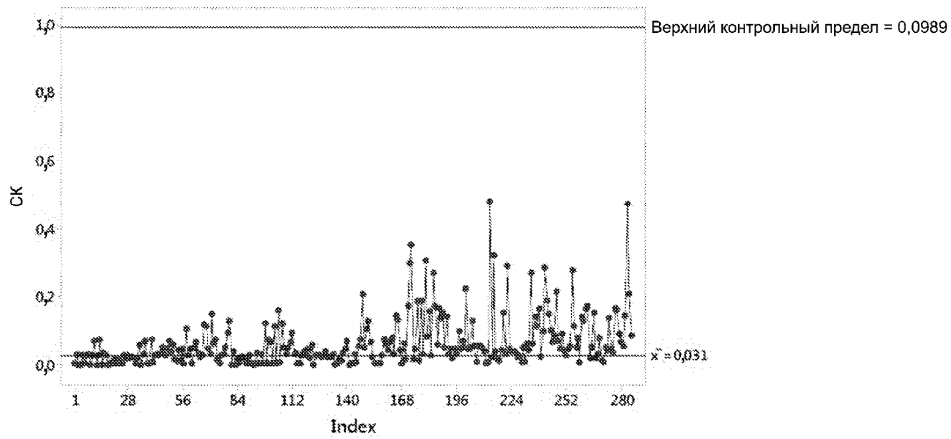
Фиг. 19

Диаграмма I СК для промывки – ПСП
Использование преобразования Бокса-Кокса с использованием натурального логарифма с $\lambda = 0,00$



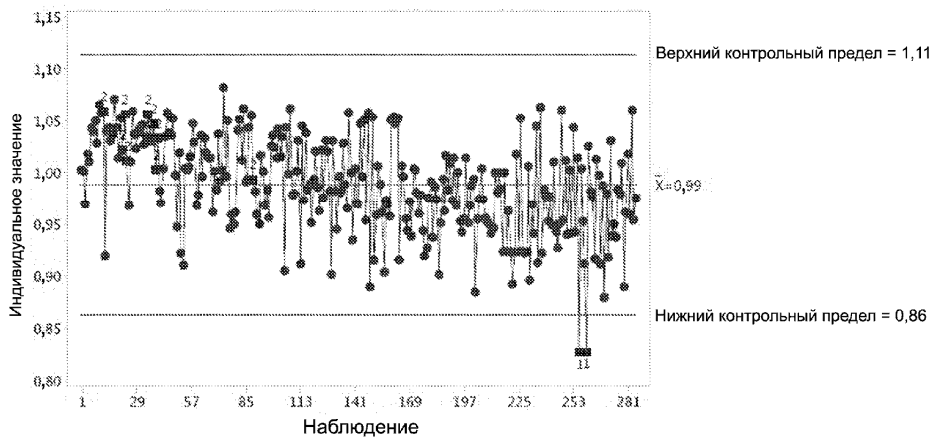
Фиг. 20

График временных рядов СК для промывки – ПСП



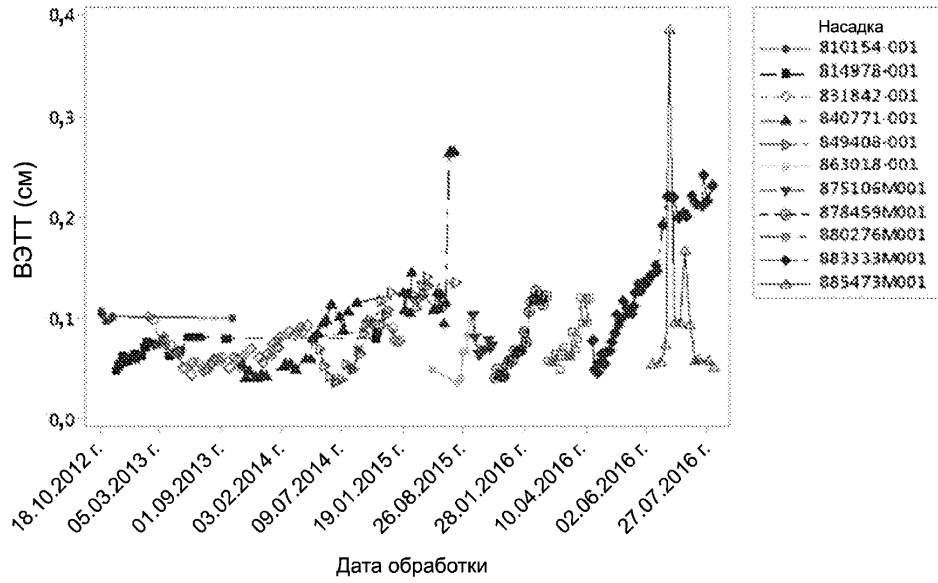
Фиг. 21

Диаграмма I среднего значения (Vm) для промывки – ПСП



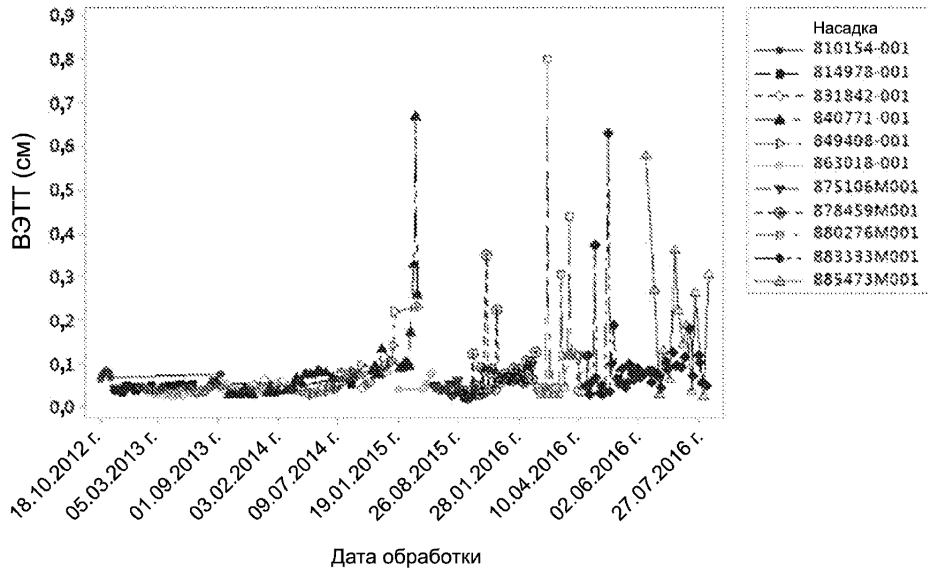
Фиг. 22

График временных рядов ВЭТТ для уравнивания – ПСП.



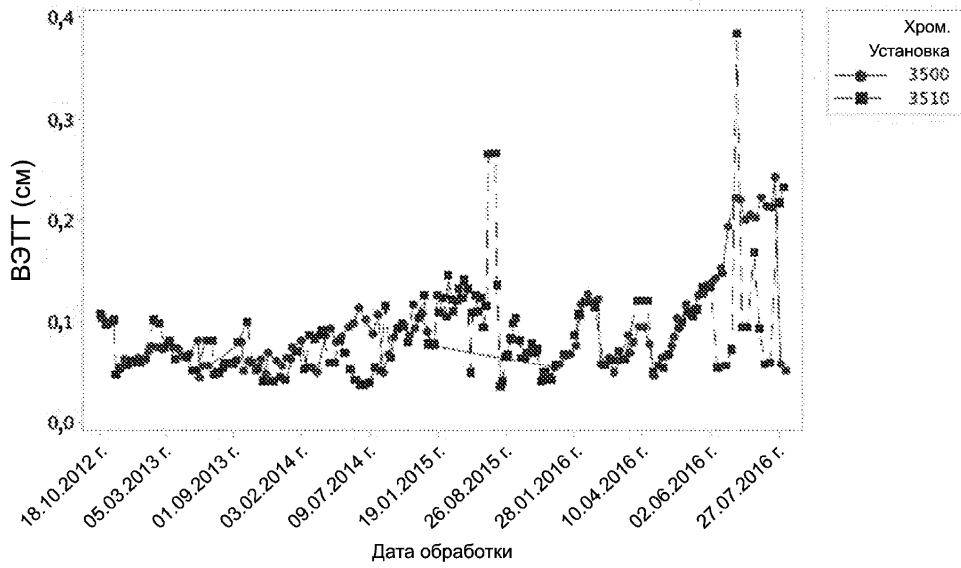
Фиг. 23

График временных рядов ВЭТТ для промывки – ПСП



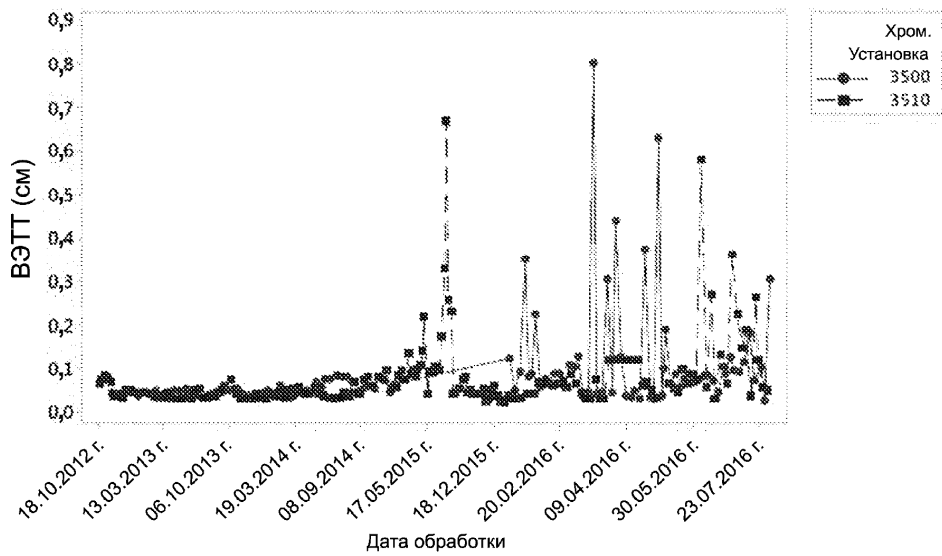
Фиг. 24

График временных рядов ВЭТТ для уравнивания – ПСП



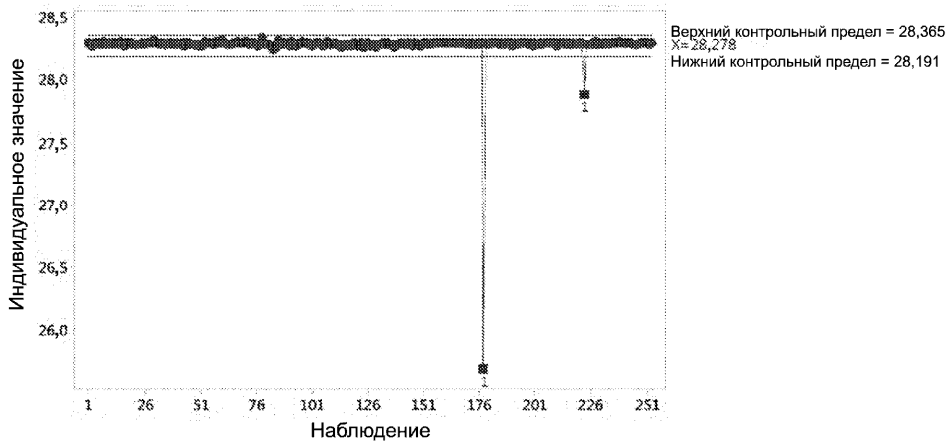
Фиг. 25

График временных рядов ВЭТТ для промывки – ПСП



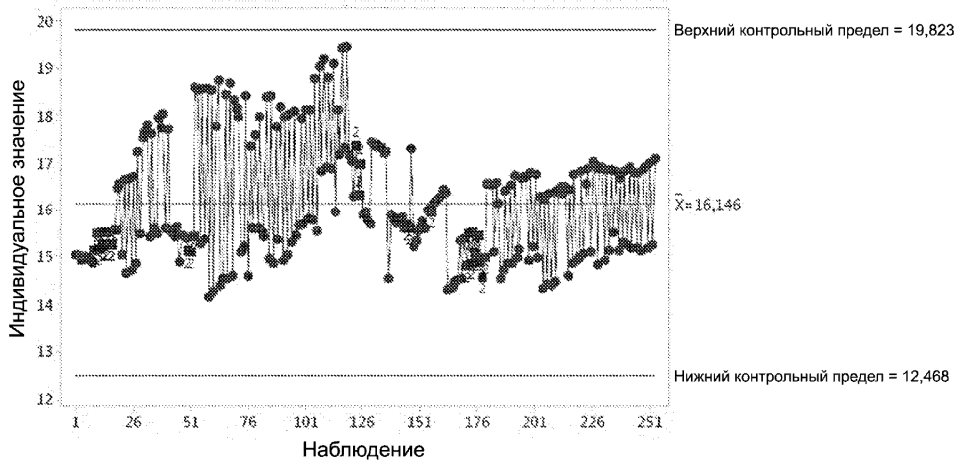
Фиг. 26

Диаграмма I среднего потока для уравнивания – ПСП



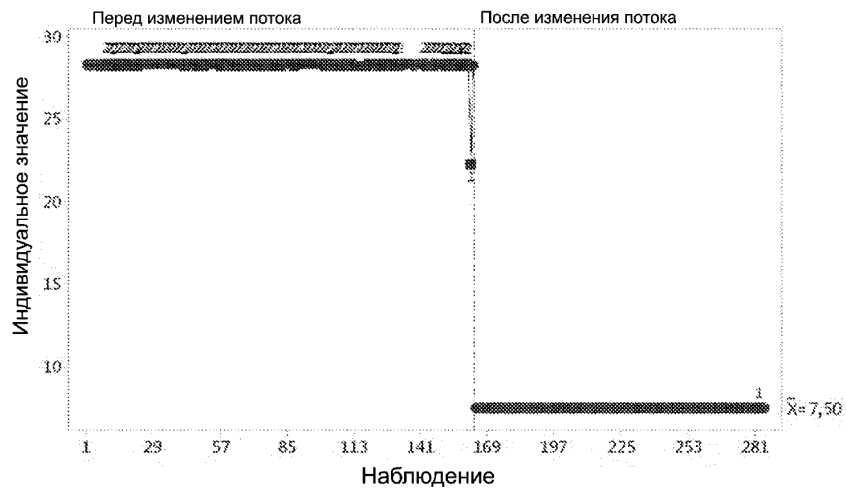
Фиг. 27

Диаграмма I среднего давления для уравнивания – ПСП



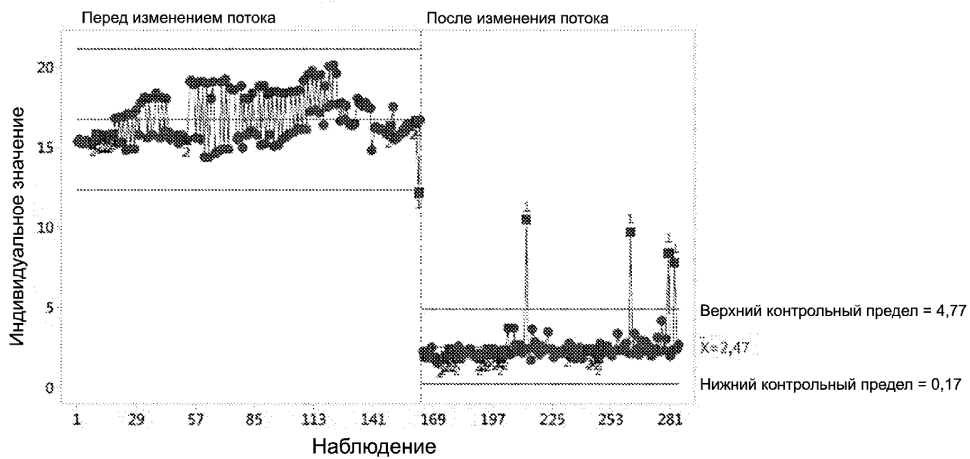
Фиг. 28

Диаграмма I среднего потока для промывки – ПСП



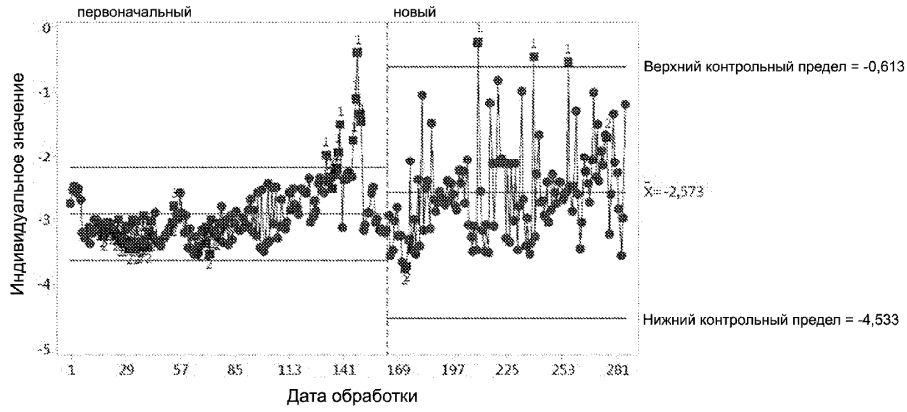
Фиг. 29

Диаграмма I среднего давления для промывки – ПСП



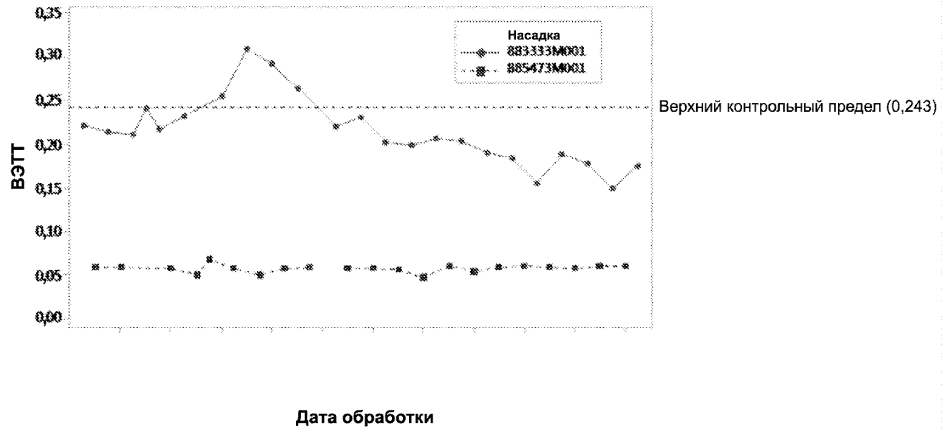
Фиг. 30

Диаграмма I ВЭТТ первоначального потока по сравнению с новым
Использование преобразования Бокса-Кокса с
использованием натурального логарифма с $\lambda = 0,00$



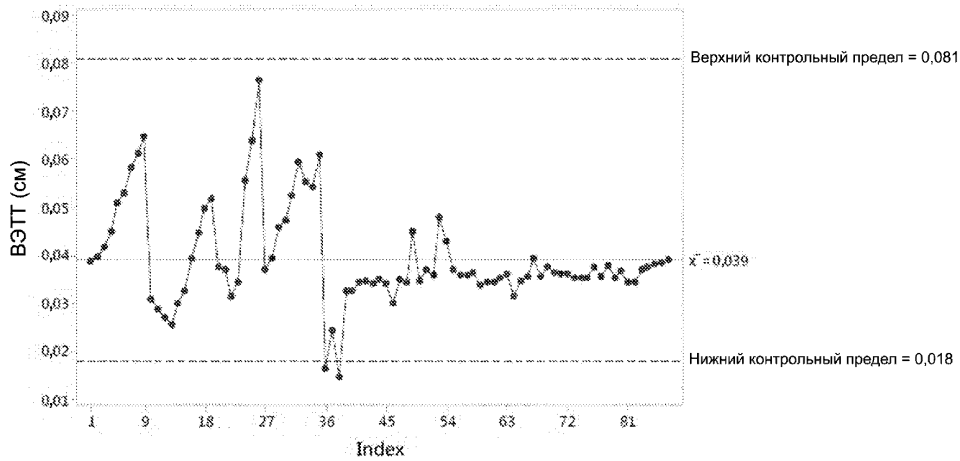
Фиг. 31

График временных рядов ВЭТТ для уравнивания – ПСП



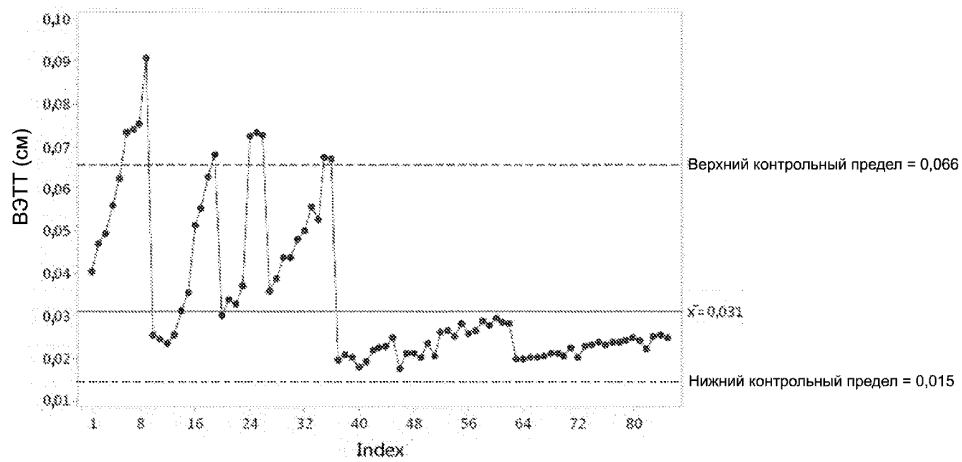
Фиг. 32

График временных рядов ВЭТТ для уравнивания – S



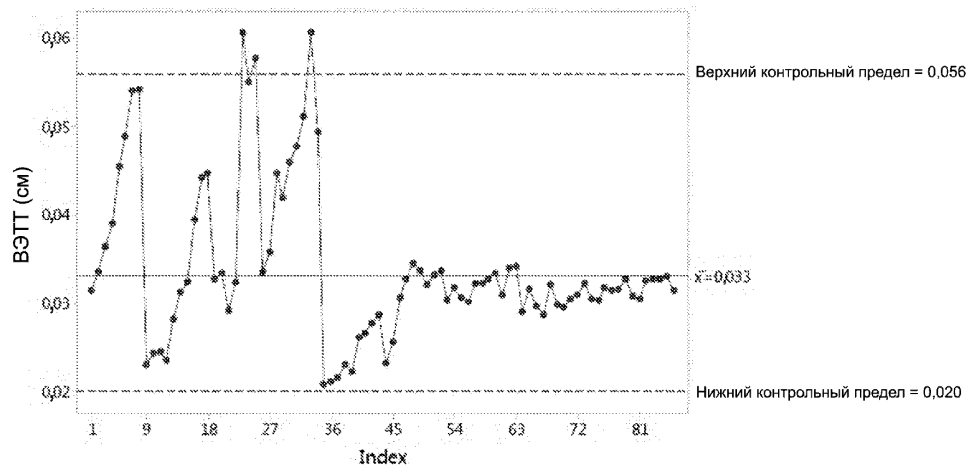
Фиг. 33

График временных рядов ВЭТТ для промывки водой для инъекций – S



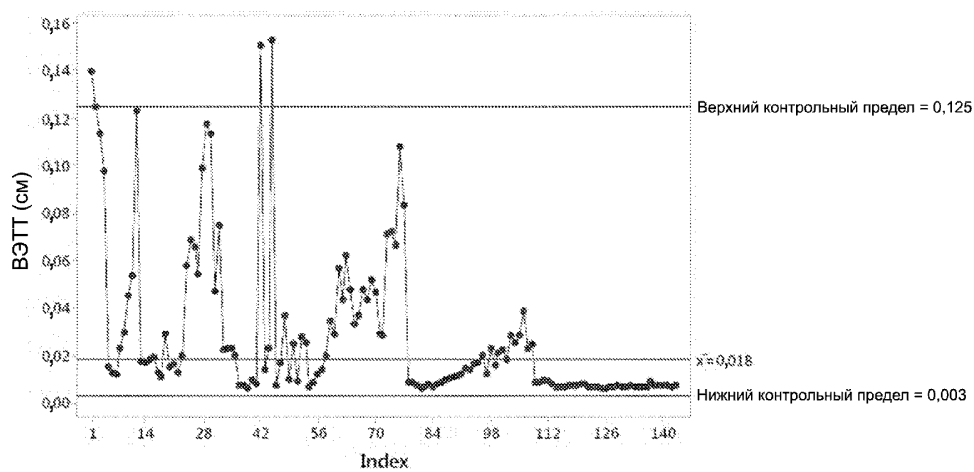
Фиг. 34

График временных рядов ВЭТТ для консервации – S



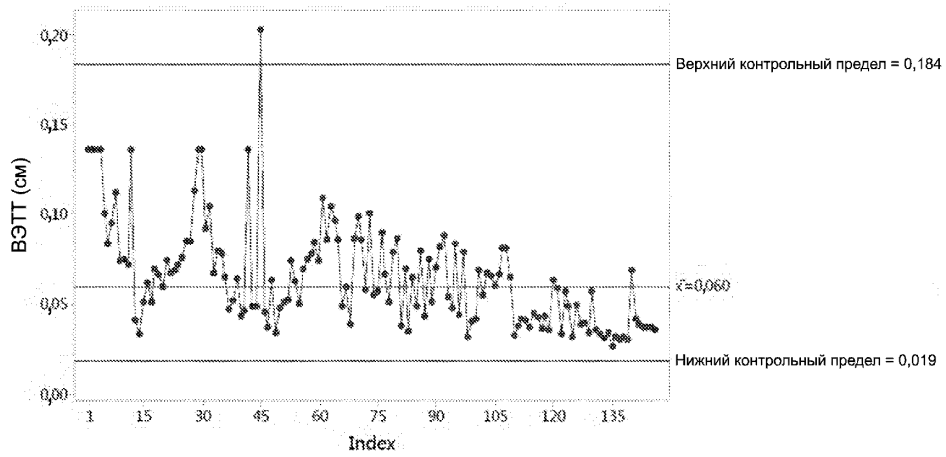
Фиг. 35

График временных рядов ВЭТТ для уравнивания Q2



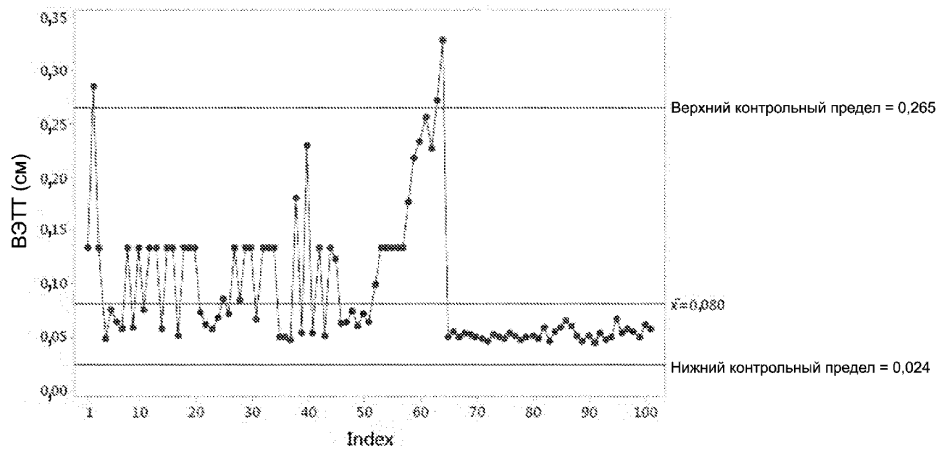
Фиг. 36

График временных рядов ВЭТТ для снятия белка с колонки Q2



Фиг. 37

График временных рядов ВЭТТ для сохранения Q2



Фиг. 38

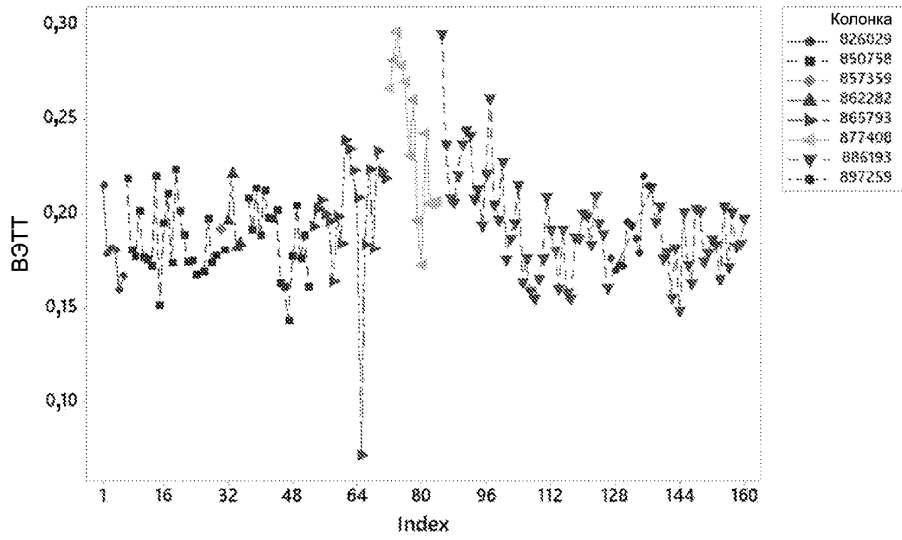
Обзор процесса изготовления — стадии процесса

Стадии процесса



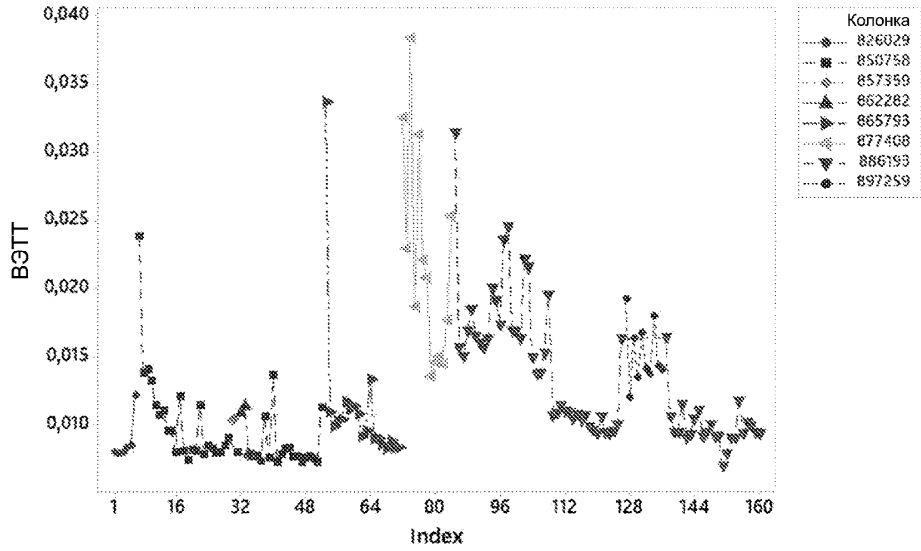
Фиг. 39

Элюирование ПСП – ВЭТТ



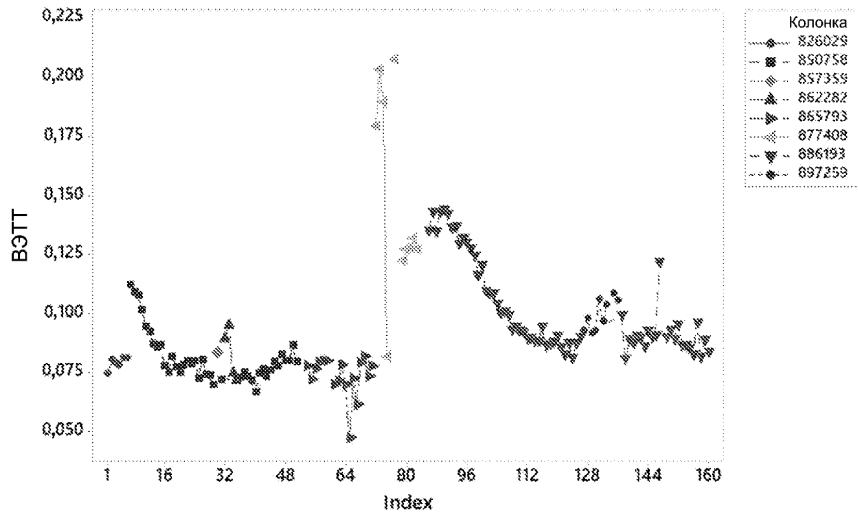
Фиг. 40

Промывка гуанидином ПСП – ВЭТТ



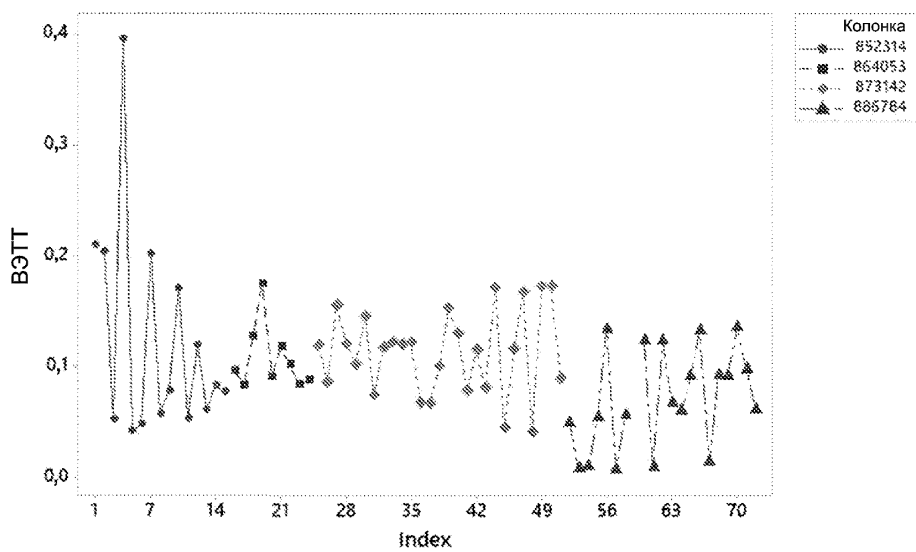
Фиг. 41

Промывка цитратом ПСП – ВЭТТ



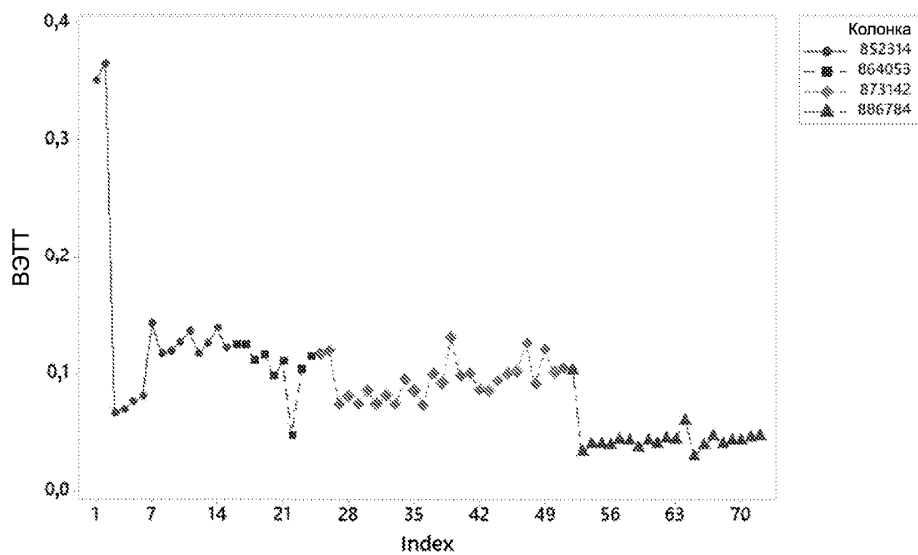
Фиг. 42

Загрузка на этапе PS1 ВЭТТ



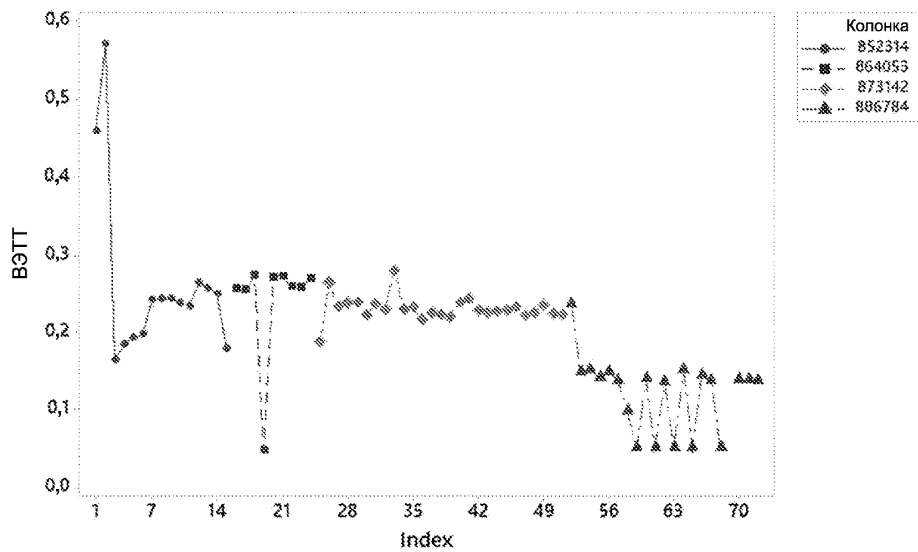
Фиг. 43

Элюирование на этапе PS1 – ВЭТТ



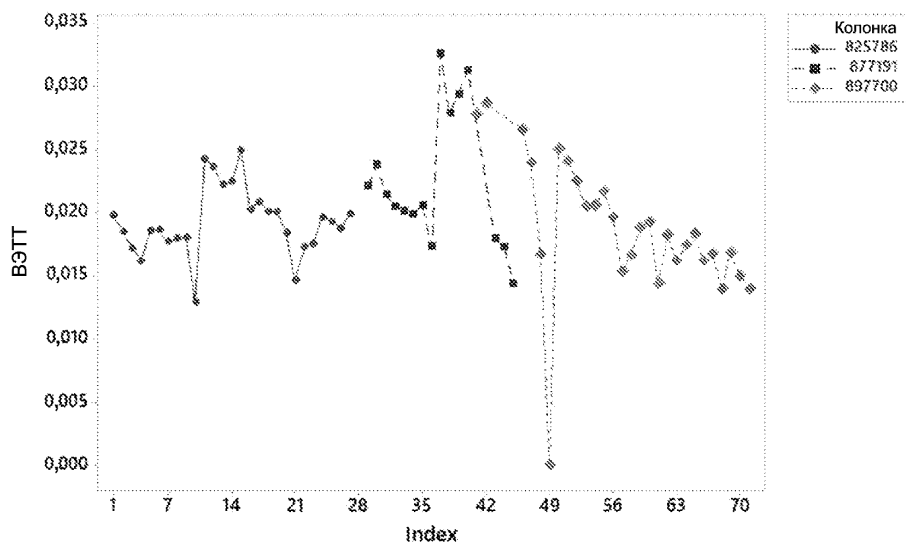
Фиг. 44

Снятие белка на этапе PS1 – ВЭТТ

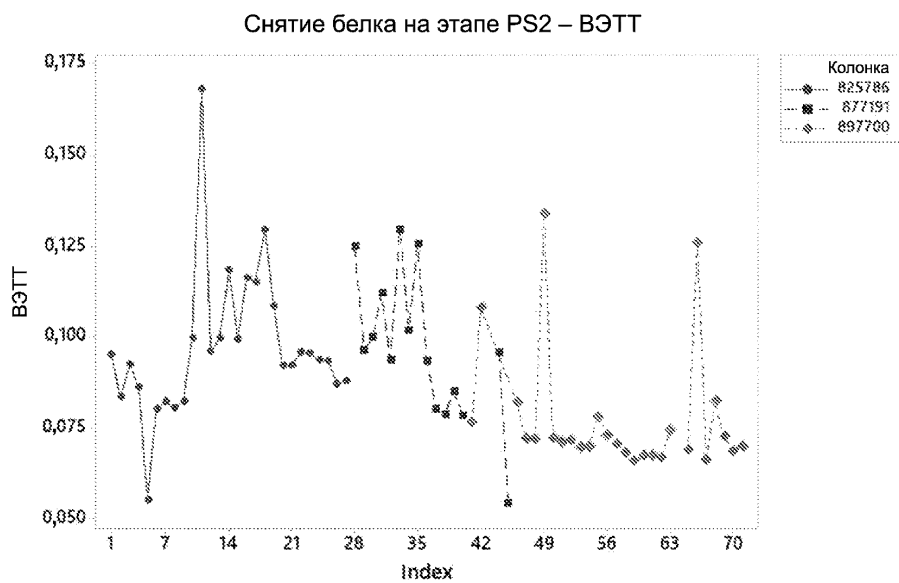


Фиг. 45

Промывка NaOH на этапе PS2 – ВЭТТ



Фиг. 46



Фиг. 47

