

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 914 987**

51 Int. Cl.:

G01N 30/86 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

G01N 30/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2019 PCT/US2019/028332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2019 WO19204734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2019 E 19722993 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2022 EP 3781943**

54 Título: **Calificación de columnas de cromatografía en métodos de fabricación para producir composiciones de anticuerpos anti-IL12/IL23**

30 Prioridad:

20.04.2018 US 201862660340 P

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

20.06.2022

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

RANDOLPH, PAUL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 914 987 T3

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

DESCRIPCIÓN

Calificación de columnas de cromatografía en métodos de fabricación para producir composiciones de anticuerpos anti-IL12/IL23

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de calificación de columnas de cromatografía en métodos de fabricación para producir anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 STELARA® (ustekinumab), composiciones farmacéuticas específicas de los anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La cromatografía en columna es una técnica importante usada en procesos de purificación para producir proteínas terapéuticas. El rendimiento de las columnas debe mantenerse a medida que el proceso se amplía a escala desde el banco de pruebas hasta las plantas de fabricación y durante toda la vida útil de la columna. Pueden surgir dificultades en los procedimientos de evaluación de las columnas, posibles cambios en la integridad de los lechos compactados y la logística a medida que aumenta el diámetro de la columna, el equipo y el consumo de tampón para ampliar a escalar el proceso.

15

20

Un método actual para la calificación de columnas de cromatografía calcula la altura equivalente a placas teóricas (HETP), una medida de dispersión después de una inyección de pulso, estimando la media del pico máximo y la desviación estándar de la anchura del pico a la mitad de la altura. La principal limitación de este método es que no proporciona una medida precisa de la dispersión (es decir, HETP) cuando la forma del pico se desvía de una distribución gaussiana. Para compensar la falta de sensibilidad, se utiliza una segunda medición, la asimetría, para evaluar la asimetría de los picos. Esta medida compara la anchura del pico anterior y posterior al 10% de la altura máxima del pico. Las limitaciones de este enfoque dan como resultado una falta de sensibilidad a los cambios en el rendimiento de la columna y, a menudo, dan como resultado el recompactación o el acondicionamiento de una columna, mientras que el rendimiento de la columna es realmente aceptable. Se ha informado de otras estrategias para la calificación de columnas. Estas estrategias incluyen el uso de distribuciones gaussianas o no gaussianas para modelar transiciones de procesos (ver, por ejemplo, Larson, et al., "Use of Process Data to Assess Chromatographic Performance in Production-Scale Protein Purification Columns", Biotechnol. Prog. 19:485-492 (2003) y las Patentes de Estados Unidos N°: 9.047.438 de Belousov et al, y 8.410.928 de Ganguly). Los enfoques gaussianos tienen las mismas limitaciones de sensibilidad que las indicadas anteriormente para el método de inyección y los enfoques no gaussianos informados requieren cálculos complejos.

25

30

35

Se necesita un procedimiento de calificación mejorado con una mayor sensibilidad y límites definidos más racionalmente para monitorizar los cambios en el rendimiento de la columna de cromatografía durante el funcionamiento repetido y evaluar la eficacia con la que funcionará la columna durante su vida útil. La presente invención está dirigida a superar esta deficiencia en la técnica.

40

La WO 2018/024770 A1 describe la producción de ustekinumab biosimilar en células CHO.

SUMARIO DE LA INVENCION

45

La invención proporciona un método para manejar una columna de cromatografía en métodos de fabricación para producir anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, composiciones farmacéuticas específicas de los anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en donde los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40 comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de: una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (ii) una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8; y (iii) secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena pesada de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO:3, y secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena ligera de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y SEQ ID NO:6, dicho método comprendiendo:

50

55

recoger la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende compactación de columna;

determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida de columna y parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula Ia para una parte delantera de transición ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente,

60

65

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

o

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

en donde C es la señal de salida de la columna para un V dado, V es el flujo acumulado dividido por el volumen de la columna, y k, θ , y V_i son los parámetros de forma, escala e inclinación usados para definir la curva; calcular un valor de placa teórica equivalente de altura (HETP) para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II y los parámetros de curva de distribución acumulativos gamma del modelo de k, θ , y V_i ,

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

Formula II

en donde

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

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

L = longitud de la columna; y evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicho valor de HETP calculado.

Las realizaciones de la invención están definidas, respectivamente, por las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Otras realizaciones, características y ventajas de los varios aspectos de la invención son evidentes a partir de la descripción detallada que sigue tomada junto con las figuras de los dibujos adjuntos.

La presente invención proporciona un método para manejar una columna de cromatografía en métodos de fabricación para producir anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, composiciones farmacéuticas específicas de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en donde los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40 comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de: (i) una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera (LC) que comprende el aminoácido secuencia de la SEQ ID NO: 11; (ii) una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 8; y (iii) secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6. Este método implica recopilar la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende la compactación de la columna. Este método implica además determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula Ia para una parte delantera de transición ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente.

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

o

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

en donde C es la señal de salida de la columna para una V dada, V es el flujo acumulado dividido por el volumen de

la columna, y k , θ , y V_i son los parámetros de forma, escala e inclinación usados para definir la curva. el valor de placa teórico equivalente de altura (HETP) se calcula para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II y los parámetros de curva de distribución acumulativos gamma del modelo de k , θ , y V_i ,

5

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

Formula II

10 donde

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

15

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

L = longitud de la columna

20 La calidad de la compactación de la columna de cromatografía se evalúa en base al valor de HETP calculado. En base a esta evaluación, la columna de cromatografía se reutiliza, acondiciona, reemplaza o vuelve a compactarse.

25 Se ha desarrollado un nuevo método para evaluar la integridad de la columna, denominado Análisis de Transición de Distribución Gamma (GDTA). El nuevo método usa un modelo matemático para ajustar una curva a través de los datos de la parte delantera de transición de fase móvil que se generan durante los pasos regulares del proceso de operación de la columna. Luego, se utilizan los parámetros de la curva del modelo para calcular la dispersión a lo largo del lecho de la columna como medida de la calidad de la columna. Las partes delanteras de dispersión de fase móvil surgen de pasos discretos dentro del proceso de purificación por cromatografía donde se usan tampones de proceso/soluciones de lavado con diferentes propiedades, como conductividad, pH y/o componentes tampón. El método generalmente puede aplicarse a una o más partes delanteras de transición de fase móvil generadas durante el procesamiento normal de la columna.

35 Una ventaja principal del método GDTA es que proporciona un calibrador de dispersión más sensible a lo largo del lecho de la columna que el método de estimación HETP gaussiano. Al usar GDTA, ya no es necesario medir la asimetría, ya que el modelo GDTA mide correctamente la dispersión del ajuste de la curva. Además, el uso de la función de distribución gamma facilita el análisis de las transiciones frontales en comparación con los métodos no gaussianos alternativos de los que se ha informado anteriormente. El uso de transiciones de fase móvil ya presentes en un proceso de cromatografía evita la necesidad de pasos de procesamiento adicionales fuera de línea. Además, en muchos casos, los datos históricos permiten establecer rangos históricos de eficiencia de columna antes de la implementación. Finalmente, el método GDTA puede automatizarse para asegurar una aplicación consistente.

45 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para manejar una columna de cromatografía en métodos de fabricación para producir anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, composiciones farmacéuticas específicas de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en donde los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40 comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de: (i) una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (ii) una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 8; y (iii) secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6, dicho método comprendiendo:

55 recoger la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende compactación de columna;

60 determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida de columna y parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula Ia para una parte delantera de transición ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente,

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

Formula Ia

65

o

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

en donde C es la señal de salida de la columna para un V dado, V es el flujo acumulado dividido por el volumen de la columna, y k, θ , y V_i son los parámetros de forma, escala e inclinación usados para definir la curva; calcular un valor de placa teórica equivalente de altura (HETP) para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II y los parámetros de curva de distribución acumulativos gamma del modelo de k, θ , y V_i ,

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

Formula II

en donde

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

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

L = longitud de la columna; y evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicho valor de HETP calculado.

En ciertas realizaciones, el método comprende además: acondicionar, reemplazar o volver a compactar la columna de cromatografía en base a dicha evaluación.

En ciertas realizaciones, el método comprende además:

recoger la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de una parte delantera de transición de fase móvil correspondiente durante uno o más usos posteriores de la compactación de la columna de cromatografía;

realizar dicha determinación y dicho cálculo usando la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados recopilados durante cada uno de los uno o más usos posteriores de la compactación de la columna de cromatografía;

determinar un valor HETP de la compactación de la columna de cromatografía durante cada uno de dichos uno o más usos posteriores en base a dicho rendimiento;

recopilar una tendencia de los valores de HETP determinados de la compactación de la columna de cromatografía de los dos o más usos posteriores; y

identificar un cambio en la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicha tendencia recopilada, en donde dicho acondicionamiento, reemplazo o recompactación de la columna de cromatografía se basa en dicha identificación.

En ciertas realizaciones, un aumento en el valor HETP de la compactación de la columna de cromatografía en uno o más usos posteriores de dicha compactación de la columna en comparación con el valor HETP de la compactación de la columna en uno o más usos anteriores de dicha compactación de la columna identifica una disminución en la calidad de la compactación de la columna de cromatografía.

En ciertas realizaciones, se recopilan la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados de dos o más partes delanteras de transición de fase móvil diferentes durante dicha primera operación de la compactación de la columna, y dicho método comprende:

realizar dicha determinación y cálculo usando la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulado recopilados para cada una de las dos o más partes delanteras de transición de fase móvil diferentes independientemente para calcular un valor de HETP para cada una de las dos o más partes delanteras de

transición de fase móvil diferentes;

5 evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a los dos o más valores de HETP calculados, por lo que dicho acondicionamiento, reemplazo o recompactación de la columna de cromatografía se basa en dicha evaluación.

10 En ciertas realizaciones, la columna de cromatografía se selecciona del grupo que consiste de: una columna de cromatografía de afinidad de proteína A, una columna de cromatografía de intercambio catiónico y una columna de cromatografía de intercambio aniónico.

15 En ciertas realizaciones, la columna de cromatografía de afinidad de Proteína A comprende una columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™, la columna de cromatografía de intercambio catiónico comprende una columna de cromatografía de intercambio catiónico UNOsphere S™ o una columna de cromatografía de intercambio catiónico SP Sepharose XL, y la columna de cromatografía de intercambio aniónico comprende una columna de cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL.

20 En ciertas realizaciones, la parte delantera de transición de fase móvil en la columna de cromatografía de afinidad de proteína A se genera a partir de una o más partes delanteras seleccionadas del grupo que consiste de: una parte delantera de lavado generada durante la purificación de los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, una parte delantera generada durante la elución de los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, una parte delantera generada durante la desinfección de la columna con guanidina HCl, una parte delantera generada durante el enjuague posterior a la desinfección de la columna con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5.

25 En ciertas realizaciones, la parte delantera de transición de la fase móvil en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se genera a partir de una o más partes delanteras seleccionadas del grupo que consiste de: una parte delantera generada durante la carga de material tratado con solvente/detergente (S/D) que comprende los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, una parte delantera generada durante la elución de los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40 y una parte delantera generada durante una separación de columna.

30 En ciertas realizaciones, la parte delantera de transición de fase móvil en la columna de cromatografía de intercambio aniónico se genera a partir de una o más partes delanteras seleccionadas del grupo que consiste de: una parte delantera generada durante la limpieza de la columna con hidróxido de sodio y una parte delantera generada durante una separación de columna.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Las FIGS. 1A-1B muestran gráficos de ajustes de curvas de análisis de transición de distribución gamma ejemplares. La FIG. 1A es un gráfico que muestra una curva de análisis de transición de distribución gamma ejemplar ajustada a datos de transición de fase móvil. La FIG. 1B es un gráfico que muestra una curva de análisis de transición de distribución gamma ejemplar ajustada a los datos de transición de fase móvil con parámetros de esa curva usados para calcular la placa teórica equivalente de altura (HETP) como una medida de la eficiencia de la columna.

45 La FIG. 2 es un diagrama que muestra el sistema de calificación de la columna de cromatografía descrito en la presente.

La FIG. 3 es un gráfico de probabilidad de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A sin transformación.

50 La FIG. 4 es un gráfico de probabilidad de la suma de cuadrados (SS) para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A sin transformación.

55 La FIG. 5 es un gráfico de probabilidad de HETP para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A sin transformación.

La FIG. 6 es un gráfico de probabilidad de SS para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A sin transformación.

60 La FIG. 7 es un gráfico de probabilidad de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$).

La FIG. 8 es un gráfico de probabilidad de SS para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$).

65 La FIG. 9 es un gráfico de probabilidad de HETP para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A

con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$).

La FIG. 10 es un gráfico de probabilidad de SS para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$).

5

La FIG. 11 es un gráfico de probabilidad de la Media (V_m) para el equilibrio de la columna de Proteína A.

La FIG. 12 es un gráfico de probabilidad de la Media (V_m) para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A.

10

La FIG. 13 es un gráfico de control de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$). UCL = límite de control superior; LCL = límite de control inferior. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

15

La FIG. 14 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A. El UCL se deriva de los datos transformados en la FIG. 13

20

La FIG. 15 es un gráfico de control de SS para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$). Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

25

La FIG. 16 es un gráfico de series temporales de SS para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A. El UCL se deriva de los datos transformados en la FIG. 15

30

La FIG. 17 es un gráfico de control de la Media (V_m) para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

35

La FIG. 18 es un gráfico de control de HETP para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$). Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

40

La FIG. 19 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A. El UCL se deriva de los datos transformados en la FIG. 18.

45

La FIG. 20 es un gráfico de control para SS para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A con transformación logarítmica natural ($\lambda=0$). Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

50

La FIG. 21 es un gráfico de serie temporal de SS para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A. El UCL se deriva de los datos transformados en la FIG. 20.

55

La FIG. 22 es un gráfico de control para la Media (V_m) para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A. Los puntos numerados en los gráficos muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

60

La FIG. 23 es un gráfico de serie temporal de los resultados de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A de captura directa de producto (DPC) agrupados por paquete de la columna.

65

La Fig. 24 es un gráfico de serie temporal de los resultados de HETP para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A DPC agrupados por paquete de la columna.

La FIG. 25 es un gráfico de serie temporal de los resultados de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna de Proteína A DPC agrupados por plataforma.

5 La FIG. 26 es un gráfico de serie temporal de los resultados de HETP para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A DPC agrupados por plataforma.

10 La FIG. 27 es un gráfico que muestra el flujo medio para el equilibrio de la columna de Proteína A DPC. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

15 FIG. 28 es un gráfico de la presión precolumna media durante el equilibrado. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

20 La FIG. 29 es un gráfico del caudal de lavado medio para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A DPC. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

25 La FIG. 30 es un gráfico de la presión de lavado media para la parte delantera de lavado de la columna de Proteína A DPC. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

30 La FIG. 31 es un gráfico que muestra el HETP antes y después de cambiar el caudal de lavado. Los puntos numerados en el gráfico muestran valores atípicos y/o tendencias aparentes en los resultados de HETP en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, es decir, 1 representa 1 punto fuera de los límites de control, 2 representa 8 puntos en el mismo lado de la línea central, y 3 representa 6 puntos consecutivos que aumentan o disminuyen constantemente.

35 La FIG. 32 es un gráfico de serie temporal de HETP para dos paquetes de la columna de Proteína A diferentes evaluados en la parte delantera de equilibrio para 45 lotes de REMICADE® (infliximab).

40 La FIG. 33 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna SP-Sepharose High Performance (SPHP). Los límites de control se derivan de los datos de transformación de logaritmo natural de Box-Cox.

45 La FIG. 34 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de enjuague de WFI de la columna SPHP. Los límites de control se derivan de los datos de transformación de logaritmo natural de Box-Cox.

La FIG. 35 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de almacenamiento de la columna SPHP. Los límites de control se derivan de los datos de transformación de logaritmo natural de Box-Cox.

50 La FIG. 36 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de equilibrio de la columna Q2. Los límites de control se derivan de los datos de transformación de logaritmo natural de Box-Cox.

La FIG. 37 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de equilibrio de la separación de la columna Q2. Los límites de control se derivan de los datos de transformación de logaritmo natural de Box-Cox.

55 La FIG. 38 es un gráfico de serie temporal de HETP para la parte delantera de almacenamiento de la columna Q2. Los límites de control se derivan de los datos de transformación de logaritmo natural de Box-Cox.

La FIG. 39 muestra una descripción general de las 10 etapas del proceso de fabricación de ustekinumab.

60 La FIG. 40 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™ de etapa 3 para la parte delantera de lavado 2 generado durante la purificación de STELARA® (ustekinumab).

65 La FIG. 41 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™ de Etapa 3 para la parte delantera generado durante la elución de STELARA®

(ustekinumab).

La FIG. 42 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™ de Etapa 3 para la parte delantera generado durante la elución de SIMPONI® (golimumab). DPC se refiere a la captura directa del producto de SIMPONI® (golimumab) en la columna de Proteína A MabSelect™.

La FIG. 43 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™ de Etapa 3 para la parte delantera generado durante la desinfección con guanidina HCl. DPC se refiere a la captura directa del producto de SIMPONI® (golimumab) en la columna de Proteína A MabSelect™.

La FIG. 44 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™ de Etapa 3 para la parte delantera generado durante el enjuague posterior a la desinfección con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5. DPC se refiere a la Captura Directa de Producto de SIMPONI® (golimumab) en la columna de Proteína A MabSelect™.

La FIG. 45 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una parte delantera de la columna de cromatografía de intercambio catiónico UNOsphere S™ de Etapa 6 generada durante la carga de material tratado con solvente/detergente (S/D) que contiene SIMPONI® (golimumab). PS1 se refiere al paso de pulido 1 para SIMPONI® (golimumab) en la columna UNOsphere S™.

La FIG. 46 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una parte delantera de la columna de cromatografía de intercambio catiónico UNOsphere S™ de Etapa 6 generado durante la elución de SIMPONI® (golimumab). PS1 se refiere al paso de pulido 1 para SIMPONI® (golimumab) en la columna UNOsphere S™.

La FIG. 47 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una parte delantera de la columna de cromatografía de intercambio catiónico UNOsphere S™ de Etapa 6 generado durante la separación de la columna. PS1 se refiere al paso de pulido 1 para SIMPONI® (golimumab) en la columna UNOsphere S™.

La FIG. 48 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una parte delantera de la columna de cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL de Etapa 7 generado durante la limpieza con hidróxido de sodio. PS2 se refiere al paso de pulido 2 para SIMPONI® (golimumab) en la columna Q Sepharose™ XL.

La FIG. 49 es un gráfico que muestra los resultados de HETP para una parte delantera de la columna de cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL de Etapa 7 generado durante la separación de la columna. PS2 se refiere al paso de pulido 2 para SIMPONI® (golimumab) en la columna Q Sepharose™ XL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVECIÓN

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de calificación mejorado para monitorizar los cambios en los lechos de las columnas de cromatografía compactadas el funcionamiento repetido de las columnas de cromatografía en métodos de fabricación para producir anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 STELARA® (ustekinumab), y composiciones farmacéuticas específicas del anticuerpo. Este método, independiente de la escala, proporciona un medio práctico para evaluar la eficacia con la que funcionará la columna a lo largo de su vida útil.

La eficiencia de la separación de la columna de cromatografía se caracteriza a menudo usando el modelo de placa teórica de cromatografía. Usando este enfoque, la columna de cromatografía se percibe como que consiste de una serie de etapas o placas teóricas. Cada placa es la distancia sobre la cual los componentes de la muestra logran el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria (ver Van Deemter, Zuiderweg y Klinkenberg, "Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography," Chem. Engng. Sci. 5: 271-289 (1956)). La eficiencia de la columna se mide por el número de placas teóricas en la columna N_p , donde más placas en la columna significa más equilibrios, menos dispersión de bandas cromatográficas, picos más estrechos y separación de mejor calidad. Cuanto mayor sea el número de placas en una columna dada, menor será la altura de la placa. Por consiguiente, la eficiencia de la columna también puede medirse calculando la altura de la placa, que se denomina "altura equivalente a una placa teórica" o HETP. Usando este enfoque, cuanto menor sea el valor de HETP, mayor será la eficiencia de la separación de la columna.

El HETP se calcula dividiendo por la longitud de la columna de cromatografía L por el número de placas teóricas N_p .

$$HETP = L/N_p$$

Históricamente, el número de placas teóricas que posee una columna se ha determinado examinando un pico

cromatográfico después de una inyección de pulso usando la siguiente fórmula:

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

5 donde t_R es el tiempo de retención y $w_{1/2}$ es la anchura del pico a la mitad de la altura. Sin embargo, este enfoque no proporciona una medida precisa de la eficiencia de la columna cuando la forma del pico usada para calcular N_p se desvía de una distribución gaussiana. Para compensar esta falta de sensibilidad, se usa una segunda medida, la asimetría, para evaluar la asimetría de los picos. Esta medida compara la anchura del pico anterior y posterior al 10% de la altura máxima del pico. Como se ha analizado con anterioridad, este modelo carece de sensibilidad para detectar cambios en el rendimiento de la columna.

15 El método descrito en la presente proporciona una medida alternativa y más precisa de HETP que se basa en la distribución gamma sobre una o más partes delanteras de transición de fase móvil que se producen durante el funcionamiento rutinario de la columna de cromatografía. Por tanto, la presente divulgación está dirigida a un método de funcionamiento de una columna de cromatografía. Este método implica recopilar la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que contiene la compactación de la columna. Este método implica además determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida y los parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula Ia para una parte delantera ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente.

$$25 \quad C = 1 - \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Formula Ia}$$

o

$$30 \quad C = \frac{1}{\Gamma(k)} \gamma\left(k, \frac{V-V_i}{\theta}\right) \quad \text{Formula Ib}$$

35 En referencia a la Fórmula Ia y la Fórmula Ib, C es la señal de salida de la columna para un V dado. V es el flujo acumulado dividido por el volumen de la columna, y k, θ y V_i son los parámetros de forma, escala e inclinación usados para definir la curva. El valor de la placa teórica equivalente de altura (HETP) se calcula para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II y los parámetros de la curva de distribución acumulativa gamma del modelo de k, θ y V_i ,

$$40 \quad HETP = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad \text{Formula II}$$

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

$$45 \quad \sigma = \sqrt{k\theta^2}, \text{ y}$$

50 L = longitud de la columna.

La calidad de la compactación de la columna de cromatografía se evalúa en base al valor de HETP calculado. En base a la evaluación de la calidad de la columna, se determina que la columna de cromatografía es aceptable para su uso posterior o, de lo contrario, debe acondicionarse, reemplazarse o volver a compactarse.

55 El método de calificación de columna divulgado en la presente puede aplicarse a cualquier columna de cromatografía. Las columnas de cromatografía ejemplares incluyen, sin limitación, las usadas para cromatografía líquida, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, exclusión molecular, cromatografía de fluidos supercríticos, cromatografía de gases, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía bidimensional, cromatografía de proteína rápida (FPLC), cromatografía de contracorriente, cromatografía quiral, fase normal acuosa (ANP), cromatografía de modo mixto y cromatografía de pseudoafinidad. El material de compactación de columna ejemplar incluye, sin limitación, material de compactación de cromatografía de afinidad (por ejemplo, material de compactación de cromatografía por afinidad con proteína A o proteína G), material de compactación para cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, material de compactación para cromatografía de intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), material de compactación para intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio de modo mixto),

material de compactación para cromatografía de adsorción (por ejemplo, material de compactación de gel de sílice o alúmina), material de compactación para cromatografía de interacción hidrofóbica (por ejemplo, fenil-sefarosa, resinas aza-arenófilas o materiales de compactación para ácido m-aminofenilborónico), material de compactación para cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (por ejemplo, material de afinidad de Ni(II) y Cu(II)), material de compactación para cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, material de compactación para electroforesis en gel o electroforesis capilar) o material de compactación para cromatografía por exclusión molecular (por ejemplo, poliestireno).

El método descrito en la presente puede aplicarse durante el funcionamiento rutinario de la columna de cromatografía, por ejemplo, durante el aislamiento, la purificación o la identificación de entidades químicas o biológicas en una muestra. Tales compuestos pueden incluir, por ejemplo pero sin limitación, proteínas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de los mismos), ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas inorgánicas pequeñas, virus, liposomas e híbridos o variantes de cualquiera de tales compuestos.

A diferencia de los métodos de calificación de columnas de cromatografía anteriores, que requieren desconectar la columna para la prueba, por ejemplo, el método de inyección de pulsos, el método descrito en la presente se lleva a cabo durante el funcionamiento rutinario de la columna. El presente método aprovecha las transiciones del proceso de fase móvil que implican tampones de proceso y soluciones que tienen diferentes propiedades, que se producen durante un proceso rutinario de purificación de columna.

De acuerdo con el método de la presente invención, la "fase móvil" es la fase líquida en la cromatografía de columna que rodea y se mueve a través del material de cromatografía estacionario de la compactación de la columna de cromatografía. Durante el funcionamiento de la columna de cromatografía, la composición y las propiedades de la fase móvil a menudo cambian con cada paso del proceso, por ejemplo, equilibrio, lavados, etc. Los cambios en las propiedades de la fase móvil pueden detectarse y medirse en el eluido, es decir, la fase móvil que se eluye de la columna después de pasar por la fase estacionaria. Como se usa en la presente, la "señal de salida de la columna" es la señal de una propiedad física o química del eluido de la fase móvil que se detecta a medida que el eluido sale de la columna. La propiedad física o química que proporciona la señal de salida de la columna puede ser cualquier propiedad, como pH, conductividad, absorción de luz, fluorescencia, carga, concentración de sal, polarimetría, índice de refracción, respuesta electroquímica, proporción masa-carga, etc. que puede medirse usando cualquier detector de cromatografía típico. Los detectores de cromatografía adecuados para medir la señal de salida de la columna incluyen, sin limitación, un espectrómetro de masas, un espectrómetro de infrarrojos, espectrómetro visible, espectrómetro ultravioleta, espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier, detector de ionización de llama, detector de dispersión de luz láser de ángulo bajo, detector de matriz de diodos, espectrómetro de fluorescencia, detector de pH, detector de conductividad, detector electroquímico y detector de índice de refracción.

La señal de salida de la columna se recoge del eluato. Además de recoger la señal de salida de la columna, también se recoge el "flujo acumulado". El "flujo acumulado" es el volumen total de fluido eluido de la columna a lo largo del tiempo. Este valor se divide por el volumen de la columna para expresarse en unidades de volumen de columna.

Se genera una parte delantera de transición por el cambio en la señal de salida de la columna sobre el flujo acumulado. Una parte delantera de transición surge de la aplicación secuencial de diferentes fases móviles que tienen una o más propiedades diferentes (por ejemplo, conductividad, pH, etc.) a una columna. De acuerdo con el método descrito en la presente, la señal de salida de la columna sobre la parte delantera de transición puede normalizarse para que tenga un valor máximo de 1 y un valor mínimo de 0. Como se menciona en la presente, una "parte delantera de transición descendente" es una transición de fase móvil donde la fase móvil inicial tiene una señal de salida de la columna, por ejemplo, conductividad, que es más alta que la señal de salida de la columna de la fase móvil introducida secuencialmente.

Una "parte delantera de transición ascendente" como se usa en la presente es una transición de fase móvil donde la fase móvil inicial tiene una señal de salida de columna, por ejemplo, conductividad, que es más baja que la señal de salida de columna de la fase móvil introducida secuencialmente.

Se crea una parte delantera de transición añadiendo una primera fase móvil a la columna de cromatografía que contiene la compactación de la columna a calificar durante el curso del funcionamiento de la columna. En algún momento después de la adición de la primera fase móvil, por ejemplo, a medida que la primera fase móvil comienza a eluir, se añade a la columna de cromatografía que contiene la compactación de la columna una segunda fase móvil que tiene una señal de salida de columna detectable diferente en comparación con la primera fase móvil. La parte delantera de transición se detecta recogiendo la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de la fase móvil a medida que pasa entre la primera y la segunda fases móviles.

En una realización, la señal de salida de la columna para la primera y la segunda fases móviles difieren en

la señal en una cantidad que excede el ruido de la señal. En una realización, la diferencia en la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles está un 5% por encima del ruido de la señal de fondo. En otra realización, la diferencia en la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles está por lo menos un 10% por encima del ruido de la señal de fondo. En otra realización, la diferencia en la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles está por lo menos un 15% por encima del ruido de la señal de fondo.

En una realización, la señal de salida de la columna detectada sobre la parte delantera de transición es la conductividad. En esta realización, la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles difiere preferiblemente en por lo menos 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, por lo menos 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, por lo menos 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, por lo menos 1 mS/cm, o en más de 1 mS/cm.

En otra realización, la señal de salida de la columna detectada sobre la parte delantera de transición es el pH. En esta realización, la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles difiere preferiblemente en por lo menos 0,05 unidades de pH, en por lo menos 0,1 unidades de pH, en por lo menos 1 unidad de pH, en por lo menos 2 unidades de pH o en más de 2 unidades de pH.

En otra realización, la señal de salida de la columna detectada sobre la parte delantera de transición es la absorbancia UV-Vis. En esta realización, la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles difiere preferiblemente en por lo menos 0,01 unidades de absorbancia, por lo menos 0,1 unidades de absorbancia, por lo menos 0,5 unidades de absorbancia, por lo menos 0,8 unidades de absorbancia o en más de 0,8 unidad de absorbancia.

En otra realización, la señal de salida de la columna detectada sobre la parte delantera de transición es la absorbancia infrarroja. En esta realización, la señal de salida de la columna entre la primera y la segunda fases móviles difiere preferiblemente en por lo menos un 1 por ciento de transmitancia, por lo menos un 10 por ciento de transmitancia, por lo menos un 20 por ciento de transmitancia, por lo menos un 30 por ciento de transmitancia o en más del 30 por ciento de transmitancia.

En una realización, la parte delantera de transición de la fase móvil se genera mediante un cambio de una fase móvil que contiene un agente desnaturalizante a una fase móvil que contiene un agente no desnaturalizante. En otra realización, la parte delantera de transición de la fase móvil se genera mediante un cambio de una fase móvil que contiene un agente no desnaturalizante a una fase móvil que contiene un agente desnaturalizante.

En otra realización, la parte delantera de transición de fase móvil se genera mediante un cambio de una condición de fase móvil alcalina a una condición de fase móvil neutra o más ácida. Alternativamente, la parte delantera de transición de fase móvil se genera por un cambio de una condición de fase móvil ácida a una condición de fase móvil neutra o más alcalina.

En otra realización, la parte delantera de transición de la fase móvil se genera mediante un cambio de una fase móvil que contiene un solvente orgánico a una fase móvil acuosa. Alternativamente, la parte delantera de transición de la fase móvil se genera mediante un cambio de una fase móvil acuosa a una fase móvil que contiene un solvente orgánico.

La señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan en varios intervalos a lo largo del transcurso de la parte delantera de transición móvil. Preferiblemente, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan a lo largo del transcurso de toda la parte delantera de transición móvil, desde la señal mínima de salida de la columna hasta la señal máxima de salida de la columna o viceversa. En una realización, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan a intervalos irregulares, por ejemplo, se recopilan cuando se detecta un cambio en la señal de salida de la columna. En otra realización, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan a intervalos de tiempo regulares a lo largo de todo la parte delantera de transición móvil. Por ejemplo, en una realización, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan a intervalos de 1 segundo a lo largo de toda la parte delantera de transición móvil. En otra realización, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan a intervalos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 segundos durante el transcurso de la fase de transición móvil.

En una realización, los datos de la señal de salida de la columna se normalizan como se ha descrito con anterioridad estableciendo el valor máximo en 1 y el valor mínimo en 0 durante el período de análisis. El flujo también se convierte en volúmenes de columna para estandarizar la comparación de datos entre diferentes compactaciones de columna. Usando estos datos, la función de distribución acumulativa ("CDF") gamma se usa para generar una curva que se ajuste mejor a los puntos de datos recopilados. La CDF gamma está determinada por tres valores: parámetro de forma k , parámetro de escala θ (theta); y parámetro de compensación V_i usando la siguiente Fórmula I:

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

En referencia a la Fórmula I, C es la señal de salida de la columna para un V dado, V es el flujo acumulado dividido por el volumen de la columna. La Fórmula Ia, que se deriva de la Fórmula I, se usa para determinar el valor de la función de distribución gamma a lo largo de una parte delantera de transición ascendente.

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

en donde

Γ es la función gamma incompleta superior, y γ es la función gamma incompleta inferior.

Alternativamente, la Fórmula Ib, que también se deriva de la Fórmula I, se usa para determinar el valor de la función de distribución gamma a lo largo de una parte delantera de transición descendente.

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

La FIG. 1A es un gráfico que traza la señal de salida de columna normalizada y los datos de volumen de columna ejemplares recopilados en una parte delantera de transición de columna. Se usó la Fórmula Ia para generar el ajuste de la curva a los datos.

Los parámetros de CDF gamma de mejor ajuste se determinan manipulando los valores de k , θ y V para encontrar los parámetros que producen una curva modelo con la mínima desviación de la suma de cuadrados de los datos. Esta curva se ajusta a través de los puntos de datos de toda la parte delantera de transición para generar el modelo de mejor ajuste. Los parámetros k , θ y V de esta curva se utilizan para calcular el número de placas N_p en la columna o la altura de la placa, es decir, HETP, como indicadores de la eficiencia de la columna.

El número de placas N_p se calcula en base a la media μ y la varianza σ^2 de la curva del modelo. La media y la varianza se derivan de la curva de la siguiente manera:

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

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

El número de placas se calcula en base a la media y la varianza de la siguiente manera:

$$\text{Número de placas, } N_p = \mu^2 / \sigma^2$$

El HETP se calcula como se ha descrito con anterioridad en base a la longitud de la columna L en centímetros dividida por el número de placa N_p , de la siguiente manera.

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

La FIG. 1B muestra el mismo gráfico que se muestra en la FIG. 1A, con los parámetros de media μ y varianza σ^2 definidos.

Para evaluar el ajuste del modelo a los datos calculados como se describe en la presente, también pueden determinarse la media (V_m), la suma de cuadrados (SS) y el modo. La SS es una medida directa de la desviación de la curva del modelo de los datos del proceso de los que se deriva. El valor V_m es una medida del punto central de la transición en unidades de volumen de columna. Este valor debe estar cerca de uno, ya que típicamente se necesita un volumen de columna para una transición de tampón. La media no se ve típicamente afectada por la forma de la parte delantera. Los valores medios se usan para verificar los cálculos automáticos en busca de errores. Por ejemplo, un valor bajo podría indicar un error de recopilación de datos y puede requerir una investigación adicional para confirmar el resultado. La moda corresponde al volumen donde la tasa de cambio es mayor. Esta será igual a la media cuando la curva de transición sea simétrica. Típicamente, las transiciones están sesgadas y la moda es más baja que la media.

Además del HETP, otros factores que pueden calcularse a partir de los parámetros k (forma) incluyen la asimetría (γ_1), que es una medida relacionada con la asimetría, y la curtosis (γ_2) que es una medida de la nitidez del pico. Estos factores pueden usarse para identificar cambios en el rendimiento de la columna.

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

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

De acuerdo con el método descrito en la presente, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados se recopilan para la misma fase de transición móvil cada vez que se ejecuta el proceso de columna en la columna para calcular la HETP a partir de CDF gamma. Los datos históricos generados por las columnas usadas para el mismo paso del proceso y la misma escala también pueden recuperarse y utilizarse para calcular la HETP. Los datos de HETP se compilan para identificar tendencias en los valores de HETP de las transiciones correspondientes durante las operaciones históricas o actuales para identificar los límites de control superior e inferior del valor de HETP. Los límites de control son los valores altos y bajos de HETP que definen el intervalo de valores aceptables de HETP, es decir, valores de HETP que corresponden a una eficiencia de columna aceptable. Estos límites de control superior e inferior pueden establecerse en base a una evaluación estadística. Por ejemplo, en una realización, los límites de control superior e inferior se establecen calculando la media $\pm 2, 3$ o 4 desviaciones estándar. En una realización, los límites de control superior e inferior se establecen calculando la media ± 3 desviaciones estándar como se describe en los Ejemplos de la presente. En otra realización, los límites de control superior e inferior pueden establecerse calculando el intervalo de confianza a partir de los datos históricos. En una realización, los límites de control superior e inferior se establecen calculando el intervalo de confianza del 95%, 96%, 97% o 98% a partir de los datos históricos. En otra realización, los límites de control superior e inferior se establecen calculando el intervalo de confianza del 99% a partir de los datos históricos.

Los límites de control superior e inferior se utilizan para identificar cambios en la eficiencia de la columna a lo largo del tiempo y el uso de la columna. Típicamente, cualquier aumento en la HETP que exceda el límite de control superior puede ser indicativo de una disminución en la eficiencia de la columna. Si durante la monitorización rutinaria de la columna, se observa una tendencia adversa en la HETP o se exceden los límites de control, deben evaluarse la calidad del producto del eluato, el rendimiento del proceso de columna y/o los datos de eliminación de impurezas para garantizar la calidad del producto para el lote identificado. En caso de que la calidad del producto o el rendimiento de la columna no cumplan con los criterios establecidos, deben realizarse las acciones correctivas apropiadas, como el acondicionamiento, recompactación o el reemplazo de la columna, y debe realizarse la calificación antes de liberarla para su uso posterior. Los métodos de acondicionamiento de una columna de cromatografía para redistribuir el lecho compactado variarán dependiendo de la columna que se esté empleando, pero son bien entendidos por los expertos en la técnica.

La monitorización del rendimiento de la columna durante el funcionamiento de la columna puede basarse en una o más fases de transición que se incluyen rutinariamente en un protocolo de purificación. Preferiblemente, la monitorización se basa en los valores de HETP calculados en base a CDF gamma para dos, tres o más fases de transición durante un protocolo de purificación.

Como se indica más adelante, el cálculo de HETP usando el método de GDTA como se describe en la presente para determinar el rendimiento de la columna puede basarse en datos históricos recopilados de columnas usadas para el mismo paso del proceso y la misma escala. También pueden usarse para la evaluación los datos generados a partir de un modelo calificado a escala reducida del paso del proceso. Esto permite la evaluación de la calidad del rendimiento de la columna en comparación con los datos de calificación.

Factores como el caudal (efecto Van Deemter), las posibles interacciones del tampón y el volumen adicional de la columna pueden afectar a los resultados del método GDTA como se describe en la presente y deben evaluarse al establecer los límites de control para GDTA. Las partes delanteras de transición incluidas en el GDTA preferiblemente cumplen ciertos criterios, como que las mediciones de la señal de salida de la columna de la fase móvil estén a escala, la diferencia de medición de la señal de salida de la columna entre las fases móviles esté por encima del ruido de la señal de fondo y la interacción entre la fase móvil y la resina sea consistente y reproducible.

Los criterios comunes de evaluación de columnas usados para la liberación y la monitorización durante el uso se determinarán evaluando los datos históricos específicos del equipo y el tipo de resina. En la Tabla 1 se enumeran ejemplos de mediciones rutinarias de la calidad del producto y del rendimiento del proceso que pueden usarse para evaluar la relación entre los resultados de calificación de la columna y el rendimiento. Las mediciones rutinarias de la calidad y el rendimiento del proceso usadas para la evaluación no se limitan a las enumeradas en la Tabla 1, pero se pretende que la lista sea una guía y debe basarse en los requisitos específicos del proyecto y el

paso del proceso que se esté evaluando. Las especificaciones y los criterios de aceptación para la calidad del producto y el rendimiento del proceso son específicos del proyecto y se determinarán en base a los requisitos del proceso.

5

Tabla 1. Medidas rutinarias de rendimiento de paso y calidad

10

15

Parámetro	Método analítico
Volumen Pre-Elución (CV)	
Volumen de Elución (CV)	
Rendimiento del paso	
Perfil cromatográfico	Inspección visual
Concentración de eluato	A280
Monómero de eluato	DW-SE-HPLC
Impurezas del proceso	Ensayos varios

20

25

El método de análisis de transición de distribución gamma como se describe en la presente puede llevarse a cabo en tiempo real durante el funcionamiento de la columna. Este método implica recopilar, mediante un dispositivo informático de calificación de columnas de cromatografía, la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende compactación de columna; determinar, mediante un dispositivo informático de calificación de columnas de cromatografía, una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula Ia para una parte delantera de transición ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente.

30

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

o

35

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

40

En referencia a las Fórmulas Ia y Ib, C es la señal de salida de la columna para un V dado. V es el flujo acumulado dividido por el volumen de la columna, y k, θ y V_i son los parámetros de forma, escala y compensación usados para definir la curva. Este método implica además el cálculo, mediante un dispositivo informático de calificación de columnas de cromatografía, un valor de placa teórica equivalente de altura (HETP) para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II y los parámetros de la curva de distribución acumulativa gamma del modelo de k, θ y V_i.

45

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

50

Formula II

en donde

55

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

60

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

L = longitud de la columna.

65

El método implica además evaluar, usando un dispositivo informático de cualificación de columna de cromatografía, la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicho valor de HETP calculado. En base a esta evaluación, el operador de la columna de cromatografía puede determinar si la columna

de cromatografía puede reutilizarse o si se debe reemplazar, volver a compactar o acondicionar antes de la siguiente operación de la columna.

5 La FIG. 2 es un diagrama que proporciona una visión general del método y el sistema para operar una columna de cromatografía y evaluar la eficiencia de la columna en tiempo real como se describe en la presente. Como se muestra en la FIG. 2 y se ha descrito con anterioridad, el sistema **10** incluye una columna de cromatografía **12** usada para separar las biomoléculas introducidas en la columna como una mezcla compleja, es decir, el eluyente **14**, un detector **20** que detecta una señal de salida de la columna en el eluato a medida que eluye de la columna de cromatografía, una interfaz de comunicaciones **22** que transmite señales/datos desde el detector **20**, un dispositivo informático de calificación de la columna **24**, y un servidor **26**.

15 La columna de cromatografía **12** se llena con un material de compactación de columna en fase sólida permeable, semipermeable o impermeable. Las columnas de cromatografía y el material de relleno de columna adecuados se han descrito con anterioridad. El eluyente **14** que contiene las biomoléculas de interés se introduce en la columna de cromatografía **12**. También se introduce una fase móvil **16** en la columna de cromatografía **12**. La fase móvil **16** facilita la separación de las biomoléculas a través de la fase estacionaria de la columna de cromatografía **12** y la elución de las biomoléculas en el eluato a través de la salida **18** de la columna de cromatografía. De acuerdo con el método descrito en la presente, la fase móvil **16** comprende los tampones de columna y/o los reactivos de lavado introducidos secuencialmente que difieren entre sí en una o más propiedades físicas o químicas, como se describe a continuación, por ejemplo, pH, conductividad, concentración de sal. Estas diferencias en una o más propiedades físicas o químicas son detectadas en el eluato por el detector **20**.

20 El detector **20** está acoplado a la salida **18** de la columna de cromatografía **12**. Por consiguiente, el detector **20** monitoriza y recoge la señal de salida de la columna a través del eluato de la columna de cromatografía **12**. Los detectores adecuados y las propiedades del eluato, es decir la señal de salida de la columna detectada, se han descrito con anterioridad. El detector está acoplado a una unidad de interfaz de comunicaciones **22** que transmite datos recopilados por el detector **20** (por ejemplo, señal de salida de columna y parámetros de flujo acumulados) a un dispositivo informático de calificación de columnas **24** para el procesamiento de datos y/o un servidor **26** para el almacenamiento.

30 El dispositivo informático de calificación de columnas **24** del sistema descrito en la presente puede ser cualquier dispositivo informático, por ejemplo, un ordenador, un dispositivo informático personal, un teléfono inteligente, etc. que incluye una unidad central de procesamiento (CPU) o procesador **32**, una memoria **30**, una interfaz de red **28** y una interfaz de usuario **34** que están acoplados entre sí por un bus **36** u otro enlace. El dispositivo informático de calificación de columnas **24** puede incluir otros tipos y/o números de componentes y elementos en otras configuraciones.

35 El procesador **32** en el dispositivo informático de calificación de columnas **24** ejecuta un programa de instrucciones almacenadas para uno o más aspectos del análisis de transición de distribución gamma descritos e ilustrados por medio de los ejemplos en la presente, aunque podrían usarse otros tipos y/o números de dispositivos de procesamiento y el procesador **32** puede ejecutar otros tipos y/o números de instrucciones programadas. En una realización, el procesador **32** está localizado únicamente en el dispositivo informático de calificación de columnas **24**. En otra realización, el procesador está distribuido entre el detector **20** y el dispositivo informático de calificación de columnas **24**. Por ejemplo, en una realización, el procesador **32** del dispositivo informático de calificación de columnas **24** comprende un microcontrolador que está acoplado al detector. En esta realización, el microcontrolador sirve como un procesador integrado que es capaz de mapear o convertir los datos recopilados por el detector **20** en una señal digital que se transmite al dispositivo informático de calificación de columnas **24**. El microcontrolador acoplado al uno o más detectores es capaz de llevar a cabo una o más funciones de procesamiento del dispositivo informático de calificación de columnas **24**.

40 La memoria **30** en el dispositivo informático de calificación de columnas **24** almacena estas instrucciones programadas para uno o más aspectos del GDTA como se describe en la presente. Para la memoria **30** pueden usarse una variedad de diferentes tipos de dispositivos de almacenamiento de memoria, como una memoria de acceso aleatorio (RAM) y/o una memoria de solo lectura (ROM) en el dispositivo de procesamiento de tiempo o un disquete, disco duro, CD ROM, DVD ROM u otro medio legible por ordenador que se lee y escribe por un sistema magnético, óptico y otro sistema de lectura y escritura que está acoplado al procesador **32** en el dispositivo informático de calificación de columnas **24**.

45 La interfaz de red **28** del dispositivo informático de calificación de columnas **24** acopla operativamente y facilita la comunicación entre el dispositivo informático de calificación de columnas **24** y el detector **20**, aunque pueden usarse otros tipos y/o números de redes o sistemas de comunicación con otros tipos y/o números de conexiones y configuraciones.

50 El dispositivo informático de calificación de columnas **24** puede comprender además una interfaz de usuario **34** como, por ejemplo, una interfaz gráfica de usuario, una interfaz de usuario táctil o una interfaz de usuario basada

en la web. La interfaz de usuario está configurada para mostrar información referente a los parámetros de calificación de la columna de cromatografía al usuario. La interfaz de usuario también está configurada para recibir entradas del usuario referente a los parámetros de la columna de cromatografía.

5 El servidor **26** representado en la FIG. 2 puede ser uno o una pluralidad de dispositivos informáticos que incluyen cada uno una CPU o procesador, una memoria y una interfaz de red, que están acoplados entre sí mediante un bus u otro enlace similar al descrito para el dispositivo informático de calificación de columnas **24**. El servidor **26** puede incluir otros tipos y/o números de componentes y elementos en otras configuraciones.

10 La interfaz o interfaces de comunicación **22** del sistema descrito en la presente puede incluir una o más redes de área local (LAN) y/o redes de área amplia (WAN). A modo de ejemplo solamente, la o las interfaces de comunicación **22** pueden usar TCP/IP sobre Ethernet y protocolos estándar de la industria, incluyendo el protocolo de transferencia de hipertexto (HTTP) y/o HTTP seguro (HTTPS), aunque pueden utilizarse otros tipos y/o números de redes de comunicación.

15 Otro aspecto se refiere a un medio legible por ordenador no transitorio que tiene almacenadas instrucciones en el mismo para la calificación de columnas de cromatografía usando el análisis de transición de distribución gamma. Estas instrucciones comprenden un código ejecutable que, cuando es ejecutado por un procesador, hace que el procesador realice pasos que comprenden recopilar la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo
20 acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende compactación de columna; determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo basada en la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados recopilados para el por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula la como se ha descrito anteriormente para una parte delantera de transición ascendente o la Fórmula Ib como se ha
25 descrito anteriormente para una parte delantera de transición descendente; calcular un valor de placa teórica equivalente de altura (HETP) para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II como se ha descrito con anterioridad y los parámetros de la curva de distribución acumulativa gamma del modelo de k , θ y V_i como se describe en la presente; y evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicho valor de HETP calculado.

30 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un dispositivo de calificación de columnas de cromatografía. Este dispositivo comprende un procesador y una memoria acoplada al procesador. La memoria está configurada para ejecutar instrucciones programadas almacenadas en la memoria. Estas instrucciones incluyen:
35 recopilar la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende la compactación de la columna; determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula la para una parte delantera de
40 transición ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente como se ha descrito con anterioridad, calcular un valor de placa teórica equivalente de altura (HETP) para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II como se ha descrito con anterioridad y los parámetros de la curva de distribución acumulativa gamma del modelo de k , θ y V_i como se describe en la presente; y evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicho valor de HETP calculado.

45 EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Aplicación del análisis de transición de distribución gamma para la calificación de columnas de cromatografía de proteína A usadas en la fabricación de REMICADE® (infiximab)

50 Visión general:

El proceso de fabricación del anticuerpo terapéutico, REMICADE® (infiximab), implica varias etapas, cuatro de las cuales implican la purificación por cromatografía. El análisis de transición de distribución gamma (GDTA) para la calificación de la columna se aplicó a dos o tres transiciones durante cada uno de estos pasos de columna. Este
55 ejemplo describe la aplicación del método GDTA al paso de purificación en columna de Proteína A empleado durante la fabricación de REMICADE® (infiximab). El proceso de purificación incluye dos partes delanteras de transición, es decir, equilibrio y lavado intermedio, que son apropiados para el GDTA como se describe en la presente.

60 El GDTA se ejecutó en 129 partes delanteras de la purificación consecutiva de 69 lotes de REMICADE® (infiximab), que comprenden 60 partes delanteras de equilibrio y 69 de lavado. El análisis de distribución de la parte delantera gamma se realizó concurrentemente con la fabricación y no afectó al proceso de fabricación. Toda la fabricación, la monitorización y los controles se realizaron usando procedimientos actuales y efectivos. Durante la purificación por cromatografía en columna de REMICADE® (infiximab), se registraron la conductividad (es decir, la
65 señal de salida de la columna) y el flujo del eluyente (es decir, el flujo acumulado).

Además de la aplicación del GDTA a la operación de la columna en tiempo real, también se recopilaron y analizaron datos históricos de 285 lotes procesados en el transcurso de los cuatro años anteriores, como se describe en la presente. El conjunto de datos incluía 253 partes delanteras de equilibrio y 285 partes delanteras de lavado, para un total de 538 partes delanteras históricas. No se generaron partes delanteras de equilibrio para 32 lotes en los que se realizaron sanitizaciones previas al uso. Este conjunto de datos se seleccionó para proporcionar una distribución uniforme a lo largo de la vida de las columnas y representa 11 paquetes de columnas.

Protocolo de GDTA:

Para cada parte delantera de transición durante la purificación en columna de Proteína A, es decir, lavado y equilibrio, se registraron la conductividad y el flujo acumulado. La determinación del punto de partida se logró evaluando las tendencias de conductividad y presión previas a la columna para identificar el punto en el que la columna se colocó en línea. Se creó y configuró una hoja de cálculo para recuperar datos de flujo y conductividad del servidor usando un intervalo calculado de 10 segundos para la duración de la parte delantera.

Los datos de conductividad se normalizaron estableciendo el valor máximo en 1 y el valor mínimo en 0 y aumentado a escala los otros puntos proporcionalmente. Además, el flujo se convirtió en volúmenes de columna.

Se calculó una CDF gamma inicial usando los mismos parámetros k , θ , V_i iniciales que el módulo PI. V_i se restó de cada valor de volumen en el término x de la función de distribución gamma. Para normalizar la conductividad, que fue aumentando durante la purificación, los valores de conductividad se establecieron en 0 para volúmenes inferiores a V_i y el máximo se estableció en 1.

Se calculó la diferencia (error) entre cada valor de conductividad y el ajuste del modelo para cada punto de volumen. Además, se calculó la suma de los cuadrados para el error entre 0,5 y 1,8 CV. Los parámetros de CDF gamma de mejor ajuste se calcularon usando el solucionador de Excel para encontrar los parámetros k , θ , y V_i que produjeron una curva del modelo con el valor mínimo para la suma de cuadrados usando

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

El solucionador se ejecutó durante 10.000 iteraciones usando el método no lineal de GRG con restricciones de $k \geq 0,0001$ y $V_i \geq 0$ para garantizar que se alcanzara el ajuste más cercano.

A partir de los valores finales de k , θ , y V_i se calcularon los siguientes parámetros:

$$\text{Media}(V_m), \mu = k\theta + V_i,$$

$$\text{Varianza, } \sigma^2 \text{ (sigma al cuadrado)} = k\theta^2$$

$$\text{Modo} = (k-1)\theta + V_i$$

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

Se calculó el caudal medio y la presión precolumna para el periodo de 0,5 a 1,8 CV para cada parte delantera.

Análisis y Evaluación de los Criterios de Aceptación:

Normalidad

Se evaluó la normalidad de los resultados de HETP y SS para las partes delanteras de equilibrio y de lavado creando un gráfico de probabilidad. En los gráficos de probabilidad (FIGS. 3-12), los puntos de datos (resultados de HETP o SS) representan la distribución acumulada real observada en la muestra. Las líneas representan la distribución acumulativa ajustada y los intervalos de confianza superior e inferior en base a una distribución normal usando los parámetros estimados de la muestra. La escala de percentiles se transforma para que la distribución ajustada forme una línea recta. Los conjuntos de datos HETP y SS están limitados por 0 en el extremo inferior, sin embargo, el modelo de distribución normal sugiere valores negativos. Los gráficos de probabilidad resultantes muestran una forma curva. Ver las FIGS. 3-6. Por tanto, los resultados se ajustan mejor usando una transformación logarítmica. Ver las FIGS. 7-10 para los gráficos de probabilidad de los datos transformados logarítmicamente.

También se evaluaron los datos de la Media (V_m) para determinar la normalidad. La FIG. 11 y la FIG. 12 muestran que los datos se ajustan a la distribución normal, con solo unos pocos valores atípicos. Por tanto, no se necesitaba ninguna transformación. Este parámetro no se especificó en el protocolo, pero proporciona una garantía útil de que el ajuste de la curva es válido. Los límites de control para este parámetro también se generarán a partir de este análisis.

Identificación de valores atípicos y causas de variación.

Para identificar valores atípicos y evaluar la variabilidad en los resultados, se generaron gráficos de control para cada parámetro. Ver las FIGS. 13-22. Los gráficos de control usaron los datos transformados para HETP y SS, donde se aplicó la transformación de logaritmo natural. Los datos también se representan en un gráfico de serie temporal con el límite de control superior transformado para cada uno de estos parámetros.

HETP: una serie de valores atípicos y tendencias son evidentes en los resultados de HETP para las partes delanteras de equilibrio y lavado. Además, la FIG. 13 y la FIG. 18 muestran tendencias en los datos en base a las reglas de Shewhart 1, 2 y 3, representadas por cuadrados en las figuras y numeradas de acuerdo a lo siguiente.

Prueba	Regla
1	1 punto está fuera de los límites de control.
2	8 puntos en el mismo lado de la línea central.
3	6 puntos consecutivos aumentan o disminuyen constantemente.

Los lotes asociados con estas oscilaciones no se excluyeron del análisis ya que son representativos del proceso aceptable.

Ambos gráficos de control (FIG. 13 y FIG. 18) muestran un número de violaciones de la regla 1 de Shewhart, que también exceden los límites de control. En cada caso, los problemas se identificaron y corrigieron reacondicionando las columnas.

Como se esperaba, varias series cumplieron con los criterios de las reglas 2 y 3 debido a la variación en los paquetes de columnas. Para evaluar adicionalmente las tendencias, se prepararon gráficos de series temporales con datos agrupados por paquete de columnas (FIGS. 23-24) y plataforma (FIGS. 25-26). Estos gráficos muestran que gran parte de la variación de causa especial se atribuye a la degradación de la columna y algunas oscilaciones aisladas. Las tendencias de aumento de HETP son evidentes para cada columna a lo largo del tiempo para la parte delantera de equilibrio (FIG. 23). Las oscilaciones observadas para la parte delantera de lavado parecen estar aisladas en una plataforma u otra en diferentes momentos (FIG. 26), lo que sugiere que puede haber una fuente de variabilidad en el rendimiento de la columna en la plataforma.

Suma de cuadrados (SS): La suma de cuadrados es una medida de como de bien se ajusta la distribución gamma a los datos del proceso. Esta medida proporcionará una verificación para garantizar que el resultado de HETP sea válido. Los gráficos de control para los datos transformados se muestran en la FIG. 15 y la FIG. 20 para equilibrio y lavado, respectivamente. Esta medida solo tiene un límite superior de control. La FIG. 15 muestra 6 puntos donde se excede el límite de control superior. Cuatro de estos están asociados con una HETP más alta. El lote 880572M tuvo una interrupción del flujo durante la parte delantera que provocó que la SS fuera alta pero no afectó a la HETP.

Evaluación de flujo y presión.

Se evaluó el caudal medio y la presión previa a la columna para el conjunto de datos para identificar cualquier valor atípico. Se evaluó la relación entre las diferencias identificadas y los resultados.

En las FIGS. 27-30 se muestran el caudal y la presión previa a la columna. Los gráficos muestran un excelente control del caudal para cada uno de los pasos. El caudal de lavado se cambió durante esta evaluación. La presión previa a la columna muestra variaciones relacionadas con la plataforma y las columnas, pero generalmente es estable dentro de un intervalo. La FIG. 31 muestra que el valor de HETP no se ve afectado significativamente por el cambio del caudal de lavado.

Límites de control para la columna de proteína A

HETP:

La HETP está directamente relacionada con el rendimiento de la columna y también se ve afectada por otros factores en el sistema que pueden aumentar la dispersión. El resultado debe ser >0 . Los límites de control para la HETP se determinan mejor usando la transformación logarítmica natural de Box-Cox ($\lambda=0$), como se muestra en la FIG. 13 para la parte delantera de equilibrio y la FIG. 18 para la de lavado. Los gráficos de control muestran los

límites de control para los datos transformados calculados por Minitab usando la media +/- 3 desviaciones estándar (ver también la Tabla 2 a continuación). La desviación estándar se determina en base al intervalo móvil medio. Se seleccionó un intervalo móvil de 100 para tener en cuenta la variación en el rendimiento de la columna durante la vida útil de la columna. Los límites de control superior e inferior se transforman inversamente (λ) para determinar los límites de control para los datos no transformados.

En la FIG. 14 y la FIG. 19. se muestra un gráfico de series temporales para cada resultado de HETP de la parte de delantera y los límites de control. Se espera que el funcionamiento dentro de estos límites produzca un rendimiento cromatográfico aceptable en base a esta revisión histórica. Los valores por encima de los límites de control superiores pueden indicar problemas de flujo de columna y deben evaluarse adicionalmente. Los valores por debajo de los límites de control inferiores pueden ser indicativos de un error de cálculo.

Suma de cuadrados (SS):

La SS es una medida de como de bien se ajusta el modelo de distribución gamma a los datos. Esta medida se usa para garantizar que los valores HETP calculados con el método GDTA representan los datos del proceso. No hay límite inferior y el resultado debe ser >0. El límite de control superior para la SS se determina mejor usando la transformación logarítmica natural de Box-Cox ($\lambda=0$), como se muestra en la FIG. 15 para la parte delantera de equilibrado y la FIG. 20 para la parte delantera de lavado. Los gráficos de control muestran los límites de control para los datos transformados calculados por Minitab usando la media +/- 3 desviaciones estándar. La desviación estándar se determina en base al intervalo móvil medio. Se seleccionó un intervalo móvil de 100 para tener en cuenta la variación en el rendimiento de la columna durante la vida de la columna. Los gráficos de control muestran los límites de control superiores para los datos transformados que se transforman inversamente para dar 0,050 y 0,989 para los partes delanteras de equilibrio y lavado, respectivamente (ver Tabla 2). En la FIG. 16 y la FIG. 20 se muestra un gráfico de serie temporal para cada resultado de la SS de la parte delantera y los límites de control. Los resultados dentro de los límites garantizarán que el modelo se ajuste tanto a los datos como a los resultados históricos. Si el resultado está fuera de este intervalo, es probable que haya una causa especial.

Media:

La media se añadió como una segunda medida de la precisión del modelo de distribución gamma. La media representa el centro de masa teórico para la parte delantera y siempre debe estar cerca del volumen de 1 columna, a menos que haya otros factores en el sistema que hagan que se desplace, como un gran volumen adicional de columna o la interacción entre la fase móvil y la resina. Los valores medios para las partes delanteras de equilibrio y de lavado se distribuyen aproximadamente de manera normal y no necesitan transformación, ver la FIG. 11 y la FIG. 12. La media para la parte delantera de equilibrio está estrechamente distribuida alrededor de 1,07 CV con algunos valores atípicos presentes en ambos lados y acercándose a 1,2 en el lado alto, ver la FIG. 17. La parte delantera de lavado muestra un poco más de variación y está centrado en 0,99 CV con varios valores atípicos bajos que se acercan a 0,8, ver la FIG. 22. Se recomienda aplicar límites de control de 0,80 a 1. 20 CV para la media de ambas partes delanteras (ver Tabla 2). Esto es apropiado porque la media no es una medida del rendimiento de la columna, sino que se usa como verificación para garantizar que el análisis era apropiado. Los límites de control más estrictos darían como resultado una sensibilidad innecesaria para esta verificación.

Tabla 2. Límites de control recomendados de HETP, SS y media para la purificación en columna de proteína A durante la fabricación de REMICADE® (infiximab)

Parte delantera	Parámetro	UCL	LCL
Equilibrio	HETP	0.243	0.027
	SS	0.050	NA
	Media	1.20	0.80
Lavado	HETP	0.352	0.011
	SS	0.989	NA
	Media	1.20	0.80

Ejemplo 2 - Aplicación del análisis de transición de distribución gamma para la detección del rendimiento subóptimo de las columnas de cromatografía de proteína A usadas en la fabricación de REMICADE® (infiximab)

El proceso de fabricación del anticuerpo terapéutico, REMICADE® (infiximab), implica varias etapas, cuatro de las cuales implican la purificación por cromatografía. El análisis de transición de distribución gamma (GDTA) para la calificación de la columna se aplicó a dos o tres transiciones durante cada uno de estos pasos de columna. Este ejemplo describe la aplicación del método GDTA al paso de purificación en columna de Proteína A empleado en la

fabricación de REMICADE® (infiximab). El proceso de purificación incluye dos partes delanteras de transición, es decir, equilibrio y lavado intermedio, que son apropiados para el GDTA como se describe en la presente.

5 El GDTA se ejecutó en 45 partes delanteras de equilibrio de la purificación consecutiva de 45 lotes de REMICADE® (infiximab), que comprenden 23 lotes procesados en el paquete de columnas 883333M001 y 22 lotes procesados en el paquete de columnas 885473M001. El análisis de distribución de la parte delantera gamma se realizó concurrentemente con la fabricación y no afectó al proceso de fabricación. Toda la fabricación, la monitorización y los controles se realizaron usando procedimientos actuales efectivos. Durante la cromatografía en columna de REMICADE® (infiximab), se registraron la conductividad (es decir, la señal de salida de la columna) y el flujo del eluyente (es decir, el flujo acumulado).

15 La tendencia de los resultados de equilibrio HETP para los 45 lotes, ver la FIG. 32, mostró una diferencia significativa entre los paquetes de columnas. Los controles actuales para la evaluación de columnas no identificaron ninguna diferencia entre los dos paquetes de columnas. La evaluación del rendimiento de los lotes mostró una diferencia significativa ($p = 0,001$) entre los lotes procesados en los dos paquetes de columnas, estimada en un 4,3% menor para el paquete de columnas con los valores de HETP más altos. Se evaluaron otros factores potenciales y no mostraron correlación con la diferencia de rendimiento. Por tanto, la conclusión de este análisis es que la diferencia de rendimiento de las columnas provocó un menor rendimiento. En base a este descubrimiento, la columna de menor rendimiento se acondicionó para mejorar compactación de la columna antes de continuar con su uso. Este ejemplo demuestra la sensibilidad del método GDTA para evaluar la calidad de la columna de cromatografía.

25 **Ejemplo 3 - Aplicación del análisis de transición de distribución gamma para la calificación de columna de columnas de cromatografía de alto rendimiento SP-Sepharose usadas en la fabricación de REMICADE® (infiximab)**

Visión general:

30 Como se ha analizado anteriormente, el proceso de fabricación de REMICADE® (infiximab) implica varias etapas, cuatro de las cuales implican purificación por cromatografía. Este ejemplo describe la aplicación del método GDTA al paso de purificación por columna de alto rendimiento SP-Sepharose (SPHP) empleado en la fabricación de REMICADE® (infiximab). La columna SPHP es una columna de cromatografía de intercambio catiónico. El proceso de purificación incluye tres partes delanteras de transición, es decir, partes delanteras de equilibrio, lavado WFI y almacenamiento, que son apropiadas para GDTA como se describe en la presente.

35 El GDTA se ejecutó en 69 partes delanteras de la purificación de 23 lotes de REMICADE® (infiximab), que comprenden 23 partes delanteras de equilibrio, lavado WFI y almacenamiento. El análisis de distribución de la parte delantera gamma se realizó concurrentemente con la fabricación y no afectó al proceso de fabricación. Toda la fabricación, la monitorización y los controles se realizaron usando procedimientos actuales efectivos. Durante la cromatografía en columna de REMICADE® (infiximab), se registraron la conductividad (es decir, la señal de salida de la columna) y el flujo del eluyente (es decir, el flujo acumulado).

40 Además de la aplicación del GDTA al funcionamiento de las columnas en tiempo real, también se recopilaron y analizaron datos históricos de 189 partes delanteras de transición procesadas en el transcurso de los cuatro años anteriores, como se describe en la presente. El conjunto de datos incluía 64 partes delanteras de equilibrio, 63 partes delanteras de lavado WFI y 62 partes delanteras de almacenamiento. Este conjunto de datos se seleccionó para proporcionar una distribución uniforme a lo largo de la vida de las columnas y representa paquetes de 6 columnas.

50 El GDTA para las partes delanteras de columnas SPHP se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Este análisis produjo mediciones de HETP, SS y media para cada parte delantera. Los límites de control que se derivaron para cada uno de estos tres parámetros en base a la evaluación estadística se enumeran en la Tabla 3 a continuación.

55 **Límites de control para la columna SPHP:**

HETP:

60 La HETP está directamente relacionada con el rendimiento de la columna y también se ve afectado por otros factores en el sistema que pueden aumentar la dispersión. El resultado debe ser >0 . Los límites de control para la HETP se determinan mejor usando la transformación logarítmica natural de Box-Cox ($\lambda=0$). Los límites de control para los datos transformados se calcularon mediante Minitab usando la media $+1/- 3$ desviaciones estándar. La desviación estándar se determina en base al intervalo móvil medio. Se seleccionó un intervalo móvil de 25 para tener en cuenta la variación en el rendimiento de la columna durante la vida de la columna. Los límites de control superior e inferior se transforman inversamente (e^x) para determinar los límites de control para los datos no transformados.

65

En la FIG. 33 (parte delantera de equilibrio), la FIG. 34 (parte delantera de lavado WFI), y la FIG. 35 (parte delantera de almacenamiento) se muestra un gráfico de series temporales para cada resultado de la HETP de la parte delantera y los límites de control. Se espera que el funcionamiento dentro de estos límites produzca un rendimiento cromatográfico aceptable en base a esta revisión histórica. Los valores por encima de los límites de control superiores pueden indicar problemas de flujo de columna y deben evaluarse adicionalmente. Los valores por debajo de los límites de control inferiores pueden ser indicativos de un error de cálculo.

Suma de cuadrados (SS):

La SS es una medida de como de bien se ajusta el modelo de distribución gamma a los datos. Esta medida se usará para garantizar que los valores de HETP calculados mediante el método GDTA representen los datos del proceso. No hay límite inferior y el resultado debe ser >0. El límite de control superior para la SS se determina mejor usando la transformación logarítmica natural de Box-Cox ($\lambda=0$). Los límites de control para los datos transformados se calcularon mediante Minitab usando la media +/- 3 desviaciones estándar. La desviación estándar se determina en base al intervalo móvil medio. Se seleccionó un intervalo móvil de 100 para tener en cuenta la variación en el rendimiento de la columna durante la vida de la columna. Los límites de control superiores para los datos transformados se transformaron inversamente para dar 0,110 para la parte delantera de equilibrio, 0,027 para la parte delantera de lavado WFI y 0,073 para la parte delantera de almacenamiento (ver la Tabla 3). Los resultados dentro de los límites garantizarán que el modelo se ajuste tanto a los datos como a los resultados históricos. Si el resultado está fuera de este intervalo, es probable que haya una causa especial.

Media:

La media se añadió como una segunda medida de la precisión del modelo de distribución gamma. La media representa el centro de masa teórico para la parte delantera y siempre debe estar cerca del volumen de 1 columna, a menos que haya otros factores en el sistema que hagan que se desplace, como un gran volumen adicional de columna o la interacción entre la fase móvil y la resina. Los valores medios para las partes delanteras de equilibrio, enjuague WFI y almacenamiento tienen una distribución irregular y no se benefician de la transformación. Se recomienda aplicar límites de control de 0,80 a 1,20 CV para la media de cada una de las partes delanteras (ver la Tabla 3). Esto es apropiado porque la media no es una medida del rendimiento de la columna, sino que se usa como verificación para garantizar que el análisis fuese apropiado. Se espera que estos límites sean suficientes para identificar desviaciones significativas de los resultados de cálculo esperados. Límites de control más estrictos darían como resultado una sensibilidad innecesaria para esta comprobación, que parece variar con cada paquete de columnas.

Tabla 3. Límites de control de HETP, SS, y media recomendados para la purificación en columna SPHP durante la fabricación de REMICADE® (infiximab)

Parte delantera	Parámetro	UCL	LCL
Equilibrio	HETP	0.08 1	0.018
	SS	0.110	NA
	Media	1.20	0.80
Enjuague WFI	HETP	0.066	0.015
	SS	0.027	NA
	Media	1.20	0.80
Lavado	HETP	0.056	0.020
	SS	0.073	NA
	Media	1.20	0.80

Ejemplo 4 - Aplicación del análisis de transición de distribución gamma para la calificación de columnas de cromatografía Q2 usadas en la fabricación de REMICADE® (infiximab)

Visión general:

Este ejemplo describe la aplicación del método GDTA al paso de purificación de la columna de intercambio aniónico secundario (Q2) empleado en la fabricación de REMICADE® (infiximab). La columna Q2 es una columna de cromatografía de intercambio aniónico. El proceso de purificación incluye tres partes delanteras de transición, es decir, partes delanteras de equilibrio, separación y almacenamiento, que son apropiadas para GDTA como se describe en la presente.

El GDTA se ejecutó en 68 partes delanteras, comprendiendo 23 partes delanteras de equilibrio y separación, y 22 partes delanteras de almacenamiento. El análisis de distribución de la parte delantera gamma se realizó concurrentemente con la fabricación y no afectó al proceso de fabricación. Toda la fabricación, la monitorización y los controles se realizaron usando procedimientos actuales efectivos. Durante la cromatografía en columna de REMICADE® (infiximab), se registraron la conductividad (es decir, la señal de salida de la columna) y el flujo del eluyente (es decir, el flujo acumulado).

Además de la aplicación del GDTA al funcionamiento de la columna en tiempo real, también se recopilaron y analizaron datos históricos de 324 partes delanteras de transición procesadas en el transcurso de los cuatro años anteriores, como se describe en la presente. El conjunto de datos incluía 121 partes delanteras de equilibrio, 124 partes delanteras de separación y 79 partes delanteras de almacenamiento. Este conjunto de datos se seleccionó para proporcionar una distribución uniforme a lo largo de la vida de las columnas y representa paquetes de 10 columnas.

El GDTA para las partes delanteras de la columna Q2 se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Este análisis produjo mediciones de HETP, SS y media para cada parte delantera. Los límites de control que se derivaron para cada uno de estos tres parámetros en base a la evaluación estadística se enumeran en la Tabla 4 a continuación.

Límites de control para la columna Q2:

HETP:

La HETP está directamente relacionada con el rendimiento de la columna y también se ve afectado por otros factores en el sistema que pueden aumentar la dispersión. El resultado debe ser >0 . Los límites de control para la HETP se determinan mejor usando la transformación logarítmica natural de Box-Cox ($\lambda=0$). Los límites de control para los datos transformados se calcularon mediante Minitab usando la media ± 3 desviaciones estándar. La desviación estándar se determina en base al intervalo móvil medio. Se seleccionó un intervalo móvil de 100 para tener en cuenta la variación en el rendimiento de la columna durante la vida de la columna. Los límites de control superior e inferior se transforman inversamente (e^x) para determinar los límites de control para los datos no transformados.

En la FIG. 36 (parte delantera de equilibrado), la FIG. 37 (parte delantera de separación), y la FIG. 38 (parte delantera de almacenamiento) se muestra un gráfico de series temporales para cada resultado de HETP de la parte delantera y los límites de control. Se espera que el funcionamiento dentro de estos límites produzca un rendimiento cromatográfico aceptable en base a esta revisión histórica. Los valores por encima de los límites de control superiores pueden indicar problemas de flujo de columna y deben evaluarse adicionalmente. Los valores por debajo de los límites de control inferiores pueden ser indicativos de un error de cálculo.

Suma de cuadrados (SS):

La SS es una medida de como de bien se ajusta el modelo de distribución gamma a los datos. Esta medida se usará para garantizar que los valores de HETP calculados mediante el método GDTA representen los datos del proceso. No hay límite inferior y el resultado debe ser >0 . El límite de control superior para la SS se determina mejor usando la transformación logarítmica natural de Box-Cox ($\lambda=0$). Los límites de control para los datos transformados se calcularon mediante Minitab usando la media ± 3 desviaciones estándar. La desviación estándar se determina en base al intervalo móvil medio. Se seleccionó un intervalo móvil de 100 para tener en cuenta la variación en el rendimiento de la columna durante la vida de la columna. La desviación estándar se determinó a partir de los datos agregados para la parte delantera de almacenamiento, ya que el método de intervalo móvil produjo una desviación estándar más alta. Los límites de control se informan en la Tabla 4 a continuación. Los resultados dentro de los límites garantizarán que el modelo se ajuste tanto a los datos como a los resultados históricos. Si el resultado está fuera de este intervalo, es probable que haya una causa especial.

Media:

La media se añadió como una segunda medida de la precisión del modelo de distribución gamma. La media representa el centro de masa teórico para la parte delantera y siempre debe estar cerca del volumen de 1 columna, a menos que haya otros factores en el sistema que hagan que se desplace, como un gran volumen adicional de columna o la interacción entre la fase móvil y la resina. Los valores medios para las partes delanteras de equilibrio, separación y almacenamiento tienen una distribución irregular y no se benefician de la transformación. Se recomienda aplicar límites de control de 0,80 a 1,20 CV para la media de cada una de las partes delanteras (ver la Tabla 4). Esto es apropiado porque la media no es una medida del rendimiento de la columna, sino que se usa como verificación para garantizar que el análisis fuese apropiado. Se espera que estos límites sean suficientes para identificar desviaciones significativas de los resultados de cálculo esperados. Límites de control más estrictos darían como resultado una sensibilidad innecesaria para esta verificación, que parece variar con cada paquete de columna.

Tabla 4. Límites de control recomendados de HETP, SS y media para la purificación por columna Q2 durante la fabricación de REMICADE® (infliximab)

Parte delantera	Parámetro	UCL	LCL
Equilibrio	HETP	0.125	0.003
	SS	0.344	NA
	Media	1.20	0.80
Separación	HETP	0.184	0.019
	SS	0.156	NA
	Media	1.20	0.80
Lavado	HETP	0.265	0.024
	SS	0.691	NA
	Media	1.20	0.80

Ejemplo 5 - Procesos de fabricación para producir STELARA® (ustekinumab)

Antecedentes

El STELARA® (ustekinumab) es un anticuerpo monoclonal G1 kappa completamente humano que se une con alta afinidad y especificidad a la subunidad p40 compartida de las citoquinas interleucina (IL)-12 e IL-23 humana. El ustekinumab comprende una cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 8; las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena ligera de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6. La unión de ustekinumab a la subunidad IL-12/23p40 bloquea la unión de IL-12 o IL-23 al receptor de IL-12Rβ1 en la superficie de las células asesinas naturales y CD4⁺ T, inhibiendo la señalización intracelular específica de IL-12 e IL-23 y la posterior activación y producción de citoquinas. La regulación anormal de IL-12 e IL-23 se ha asociado con múltiples enfermedades inmunomediadas.

Hasta la fecha, el ustekinumab ha recibido aprobación de comercialización a nivel mundial, incluyendo países de América del Norte, Europa, América del Sur y la región de Asia-Pacífico, para el tratamiento de pacientes adultos, incluyendo aquellos con psoriasis en placas crónica de moderada a grave y/o artritis psoriásica activa, y la enfermedad de Crohn (CD). El ustekinumab también se está evaluando en un estudio de Fase 3 para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) activo.

Secuencias

Secuencias de anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40 ejemplares - STELARA® (ustekinumab)

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 1 de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDRH1): (SEQ ID NO: 1)
TYWLG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 2 de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDRH2): (SEQ ID NO:2)
IMSPVDSDIRYSPFQG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 3 de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDRH3): (SEQ ID NO:3)
RRPGQGYFDF

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 1 de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDRL1): (SEQ ID NO: 4)
RASQGISSWLA

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2 de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDRL2): (SEQ ID NO: 5)
AASSLQS

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 3 de la región determinante de la complementariedad del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDRL3): (SEQ ID NO: 6)
 QQYNIYPYT

5 Secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDR subrayadas): (SEQ ID NO:7)

10 1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI MSPVDSDIRY
 61 SPSFQGVVTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR PGQGYFDFWG QGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la región de la cadena ligera variable del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDR subrayadas): (SEQ ID NO: 8)

15 1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS
 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKR

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDR subrayadas): (SEQ ID NO: 10)

20 1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI MSPVDSDIRY
 61 SPSFQGVVTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR PGQGYFDFWG QGTLVTVSSS
 121 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG
 25 181 LYSLSSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVPEK SCDKHTCCPP CPAPELLGGP
 241 SVFLFPPKPK DTLMISRTP ETCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL
 361 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
 421 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KLSLSLSPGK

30 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 (CDR subrayadas): (SEQ ID NO: 11)

35 1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS
 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP
 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

Secuencia de aminoácidos de IL-12

40 Secuencia de aminoácidos de la interleucina humana (IL)-12 con subunidades alfa y beta: (SEQ ID NO: 9)

45 1 RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV
 61 EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN
 121 AKLLMDPKRQ IFLDQNLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPFDYKTK IKLCILLHAF
 181 RIRAVTIDRV MSYLNASLWE LKGDVYVVEL DWYPDAPGEM VVLTCDTPEE DGITWTLDQS
 241 SEVLGSGKTL TIQVKEFGDA GQYTCHKGGE VLSHSLLLLH KKEDGIWSTD ILKDQKEPKN
 301 KTFRLRCEAKN YSGRFTCWLL TTISTDLTFS VKSSRGSSDP QGVTCGAATL SAERVRGDNK
 361 EYEYSVECQE DSACPAEES LPIEVMVDAV HKLKYENYTS SFFIRDIKP DPPKNLQLKP
 50 421 LKNSRQVEVS WEYPDTWSTP HSYFSLTFCV QVQGKSKREK KDRVFTDKTS ATVICRKNAS
 481 ISVRAQDRYY SSSWSEWASV PCS

Casetes de expresión recombinantes

55 Puede usarse una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo, un ADNc o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo usado en el método de la presente invención, para construir un casete de expresión recombinante que puede introducirse en por lo menos una célula huésped deseada. Un casete de expresión recombinante comprenderá típicamente un polinucleótido operativamente enlazado a secuencias reguladoras del inicio transcripcional que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula huésped pretendida. Pueden emplearse promotores tanto heterólogos como no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos.

65 Los ácidos nucleicos aislados que sirven como promotores, potenciadores u otros elementos pueden introducirse en la posición adecuada (en sentido ascendente, en sentido descendente o en el intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención para regular por incremento o por disminución la

expresión de un polinucleótido. Por ejemplo, los promotores endógenos pueden alterarse in vivo o in vitro mediante mutación, delección y/o sustitución.

Vectores y células huésped

5

Los polinucleótidos pueden unirse opcionalmente a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, un vector de plásmido se introduce en un precipitado, como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede compactarse in vitro usando una línea celular de compactación apropiada y luego transducirse en células huésped.

10

El inserto de ADN debe enlazarse operativamente a un promotor apropiado. Los constructos de expresión contendrán además sitios para el inicio y la finalización de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirá preferiblemente un inicio de traducción al principio y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) colocado apropiadamente al final del ARNm a traducir, prefiriéndose UAA y UAG para la expresión de células eucarióticas o de mamíferos.

15

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente, pero opcionalmente, por lo menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, Patentes de Estados Unidos N° 4.399.216; 4.634.665; 4.656.134; 4.956.288; 5.149.636; 5.179.017, ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico, o glutamina sintetasa (GS) (Patentes de Estados Unidos N° 5.122.464; 5.770.359; 5.827.739) para el cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a la tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias o procariotas

20

25

Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica. Los vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica. La introducción de un constructo de vector en una célula huésped puede verse afectada por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Tales métodos son bien conocidos y están bien descritos en la técnica.

30

Por lo menos un anticuerpo usado en el método de la presente invención puede expresarse en una forma modificada, como una proteína de fusión, y puede incluir no solo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N terminal de un anticuerpo para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante la manipulación y el almacenamiento posteriores. Además, pueden añadirse fracciones peptídicas a un anticuerpo de la presente invención para facilitar la purificación. Tales regiones pueden eliminarse antes de la preparación final de un anticuerpo o por lo menos un fragmento del mismo. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, y los métodos son bien conocidos y están bien descritos en la técnica.

35

40

Los expertos en la técnica conocen los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína usada en el método de la presente invención. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden expresarse en una célula huésped encendiéndolos (mediante manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N°: 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y 5.733.761.

45

Las células útiles para la producción de anticuerpos, porciones específicas o variantes de los mismos, incluyen células de mamífero. Los sistemas de células de mamíferos a menudo se cultivarán en forma de monocapas de células, pero las células también pueden adaptarse para crecer en suspensión, por ejemplo, en matraces de agitación o biorreactores. En la técnica se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas capaces de expresar proteínas glicosiladas intactas, e incluyen, por ejemplo, COS-1 (por ejemplo, ATCC® CRL1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC® CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC® CCL-10), BSC-1 (por ejemplo, ATCC® CCL-26), ovario de hámster chino (CHO), Hep G2, P3X63Ag8.653, Sp2/0-Agl4, HeLa y similares, que están fácilmente disponibles, por ejemplo, de la American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células huésped incluyen células CHO y células de origen linfóide, como células de mieloma y linfoma, por ejemplo, células CHO-K1, células P3X63Ag8.653 (ATCC® CRL-1580) y células Sp2/0-Agl4 (ATCC® CRL-1581).

50

55

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de la expresión, como pero no limitadas a, un origen de replicación; un promotor (por ejemplo, promotores SV40 tardíos o tempranos, el promotor CMV (Patentes de Estados Unidos N°: 5.168.062; 5.385.839), un promotor tk de HSV, un promotor de pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor de EF-1 alfa (Patente de Estados Unidos N°: 5.266.491), por lo menos un promotor de inmunoglobulina humana; un potenciador y/o sitios de información de procesamiento, como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación (por

60

65

ejemplo, un sitio de adición de T Ag poli A grande de SV40) y secuencias de terminación transcripcional. Se conocen y/o están disponibles otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención, por ejemplo, del American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) u otras fuentes conocidas o comerciales.

5 Cuando se emplean células huésped eucarióticas, típicamente se incorporan al vector secuencias terminadoras de la poliadenilación o la transcripción. Un ejemplo de secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina. También pueden incluirse secuencias para un corte y empalme preciso de la transcripción. Un ejemplo de una secuencia de corte y empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, et al, "Expression of a recombinant DNA gene coding for the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein." J. Virol. 45:773-781 (1983)). Además, pueden incorporarse al vector secuencias de genes para controlar la replicación en la célula huésped, como se conoce en la técnica.

15 Líneas celulares de CHO

A pesar de la disponibilidad de varias otras líneas celulares de mamíferos, la mayoría de las proteínas terapéuticas recombinantes producidas hoy en día se elaboran en células de ovario de hámster chino (CHO) (Jayapal KP, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. Chem Eng Prog. 2007; 103:40-47; Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(8):3451-61). Sus fortalezas incluyen, por ejemplo, crecimiento robusto como células adherentes o en suspensión, adaptabilidad a medios libres de suero y químicamente definidos, alta productividad y un historial establecido de aprobación reguladora para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas. También son muy susceptibles a las modificaciones genéticas y los métodos para la transfección celular, la expresión de proteínas recombinantes y la selección de clones están bien caracterizados. Las células CHO también pueden proporcionar modificaciones postraduccionales compatibles con humanos. Como se usa en la presente, las "células CHO" incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-M, CHO-S, CHO GS knockout y modificaciones y derivados de las mismas.

30 Clonación y expresión en células CHO.

Un vector usado comúnmente para la expresión en células CHO es el pC4. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (ATCC® 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano SV40. Las células de ovario de hámster chino u otras células que carecen de actividad de dihidrofolato que se transfectan con estos plásmidos pueden seleccionarse cultivando las células en un medio selectivo (por ejemplo, alfa menos MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes DHFR en células resistentes al metotrexato (MTX) ha sido bien documentada (ver, por ejemplo, F. W. Alt, et al., "Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells." J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); y M. J. Page and M. A. Sydenham, "High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in Chinese hamster ovary cells." Biotechnology 9:64-68 (1991)). Las células cultivadas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al fármaco al producir en exceso la enzima objetivo, DHFR, como resultado de la amplificación del gen DHFR. Si un segundo gen está vinculado al gen DHFR, habitualmente se coamplifica y se sobreexpresa. Se sabe en la técnica que este enfoque puede usarse para desarrollar líneas celulares que llevan más de 1000 copias del gen o genes amplificados. Posteriormente, cuando se extrae el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en uno o más cromosomas de la célula huésped.

El plásmido pC4 contiene para expresar el gen de interés el fuerte promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen, et al., "Functional analysis of the transcription control region located within the avian retroviral long terminal repeat." Mol. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)) más un fragmento aislado del potenciador del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) (Boshart, et al., "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus." Cell 41:521-530 (1985)). En sentido descendente del promotor están los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718 que permiten la integración de los genes. Detrás de estos sitios de clonación, el plásmido contiene el intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de la preproinsulina de rata. También pueden usarse otros promotores de alta eficacia para la expresión, por ejemplo, el promotor de beta-actina humana, los promotores tempranos o tardíos de SV40 o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV1. También pueden usarse los sistemas de expresión génica Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares para expresar proteínas de manera regulada en células de mamíferos (M. Gossen, y H. Bujard, "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para la poliadenilación del ARNm también pueden usarse otras señales, por ejemplo, de la hormona del crecimiento humana o genes de globina. Las líneas celulares estables que portan un gen de interés integrado en los cromosomas también pueden seleccionarse tras la cotransfección con un marcador seleccionable como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso usar más de un marcador seleccionable al comienzo, por ejemplo, G418 más metotrexato.

65

Métodos generales de purificación

Un anticuerpo anti-IL-12/IL-23p40 o IL-23 puede recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos que incluyen, pero no se limitan a, purificación de proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfo celulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. También puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación.

Como se usa en la presente, los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen moléculas de anticuerpos biosimilares aprobadas bajo la Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009 (Ley BPCI) y leyes y reglamentos similares a nivel mundial. Según la Ley BCI, puede demostrarse que un anticuerpo es biosimilar si los datos muestran que es "muy similar" al producto de referencia a pesar de las diferencias menores en los componentes clínicamente inactivos y se "espera" que produzca el mismo resultado clínico que el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia (R. Dolinar, F. Lavernia, y S. Edelman. "A GUIDE TO FOLLOW-ON BIOLOGICS AND BIOSIMILARS WITH A FOCUS ON INSULIN." *Endocrine Practice*: febrero de 2018, Vol. 24, No. 2, pp. 195-204). A estas moléculas de anticuerpos biosimilares se les proporciona una vía de aprobación abreviada, por lo que el solicitante se basa en los datos clínicos del producto de referencia innovador para obtener la aprobación reguladora. En comparación con el anticuerpo de referencia innovador original que fue aprobado por la FDA en base a ensayos clínicos con éxito, a una molécula de anticuerpo biosimilar se hace referencia en la presente como "producto biológico de continuación". Como se presenta en la presente, el STELARA® (ustekinumab) es el anticuerpo innovador anti-IL-12/23p40 de referencia original que fue aprobado por la FDA en base a ensayos clínicos con éxito. El ustekinumab ha estado a la venta en los Estados Unidos desde 2009.

Como se usa en la presente, el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de anticuerpo como, por ejemplo, un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo de dominio único (sdab) un dímero scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo multiespecífico formado a partir de una porción de un anticuerpo que comprende una o más CDR, un anticuerpo de dominio único camelizado, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio bivalente o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno pero que no comprenda una estructura de anticuerpo completa. Un fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse al mismo antígeno al que se une el anticuerpo original o un fragmento de anticuerpo original. De acuerdo con realizaciones particulares, el fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera, una región constante de la cadena ligera y un segmento Fd (es decir, la porción de la cadena pesada que está incluida en el fragmento Fab). De acuerdo con otras realizaciones particulares, el fragmento de unión a antígeno comprende Fab y F(ab').

Visión general del proceso de fabricación

El STELARA® (ustekinumab) se fabrica en un proceso de 10 etapas que incluye cultivo celular por perfusión continua seguido de purificación. En la FIG. 39 se proporciona una visión general del proceso de fabricación.

Como se usa en la presente, los términos "cultivo", "cultivar", "cultivado" y "cultivo celular" se refieren a una población celular que se suspende en un medio en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como quedará claro a partir del contexto para los expertos en la técnica, estos términos como se usan en la presente, también se refieren a la combinación que comprende la población celular y el medio en el que se suspende la población. El cultivo celular incluye, por ejemplo, células cultivadas por métodos de cultivo celular por lotes, por lotes alimentados o por perfusión y similares. El cultivo celular puede ser un cultivo celular de mamífero.

Las líneas celulares incluyen líneas celulares de mamíferos que incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (células CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK), células de riñón de cría de hámster (células BHK), células de mieloma de ratón (por ejemplo, células NS0 y células Sp2/0) y células de la retina humana (por ejemplo, células PER.C6).

Como se usa en la presente, los términos "medio químicamente definido", "medios químicamente definidos", "medio de hibridoma químicamente definido" o "medios de hibridoma químicamente definidos" se refieren a un medio de crecimiento sintético en el que se conocen la identidad y la concentración de todos los componentes. Los medios químicamente definidos no contienen extractos de bacterias, levaduras, animales o plantas, suero o plasma animal, aunque pueden incluir o no componentes individuales derivados de plantas o animales (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etc.). Los medios químicamente definidos pueden contener sales inorgánicas como fosfatos, sulfatos y similares necesarios para apoyar el crecimiento. La fuente de carbono está definida y habitualmente es un azúcar como glucosa, lactosa, galactosa y similares, u otros compuestos como glicerol, lactato, acetato y similares. Mientras que ciertos medios definidos químicamente también usan sales de fosfato como tampón, pueden emplearse otros tampones como citrato, trietanolamina y similares. Los ejemplos de medios químicamente definidos

disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, medio de hibridoma CD y medio de hibridoma CD AGT™ de ThermoFisher, varios medios de Eagle modificado por Dulbecco (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), mezcla nutriente de Ham (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), combinaciones de los mismos y similares. Los métodos para preparar medios químicamente definidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.171.825 y 6.936.441, la WO 2007/077217 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2008/0009040 y 2007/0212770.

El término "biorreactor" como se usa en la presente se refiere a cualquier recipiente útil para el crecimiento de un cultivo celular. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células. Tales células pueden ser células de mamíferos. Típicamente, el biorreactor tendrá por lo menos 1 litro y puede tener 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor incluyendo, entre otras, el pH y la temperatura, opcionalmente se controlan durante el período de cultivo. El biorreactor puede estar compuesto de cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células de mamíferos suspendidos en medios en las condiciones de cultivo incluyendo vidrio, plástico o metal. El término "biorreactor de producción" como se usa en la presente se refiere al biorreactor final usado en la producción del polipéptido o glicoproteína de interés. El volumen del biorreactor de producción es típicamente de por lo menos 500 litros y puede ser de 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Un experto en la técnica conocerá y podrá elegir biorreactores adecuados para su uso en la puesta en práctica de la presente invención.

El precultivo, la expansión y la producción del ustekinumab se realizan en la Etapa 1 y la Etapa 2. En la Etapa 1, el precultivo se inicia a partir de uno o más viales de bancos de células de trabajo de células Sp2/0 transfectadas que expresan las secuencias HC y LC de ustekinumab y se expanden en matraces de cultivo, bolsas de cultivo desechables y un biorreactor de semillas de 100 l. Las células se cultivan hasta obtener la densidad celular y el volumen requeridos para la inoculación de un biorreactor de producción de 500 l. En la Etapa 2, el cultivo celular se perfunde en un biorreactor de producción de 500 l usando un sistema de retención de células con filtro de fibra hueco de flujo tangencial alterno (ATF). El permeado del cultivo celular (recogida) se recoge del sistema ATF mientras que las células se retienen dentro del biorreactor y el cultivo se repone con medio fresco. En la Etapa 3 puede combinarse la recogida desde uno o más biorreactores de producción de 500 l. Las recogidas se purifican usando cromatografía por afinidad con resina de proteína A MabSelect. El eluato de captura directa de producto (DPC) resultante se congela hasta su posterior procesamiento.

La purificación del ustekinumab a partir de DPC se realiza en la Etapa 4 a la Etapa 8 mediante pasos de cromatografía de intercambio iónico y otros pasos para inactivar o eliminar la contaminación viral potencial (tratamiento con solvente/detergente [S/D] y filtración de eliminación de virus). Los eluatos de DPC se descongelan, agrupan y filtran en la Etapa 4 y se incuban con tratamiento con fosfato de tri-n-butilo (TNBP) y polisorbato 80 S/D en la Etapa 5 para inactivar cualquier virus con envoltura lipídica presente. Los reactivos, agregados e impurezas de TNBP y polisorbato 80 se eliminan del ustekinumab en la Etapa 6, usando cromatografía de resina de intercambio catiónico de SPXL® Sepharose. El ustekinumab se purifica adicionalmente usando la cromatografía de resina de intercambio aniónico de QXL® Sepharose en la Etapa 7 para eliminar el ADN, los virus y las impurezas. En la Etapa 8, el ustekinumab purificado se diluye y se filtra a través de un filtro retentivo de virus (NFP®).

La preparación de la masa preformulada (PFB) y la masa formulada (FB) de ustekinumab se realiza en las Etapas 9 y 10, respectivamente. En la Etapa 9, el paso de ultrafiltración concentra el ustekinumab y el paso de diafiltración añade los excipientes de la formulación y elimina las sales tampón del proceso. En la Etapa 10 se añade polisorbato 80 al PFB de ustekinumab para obtener el FB. El FB se filtra en recipientes de policarbonato para almacenamiento congelado. El FB congelado se envasa en recipientes aislados con hielo seco para su transporte al sitio de fabricación del producto farmacéutico.

Descripción detallada del proceso de fabricación a gran escala

Etapa 1 - Precultivo y Expansión

La primera etapa en la producción del ustekinumab es el inicio del precultivo a partir de un vial de banco de células de trabajo (WCB) de células Sp2/0 transfectadas que expresan las secuencias HC y LC de ustekinumab y expandidas en frascos de cultivo, bolsas de cultivo desechables y un biorreactor de semillas de 100 l. Las células se cultivan hasta obtener la densidad celular y el volumen requeridos para la inoculación de un biorreactor de producción de 500 l.

Procedimiento de fabricación

Uno o más viales crioconservados de WCB se descongelan y diluyen con medio de hibridoma CD (definido químicamente) suplementado con L-glutamina 6 mM, 0,5 mg/l de ácido micofenólico, 2,5 mg/l de hipoxantina y 50 mg/l de xantina (CDH-A). La viabilidad del cultivo debe ser $\geq 45\%$. Las células se diluyen adicionalmente con CDH-A en un matraz de cultivo hasta una densidad de sembrado de $0,2$ a $0,5 \times 10^6$ células viables (VC)/ml. El precultivo se

5 mantiene en una incubadora de CO₂ humidificada, con temperatura, concentración de CO₂ y agitación controlados dentro de los intervalos definidos en el registro del lote. El precultivo se incuba durante ≤ 3 días hasta obtener una densidad celular mínima de $\geq 0,6 \times 10^6$ CV/ml y una viabilidad de cultivo $\geq 50\%$. El precultivo se expande secuencialmente en una serie de matraces de cultivo y luego en bolsas de cultivo como un mecanismo para
 10 aumentar a escala para la inoculación del biorreactor de semillas de 100 l. Durante la fase de expansión del cultivo, cada paso de incubación tarda ≤ 3 días para lograr las condiciones de paso, que requieren una densidad celular de $\geq 0,6 \times 10^6$ VC/ml y una viabilidad del cultivo de $\geq 80\%$. La densidad de sembrado para cada pase es de 0,2 a $0,5 \times 10^6$ VC/ml en matraces de cultivo y de 0,2 a $0,6 \times 10^6$ VC/ml en bolsas de cultivo. Cada pase se muestrea para determinar la densidad de células viables (VCD), la viabilidad del cultivo y el examen microscópico. Antes de la inoculación del biorreactor de semillas de 100 l, se toman muestras del precultivo para determinar la carga biológica.

15 Las expansiones de precultivo pueden mantenerse durante un máximo de 30 días después de la descongelación. Los precultivos no usados en el plazo de 30 días se descartan. Los precultivos de respaldo, expandidos como se ha descrito anteriormente y sujetos a los mismos parámetros del proceso, pruebas de control y monitorización en proceso que los precultivos primarios, pueden mantenerse y usarse para inocular otro biorreactor de semillas de 100 l según sea necesario.

20 Cuando el precultivo cumple con los criterios de inóculo, el contenido de la o las bolsas de cultivo se transfiere al biorreactor de semillas de 100 l que contiene CDH-A para alcanzar una densidad de siembra de $\geq 0,3 \times 10^6$ VC/ml. El pH, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto del cultivo del biorreactor de semillas se controlan dentro de los intervalos definidos en el registro del lote. El cultivo se expande hasta obtener una densidad celular $\geq 1,5 \times 10^6$ VC/ml y una viabilidad del cultivo $\geq 80\%$. Se toman muestras del cultivo para VCD, viabilidad del cultivo y examen microscópico durante todo el proceso del biorreactor de semillas. Antes de la inoculación del biorreactor de producción de 500 l, se toman muestras del cultivo para determinar la carga biológica.

25 Cuando el VCD del cultivo del biorreactor de siembra alcanza $\geq 1,5 \times 10^6$ VC/ml, el cultivo puede usarse para inocular el biorreactor de producción de 500 l. Alternativamente, puede extraerse una parte del cultivo del biorreactor de semillas de 100 l y el cultivo restante puede diluirse con medio fresco. Después de este proceso de "extracción y llenado", se permite que el cultivo se expanda a una densidad celular suficiente para inocular el
 30 biorreactor de producción de 500 l. La duración máxima del cultivo en biorreactor de semillas de 100 l es de 9 días después de la inoculación.

Etapa 2 - Producción del biorreactor

35 En la Etapa 2, el cultivo celular se perfunde continuamente en un biorreactor de producción de 500 l usando un sistema de retención de células de filtro de fibra hueco de flujo tangencial alterno (sistema ATF). El permeado del cultivo celular (cosecha) se recoge del sistema ATF mientras que las células se devuelven al biorreactor y el cultivo se repone con medio fresco.

40 Procedimiento de fabricación

45 La inoculación del biorreactor de producción de 500 l se realiza transfiriendo el contenido del biorreactor de semillas de 100 l al biorreactor de producción de 500 l que contiene medio de hibridoma CD (definido químicamente) suplementado con L-glutamina 6 mM, 0,5 mg/l de ácido micofenólico, 2,5 mg/l de hipoxantina y 50 mg/l de xantina (CDH-A). El volumen transferido debe ser suficiente para alcanzar una densidad de sembrado de $\geq 0,3 \times 10^6$ células viables (VC)/ml. El cultivo se mantiene a una temperatura de 34 a 38° C, un pH de 6,8 a 7,6 y una concentración de oxígeno disuelto (OD) del 1 al 100%.

50 Se inicia la perfusión continua y se extrae el cultivo del biorreactor de 500 l al sistema ATF para separar las células del permeado. El permeado se filtra a través del filtro ATF de 0,2 μm y se recoge como cosecha en recipientes de bioproceso (BPC). Las células se devuelven al biorreactor y se suministra CDH-A fresco para mantener un volumen de cultivo constante. La densidad de células viables (VCD), la viabilidad del cultivo, el pH, DO, la temperatura y el contenido de inmunoglobulina G (IgG) se monitorizan durante el ciclo de producción. La tasa de perfusión se incrementa gradualmente en proporción a la VCD hasta alcanzar una tasa objetivo de
 55 aproximadamente un volumen de biorreactor por día. Se controla la tasa de perfusión, que no exceda los 1,20 volúmenes de biorreactor por día. La retención del sistema ATF se monitoriza para facilitar el apagado de un filtro de ATF antes de la retención de IgG a través del filtro exceda el 50%.

60 Cuando el VCD dentro del biorreactor de 500 l alcanza $8,0 \times 10^6$ VC/ml o el día 10, lo que ocurra primero, el objetivo de pH se reduce de 7,2 a 7,1. La eliminación de biomasa se inicia el día 20 o cuando se alcanza un VCD de $12,0 \times 10^6$ VC/ml, lo que ocurra primero. La biomasa se extrae del biorreactor de producción de 500 l a BPC a una tasa de hasta el 20% del volumen del biorreactor por día. Cada cosecha se muestrea para determinar la carga biológica.

65 La operación de cultivo celular de perfusión continua en el biorreactor de producción de 500 l continúa

durante hasta 46 días después de la inoculación. Al final de la producción, se toman muestras del cultivo para detectar micoplasmas y virus adventicios. La cosecha puede almacenarse durante ≤ 30 días a una temperatura de 2 a 8° C después de la desconexión del biorreactor.

5 **Etapa 3 - Captura directa de productos (DPC)**

En la Etapa 3, la cosecha de uno o más biorreactores de producción de 500 l se clarifica y purifica usando una columna de cromatografía por afinidad de proteína A MabSelect™ (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) usando una plataforma de cromatografía automatizada. El ustekinumab se captura de la cosecha y se eliminan las impurezas del cultivo celular, incluyendo las impurezas de la célula huésped. El eluato de DPC resultante se congela hasta su posterior procesamiento.

Preparación y regeneración de columnas de proteína A

Antes de la carga de cosecha, la columna de cromatografía por afinidad de proteína A MabSelect™ compactada se equilibra con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, polisorbato 80 al 0,1%, tampón de pH 7,3 (tampón de equilibrio). Se monitorizan la conductividad y el pH para garantizar que la columna esté totalmente equilibrada. Se toman muestras del efluente de la columna y se monitorizan para garantizar el control microbiano. Después del uso, la columna se higieniza, luego se enjuaga y se almacena, si corresponde, en una condición de almacenamiento adecuada.

Procedimiento de fabricación

Se toman muestras de la cosecha para determinar el contenido de carga biológica, endotoxinas e inmunoglobulina G. Se añade tampón de ácido etilendiaminotetraético (EDTA) 0,1 M, pH 8,0 en línea con la cosecha para lograr una concentración final de EDTA de 5 a 30 mM. La cosecha se filtra a 0,2 μm y se carga en la columna de Proteína A con una relación de carga de 14 a 41 g/l y un caudal de 300 a 500 cm/h. La columna se lava con tampón de equilibrio a un caudal de 300 a 500 cm/h hasta que la absorbancia UV a 280 nm (A_{280}) vuelve a ≤ 100 mAU/mm y luego se lava con por lo menos dos volúmenes adicionales de columna (CV) de tampón de equilibrio. El ustekinumab unido se lava con por lo menos 4,5 CV de tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 5,0 a un caudal de 300 a 500 cm/h.

El ustekinumab se eluye usando citrato 0,1 M, pH 3,5 a un caudal de 300 a 500 cm/h. La recogida del producto eluido comienza con una señal A_{280} ascendente de ≥ 50 mAU/mm de longitud de trayectoria y se detiene con una señal A_{280} descendente de ≥ 50 mAU/mm de longitud de trayectoria.

Después de la recogida, el pH del eluato de DPC se ajusta a 5,8 a 6,2 mediante la adición de tampón Tris 1,0 M y/o tampón de citrato de sodio 0,1 M según sea necesario. Durante el ajuste del pH, el eluato de DPC se mezcla para garantizar la homogeneidad de la solución. Se toman muestras del eluato de DPC con el pH ajustado para determinar la carga biológica antes de la filtración.

El eluato de DPC con pH ajustado se filtra usando un filtro final de 0,2 μm . El eluato de DPC se divide en alícuotas en recipientes de policarbonato. El eluato de DPC filtrado se muestrea para el análisis del contenido de monómero, la carga biológica, la endotoxina y la concentración de proteínas (a partir de los cuales se calcula el rendimiento del paso y se espera que sea $\geq 60\%$). El eluato de DPC filtrado puede conservarse durante un tiempo acumulativo de ≤ 48 horas a temperatura ambiente y ≤ 240 horas entre 2 y 8° C antes de almacenarlo a $\leq -40^\circ\text{C}$. El eluato de DPC puede almacenarse congelado.

50 **Etapa 4 - Descongelación y agrupación de eluatos de captura directa de producto (DPC)**

En la Etapa 4, los eluatos de DPC se descongelan, se agrupan y se filtran antes de la inactivación viral con solvente/detergente.

Procedimiento de fabricación

Los eluatos de DPC congelados se descongelan a temperatura ambiente. La descongelación se completa una vez que los eluatos están visiblemente libres de hielo; la descongelación no debe exceder las 120 horas. Los eluatos descongelados se agrupan y se filtran a 0,2 μm en un recipiente cerrado para obtener de 2,7 a 5,4 kg de proteína. El eluato filtrado se mezcla para garantizar la homogeneidad de la solución. Se toman muestras para la concentración de proteínas, endotoxinas, biocarga y pH. La concentración de proteínas se mide para que sea de 4,5 y 59 g/l. Luego se ajusta el pH a de 5,5 a 6,5 mediante la adición de Tris 1,0 M o ácido cítrico 1,0 M, según sea necesario. Los eluatos de DPC agrupados pueden almacenarse hasta 48 horas a temperatura ambiente antes de continuar con el procesamiento en la Etapa 5.

65

Etapa 5 - Tratamiento con solvente/detergente (S/D) de eluatos agrupados de captura directa de producto (DPC)

En la Etapa 5, los eluatos de DPC agrupados se incuban con fosfato de tri-n-butilo (TNBP) y polisorbato 80 (tratamiento con solvente/detergente [S/D]) para inactivar cualquier virus con envoltura lipídica potencialmente presente.

Procedimiento de fabricación

Se transfiere una solución madre S/D que contiene un 2% de TNBR/10% de polisorbato 80 (p/p) al recipiente que contiene los eluatos de DPC agrupados en una proporción de 0,08 a 0,12 (v/v) para proporcionar una concentración final de 0,2% de TNBP/1% de polisorbato 80 (p/v). La solución se mezcla para garantizar la homogeneidad de la solución y luego se transfiere al recipiente de inactivación. El ustekinumab y los reactivos de tratamiento de S/D se incuban a $\geq 15^{\circ}$ C con mezclado continuo. La inactivación comienza cuando el ustekinumab tratado con S/D se transfiere por completo al recipiente de inactivación y finaliza cuando la fase de carga de la columna de cromatografía de intercambio catiónico comienza en la Etapa 6. El tiempo total de inactivación es de ≥ 60 minutos. El tiempo total desde el inicio de la adición del reactivo S/D hasta el final de la fase de carga de la columna en la Etapa 6 es de ≤ 36 horas.

Etapa 6 - Cromatografía de intercambio catiónico

En la Etapa 6, el ustekinumab tratado con solvente/detergente (S/D) se une a una columna de cromatografía de intercambio catiónico SP Sepharose XL (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) conectada a una plataforma de cromatografía automatizada. Se eliminan los reactivos de tri-n-butil fosfato (TNBP) y polisorbato 80, los agregados y las impurezas.

Preparación y regeneración de columnas de cromatografía de intercambio catiónico

Antes de su uso, la columna de cromatografía de intercambio catiónico SP Sepharose XL compactada se equilibra con tampón de fosfato de sodio 30 mM, pH 6,5 (tampón de equilibrio). Se monitorizan la conductividad y el pH para garantizar que la columna esté totalmente equilibrada. Se toman muestras del efluente de la columna y se monitorizan para garantizar el control microbiano. Después de su uso, se desprende de la columna la proteína residual, se regenera y se desinfecta y se almacena en una solución de almacenamiento apropiada.

Procedimiento de fabricación

El ustekinumab tratado con S/D se diluye en línea con agua para inyección para mantener la conductividad entre 2,4 y 3,4 mS/cm y se carga en la columna de cromatografía de intercambio catiónico SP Sepharose XL equilibrada. Todos los caudales de carga, lavado y elución son de 100 a 300 cm/h. La proporción entre el producto y la carga de resina es de 45,5 a 90,9 g de ustekinumab/l de resina. La columna se lava con ≥ 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrio. Luego, el ustekinumab se eluye de la columna de intercambio catiónico usando tampón de fosfato de sodio 30 mM, cloruro de sodio 50 mM, tampón de pH 6,5. La recogida del producto se inicia cuando la absorbancia UV del efluente de la columna a 280 nm (A_{280}) aumenta a un mínimo de 25 mAU/mm. Se monitoriza el pico A_{280} y la recogida finaliza cuando el efluente disminuye a no menos de 150 mAU/mm. El producto eluido se muestrea para el análisis de carga biológica.

El eluato se filtra a través de un filtro de 0,2 μ m en un recipiente cerrado. Luego se mezcla el ustekinumab purificado por intercambio catiónico y se toman muestras para determinar la carga biológica y la endotoxina. El rendimiento se monitoriza y se espera que sea $\geq 85\%$. El ustekinumab puede mantenerse a temperatura ambiente durante un máximo de 72 horas y entre 2 y 8° C durante un máximo de 7 días antes de continuar con el procesamiento.

Etapa 7 - Cromatografía de intercambio aniónico

En la Etapa 7, el ustekinumab se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) usando una plataforma de cromatografía automatizada. El ustekinumab fluye a través de la resina mientras se retiene el ADN, otras impurezas y virus.

Preparación de la columna de cromatografía de intercambio aniónico

Regeneración antes del uso, la columna de cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL compactada se equilibra con Tris 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 8,0 (tampón de equilibrio). Se monitorizan la conductividad y el pH para garantizar que la columna esté totalmente equilibrada. Se toman muestras del efluente de la columna y se monitorizan para garantizar el control microbiano. Después de su uso, se desprende de la columna la proteína residual, se regenera, se higieniza y se almacena en una solución apropiada.

Procedimiento de fabricación

Antes de la carga, el pH del eluato de intercambio catiónico se ajusta añadiendo Tris 1,0 M o ácido cítrico 1,0 M según sea necesario hasta que el pH sea de 7,5 a 8,0. El eluato se mezcla para garantizar la homogeneidad de la solución. El ustekinumab con pH ajustado se carga en la columna de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL a un caudal de 50 a 250 cm/h. La proporción entre el producto y la carga de resina es de 45,5 a 136,4 g ustekinumab/l de resina.

El ustekinumab fluye a través de la resina sin unirse y se recoge una vez que la absorbancia UV a 280 nm (A_{280}) aumenta a un mínimo de 30 mAU/mm. Después de cargar el ustekinumab, la columna se lava con tampón de equilibrio a un caudal de 50 a 250 cm/h. Se monitoriza el pico A_{280} y la recogida finaliza cuando el efluente disminuye a no menos de 50 mAU/mm. El producto eluido se muestrea para el análisis de carga biológica.

El ustekinumab se filtra a través de un filtro de 0,2 μm en un recipiente cerrado, se mezcla y se toman muestras de carga biológica y endotoxina. El rendimiento se monitoriza y se espera que sea $\geq 85\%$. El ustekinumab purificado por intercambio aniónico puede mantenerse a temperatura ambiente hasta 72 horas o a de 2 a 8° C durante hasta 7 días antes del procesamiento adicional en la Etapa 8.

Etapa 8 - Filtración para eliminación de virus

En la Etapa 8, el ustekinumab purificado por intercambio aniónico se diluye con Tris 50 mM, NaCl 50 mM, tampón de pH 8,0 y se filtra a través de un filtro de retención viral (NFP®) para eliminar cualquier virus potencialmente presente.

Preparación del sistema de filtración NFP

Antes de su uso, los filtros NFP de un solo uso esterilizados en autoclave se instalan en el sistema de filtración NFP desinfectado y se enjuagan con agua para inyección (WFI) y luego se prueba la permeabilidad al agua. Los filtros se equilibran con Tris 50 mM, NaCl 50 mM, tampón de pH 8,0 (tampón de equilibrio). La conductividad y el pH se monitorizan para garantizar que el sistema esté completamente equilibrado. Las muestras se toman del lavado del tampón y se monitorizan para garantizar el control microbiano. El sistema de filtración NFP se desinfecta después de su uso y se almacena en una solución de almacenamiento apropiada.

Procedimiento de fabricación

Antes de la filtración, el ustekinumab purificado por intercambio aniónico se diluye con tampón de equilibrio hasta una concentración de $\leq 8,2$ g/l. Luego, el ustekinumab diluido se filtra a través de los filtros NFP y el filtrado NFP se recoge en un recipiente de acero inoxidable. Se determina un caudal inicial en el plazo de 5 minutos desde el inicio de la filtración, y se monitoriza la caída del flujo para garantizar que la caída del flujo desde el flujo inicial (definido como una caída del flujo del 0%) no supere el 85%. Una vez que se completa la filtración NFP, la plataforma se enjuaga con un tampón de equilibrio y el producto restante se recoge en el recipiente de acero inoxidable donde se mezcla y se toman muestras de endotoxinas, carga biológica y concentración de proteínas. El rendimiento se monitoriza y se espera que sea $\geq 85\%$. El filtrado NFP de ustekinumab puede mantenerse a temperatura ambiente durante hasta 72 horas y a de 2 a 8° C durante hasta 7 días antes del procesamiento adicional en la Etapa 9.

Etapa 9 - Concentración y diafiltración

En la Etapa 9, el paso de ultrafiltración concentra el ustekinumab y el paso de diafiltración añade los excipientes de formulación y elimina las sales tampón en el proceso.

Preparación del sistema de ultrafiltración

Antes de su uso, el sistema se equilibra con tampón Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Se monitorizan la conductividad y el pH para garantizar que el sistema esté completamente equilibrado. Las muestras se toman del lavado del tampón y se monitorizan para garantizar el control microbiano. Después de su uso, el sistema de ultrafiltración se higieniza. El WFI se descarga a través del sistema y se realiza una prueba de permeabilidad al agua normalizada. Si es necesario, el sistema de ultrafiltración se almacena en una solución de almacenamiento apropiada.

Procedimiento de fabricación

El filtrado de retención viral de ustekinumab se preconcentra a 36 a 82 g/l. Luego, el producto se diafiltra contra histidina 10 mM, sacarosa al 8,5%, tampón de pH 5,7 durante ≥ 8 diavolumenes, hasta que el pH y la conductividad del permeado estén entre 5,5 y 5,9 y entre 400 y 700 $\mu\text{s/cm}$, respectivamente. El ustekinumab se

concentra adicionalmente a no más de 180 g/l. A lo largo del proceso, se monitoriza y controla la presión transmembrana. El producto se recupera con un enjuagado de tampón usando histidina 10 mM, sacarosa al 8,5%, tampón de pH 5,7. La concentración final de ustekinumab se ajusta con este mismo tampón a una concentración de proteína de 86,7 a 95,8 g/l y se denomina volumen preformulado (PFB). Se monitoriza el rendimiento para la Etapa 9 y se espera que sea de $\geq 5\%$. Si es necesario, el ustekinumab puede reprocesarse para obtener la concentración de proteína correcta repitiendo los pasos de concentración hasta el sistema de ultrafiltración. El producto se mezcla para garantizar la homogeneidad de la solución. El ustekinumab PFB se almacena a temperatura ambiente o entre 2 y 8° C durante un máximo de 48 horas.

10 Etapa 10 - Preparación de Volumen Formulado

En la Etapa 10, se añade polisorbato 80 al volumen preformulado (PFB) de ustekinumab para obtener el volumen formulado (FB). El FB se filtra en recipientes de policarbonato para el almacenamiento congelado.

15 Procedimiento de fabricación

Se añade un uno por ciento de polisorbato 80 en una proporción de 0,003 a 0,005 kg/l al PFB de ustekinumab en el recipiente de PFB cerrado y se mezcla para obtener la solución de FB. La solución de FB se mezcla de acuerdo con parámetros validados para garantizar la homogeneidad de la solución. La solución de FB puede almacenarse a temperatura ambiente o a entre 2 y 8° C durante hasta 48 horas antes de la filtración. La solución de FB se filtra utilizando un prefiltro de un solo uso en el recipiente de FB y se mezcla. La FB mezclada se filtra luego a 0,2 μm en recipientes de policarbonato. Se toman muestras para pruebas de liberación. Los contenedores de FB de ustekinumab se almacenan a $\leq 40^\circ\text{C}$.

25 Ejemplo 6 - Aplicación del método de análisis de transición de distribución gamma (GDTA) para fabricación de columnas de cromatografía usadas en STELARA® (ustekinumab)

Este ejemplo describe la aplicación del método GDTA para columnas de cromatografía en la purificación durante la fabricación de anticuerpos anti-TNF, por ejemplo, el anticuerpo anti-TNFa SIMPONI® (golimumab), por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad con proteína A usada durante la Etapa 3 de la fabricación.

Etapa 3 - Columna de cromatografía de afinidad de proteína A

Para la Etapa 3, usando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A MabSelect™, las partes delanteras de transición analizadas incluyeron, por ejemplo, la parte delantera de lavado 2 (FIG. 40), y la parte delantera generada durante la elución (FIG. 41). Las partes delanteras adicionales generados durante la limpieza de la columna después de la higienización y el paso de enjuague posterior al equilibrio del almacenamiento también se están evaluando actualmente para la columna de cromatografía de afinidad de Proteína A MabSelect™. Los resultados que se muestran representan el análisis de lotes procesados en 13 paquetes de columnas diferentes usados para la fabricación de STELARA® (ustekinumab). La evaluación preliminar de las tendencias muestra cierta desviación aparente en el rendimiento de la columna y algunas diferencias observadas entre paquetes de columnas. Un análisis completo de estos datos, incluyendo la comparación con otra información de los lotes disponible y los datos de rendimiento de las columnas se completarán para establecer límites de control para su uso en la implementación futura del método GDTA para la monitorización en tiempo real del proceso.

45 Ejemplo 7 - Aplicación del método de análisis de transición de distribución gamma (GDTA) para columnas de cromatografía usadas en la fabricación de SIMPONI® (golimumab)

Este ejemplo describe la aplicación del método GDTA a columnas de cromatografía en la purificación durante la fabricación del anticuerpo anti-TNFa SIMPONI® (golimumab), por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad de proteína A en la Etapa 3, una columna de cromatografía de intercambio catiónico en la Etapa 6 y una columna de cromatografía de intercambio aniónico en la Etapa 7. Estas Etapas y las columnas usadas en los métodos de fabricación de SIMPONI® (golimumab) son comparables a las usadas para la fabricación de STELARA® (ustekinumab).

Etapa 3 - Columna de cromatografía de afinidad de proteína A

Para la Etapa 3, usando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A MabSelect™, las partes delanteras de transición analizadas incluyeron, por ejemplo, la parte delantera de elución (FIG. 42), la parte delantera generada durante la higienización con guanidina HCl (FIG. 43) y la parte delantera generada durante el enjuague posterior a la higienización con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5 (FIG. 44). Los resultados mostrados representan el análisis de 160 lotes de SIMPONI® (golimumab). La evaluación preliminar de las tendencias muestra cierta desviación aparente en el rendimiento de la columna y algunas diferencias observadas entre paquetes de columnas. Se completará un análisis completo de estos datos, incluyendo la comparación con otra información de lotes disponible y los datos de rendimiento de las columnas para establecer límites de control para su uso en la

implementación futura del método GDTA para la monitorización de procesos en tiempo real.

Etapa 6 - Columna de cromatografía de intercambio catiónico

5 Para la Etapa 6, usando una columna de cromatografía de intercambio catiónico UNOsphere S™, las partes delanteras de transición analizadas incluyeron, por ejemplo, la parte delantera generada durante la carga del material tratado con solvente/detergente (S/D) (FIG. 45), la parte delantera generada durante la elución (FIG. 46), y la parte delantera generada durante la separación (FIG. 47). Los resultados mostrados representan el análisis de 72 lotes de SIMPONI® (golimumab). La evaluación preliminar de las tendencias muestra cierta desviación aparente en el rendimiento de las columnas y algunas diferencias observadas entre los paquetes de columnas. Se completará un análisis completo de estos datos, incluyendo la comparación con otra información de los lotes disponible y los datos de rendimiento de las columnas para establecer límites de control para su uso en la implementación futura del método GDTA para la monitorización de procesos en tiempo real.

15 **Etapa 7 - Columna de cromatografía de intercambio aniónico**

Para la Etapa 7, usando una columna de cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose™ XL, las partes delanteras de transición analizadas incluyeron, por ejemplo, la parte delantera generada durante la limpieza con hidróxido de sodio (FIG. 48) y la parte delantera generada durante la separación (FIG. 49). Los resultados mostrados representan el análisis de 71 lotes de SIMPONI® (golimumab). La evaluación preliminar de las tendencias muestra cierta desviación aparente en el rendimiento de las columnas y algunas diferencias observadas entre los paquetes de columnas. Se completará un análisis completo de estos datos, incluyendo la comparación con otra información de los lotes disponible y los datos de rendimiento de las columnas para establecer límites de control para su uso en la implementación futura del método GDTA para la monitorización de procesos en tiempo real.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.
Randolph, Paul

<120> CALIFICACIÓN DE COLUMNAS DE CROMATOGRFÍA EN MÉTODOS DE FABRICACIÓN PARA PRODUCIR COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-IL12/IL23

<130> JBI6082USNP1

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Tyr Trp Leu Gly
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 10
<212> PRT

ES 2 914 987 T3

	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Ser	Ile	Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr
				100					105					110		
5	Gln	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Met	Asn	Ala	Lys	Leu	Leu	Met	Asp	Pro	Lys
			115					120					125			
10	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu	Asp	Gln	Asn	Met	Leu	Ala	Val	Ile	Asp	Glu	Leu
		130					135					140				
15	Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu	Thr	Val	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser
	145					150					155					160
20	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Phe	Tyr	Lys	Thr	Lys	Ile	Lys	Leu	Cys	Ile	Leu
					165					170					175	
25	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ile	Arg	Ala	Val	Thr	Ile	Asp	Arg	Val	Met	Ser
				180					185					190		
30	Tyr	Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Trp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr	Val	Val
			195					200					205			
35	Glu	Leu	Asp	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu	Thr
		210					215					220				
40	Cys	Asp	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser
	225					230					235					240
45	Ser	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Glu
				245						250					255	
50	Phe	Gly	Asp	Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu
			260						265					270		
55	Ser	His	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser
			275					280					285			
60	Thr	Asp	Ile	Leu	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu
		290					295					300				
65	Arg	Cys	Glu	Ala	Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Leu
	305					310					315					320
70	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	Gly
					325					330					335	
75	Ser	Ser	Asp	Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala
				340					345					350		

ES 2 914 987 T3

Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys
 355 360 365
 5
 Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu
 370 375 380
 10
 Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser
 385 390 395 400
 15
 Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu
 405 410 415
 20
 Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu
 420 425 430
 25
 Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe
 435 440 445
 30
 Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val
 450 455 460
 35
 Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser
 465 470 475 480
 40
 Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu
 485 490 495
 45
 Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 500
 <210> 10
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 50
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 55
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 60
 Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 65
 Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

ES 2 914 987 T3

	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Ile	Thr	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
5	Leu	Gln	Trp	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
10	Ala	Arg	Arg	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
15	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115					120					125			
20	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135					140				
25	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
30	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
35	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
40	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
45	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
50	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
55	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
					245					250					255	
60	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270		
65	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
			275				280						285			
70	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
75	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320

ES 2 914 987 T3

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 5 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 10 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 15 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 20 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 25 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 30 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 35 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 40 Lys
 <210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 55 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 60 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

ES 2 914 987 T3

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 10 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 15 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 20 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 25 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 30 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 35 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 40 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

REIVINDICACIONES

1. Un método para manejar una columna de cromatografía en métodos de fabricación para producir anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, composiciones farmacéuticas específicas de los anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en donde los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40 comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de: una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (ii) una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 8; y (iii) secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena pesada de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO:3, y secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena ligera de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y SEQ ID NO:6, dicho método comprendiendo:

recoger la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil durante una primera operación de la columna de cromatografía que comprende compactación de columna;
determinar una curva de distribución acumulativa gamma del modelo en base a la señal de salida de columna y parámetros de flujo acumulados recopilados para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula la para una parte delantera de transición ascendente o la Fórmula Ib para una parte delantera de transición descendente,

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

o

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

en donde C es la señal de salida de la columna para un V dado, V es el flujo acumulado dividido por el volumen de la columna, y k, θ , y V_i son los parámetros de forma, escala e inclinación usados para definir la curva; calcular un valor de placa teórica equivalente de altura (HETP) para por lo menos una parte delantera de transición de fase móvil usando la Fórmula II y los parámetros de curva de distribución acumulativos gamma del modelo de k, θ , y V_i ,

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

Formula II

en donde

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

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

L = longitud de la columna; y evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicho valor de HETP calculado.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además: acondicionar, reemplazar o volver a compactar la columna de cromatografía en base a dicha evaluación.

3. El método de la reivindicación 1 que comprende además:

recoger la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados en dos o más intervalos de una parte delantera de transición de fase móvil correspondiente durante uno o más usos posteriores de la compactación de la columna de cromatografía;
realizar dicha determinación y dicho cálculo usando la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados recopilados durante cada uno de los uno o más usos posteriores de la compactación de la columna de cromatografía;
determinar un valor de HETP de la compactación de la columna de cromatografía durante cada uno de dichos

- uno o más usos posteriores en base a dicho rendimiento;
recopilar una tendencia de los valores de HETP determinados de la compactación de la columna de cromatografía de los dos o más usos posteriores; y
identificar un cambio en la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a dicha tendencia recopilada, en donde dicho acondicionamiento, reemplazo o recompactación de la columna de cromatografía se basa en dicha identificación.
- 5
4. El método de la reivindicación 3, en donde un aumento en el valor de HETP de la compactación de la columna de cromatografía en uno o más usos posteriores de dicha compactación de la columna en comparación con el valor de HETP de la compactación de la columna de cromatografía en uno o más usos anteriores de dicha compactación de la columna identifica una disminución en la calidad de la compactación de la columna de cromatografía.
- 10
5. El método de la reivindicación 2, en donde se recogen la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados de dos o más partes delanteras de transición de fase móvil diferentes durante dicha primera operación de la compactación de la columna, dicho método comprendiendo:
- 15
- realizar dicha determinación y cálculo usando la señal de salida de la columna y los parámetros de flujo acumulados para cada una de las dos o más partes delanteras de transición de fase móvil diferentes independientemente para calcular un valor de HETP para cada una de las dos o más partes delanteras de transición de fase móvil diferentes;
- 20
- evaluar la calidad de la compactación de la columna de cromatografía en base a los dos o más valores de HETP calculados, por lo que dicho acondicionamiento, reemplazo o recompactación de la columna de cromatografía se basa en dicha evaluación.
- 25
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la columna de cromatografía se selecciona del grupo que consiste de: una columna de cromatografía de afinidad con proteína A, una columna de cromatografía de intercambio catiónico y una columna de cromatografía de intercambio aniónico.
- 30
7. El método de la reivindicación 6, en donde la parte delantera de transición de fase móvil en la columna de cromatografía de afinidad de Proteína A se genera a partir de una o más partes delanteras seleccionadas del grupo que consiste de: una parte delantera de lavado generada durante la purificación de los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, una parte delantera generada durante la elución de los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, una parte delantera generada durante la desinfección de la columna con guanidina HCl, y una parte delantera generada durante el enjuague posterior a la desinfección de la columna con citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5.
- 35
8. El método de la reivindicación 6, en donde la parte delantera de transición de fase móvil en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se genera a partir de una o más partes delanteras seleccionadas del grupo que consiste de: una parte delantera generada durante la carga de material tratado con solvente/detergente (S/D) que comprende los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, una parte delantera generada durante la elución de los anticuerpos anti-IL-12/IL-23p40, y una parte delantera generada durante una separación de columna.
- 40
9. El método de la reivindicación 6, en donde la parte delantera de transición de fase móvil en la columna de cromatografía de intercambio aniónico se genera a partir de una o más partes delanteras seleccionadas del grupo que consiste de: una parte delantera generada durante la limpieza de la columna con hidróxido de sodio y una parte delantera generada durante la separación de columna.
- 45

Análisis frontal - Columna DPC (Lavado)

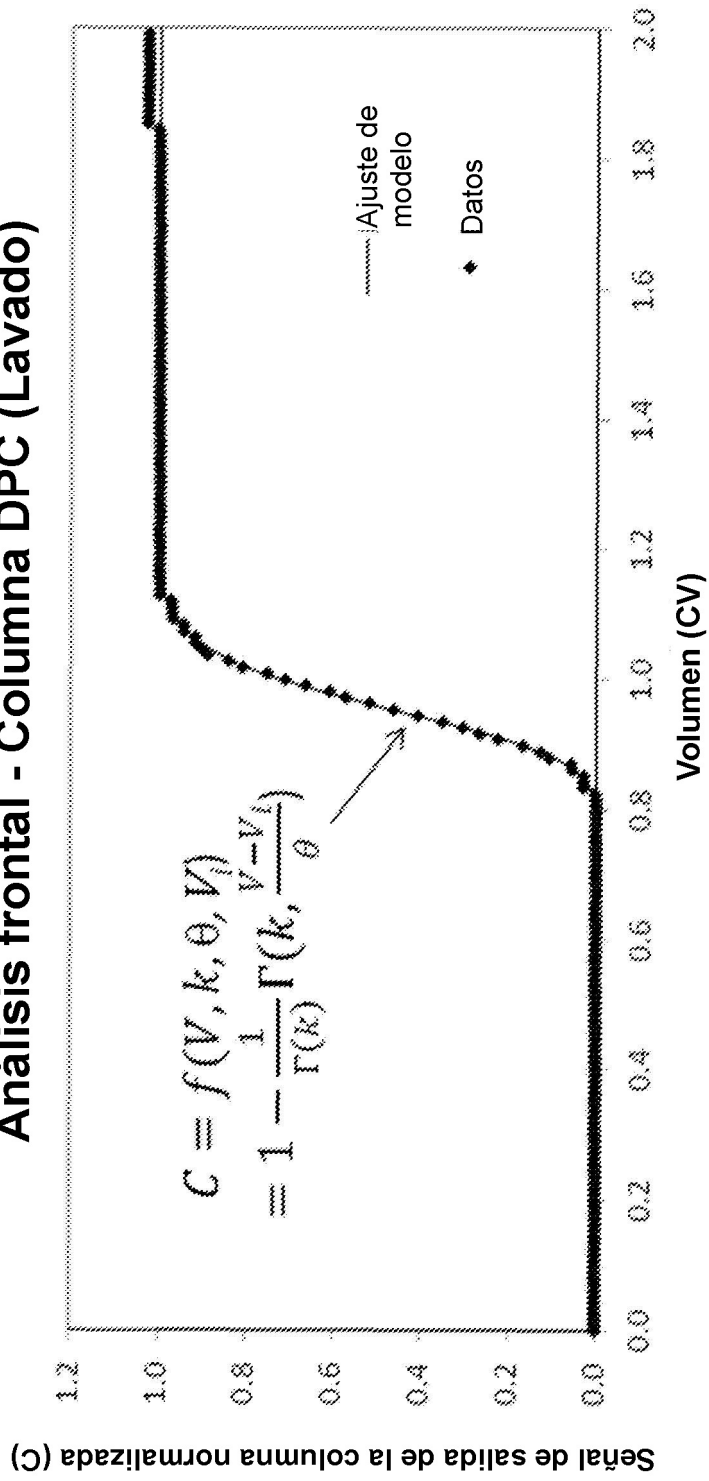


FIG. 1A

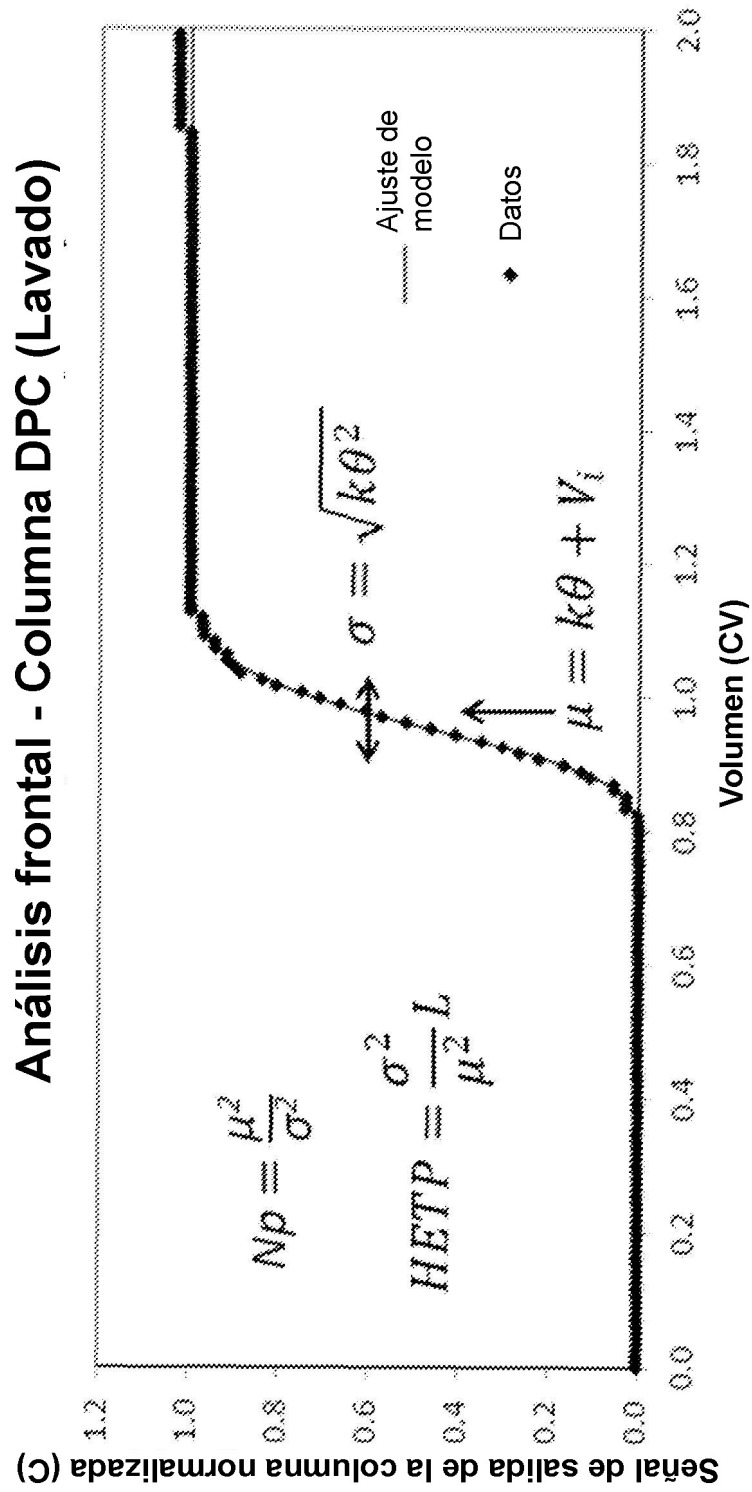


FIG.1B

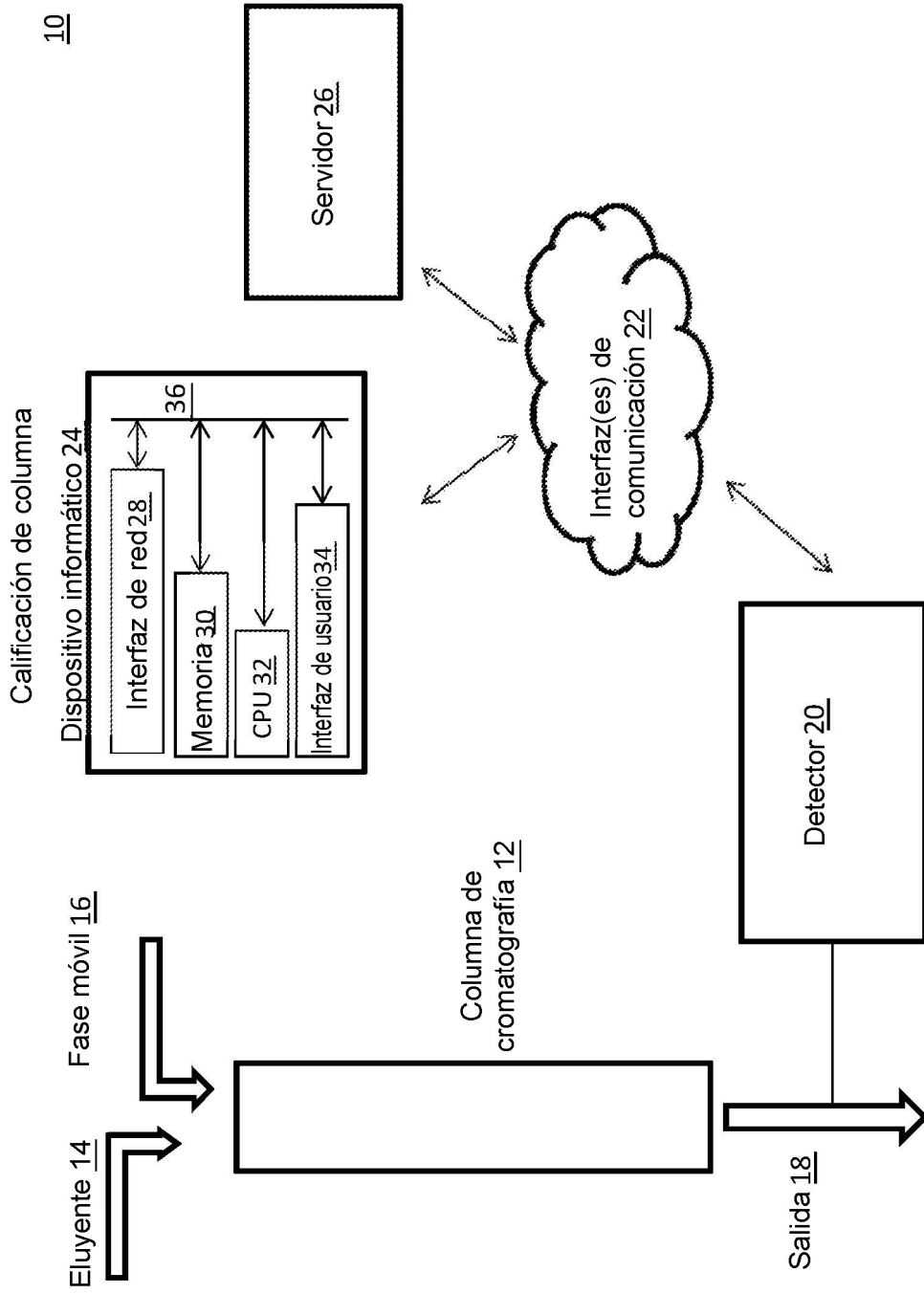


FIG. 2

Gráfico de probabilidad de HETP para equil. DPC
Normal - 95% CI

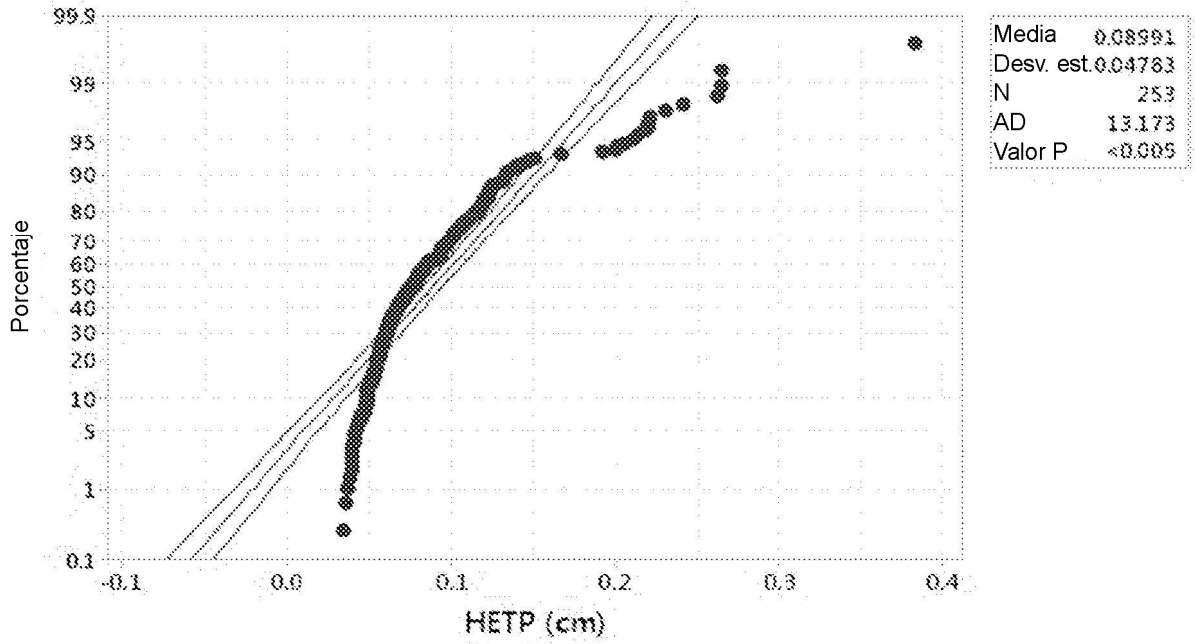


FIG. 3

Gráfico de probabilidad de ss para equil. DPC
Normal - 95% CI

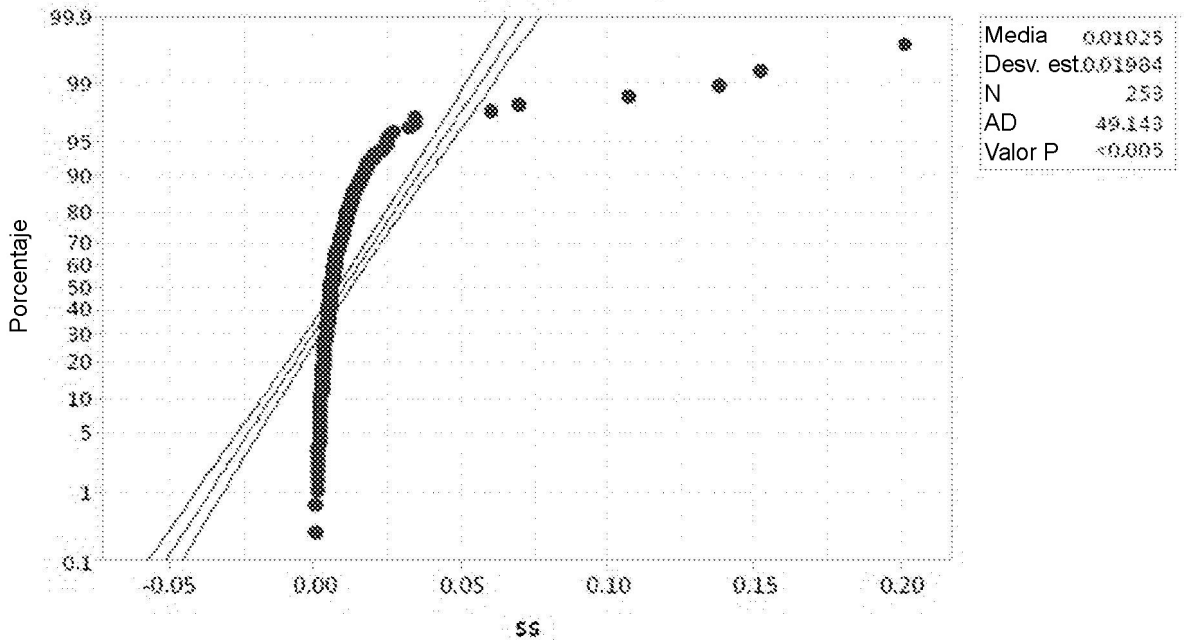


FIG. 4

Gráfico de probabilidad de HETP para lavado DPC

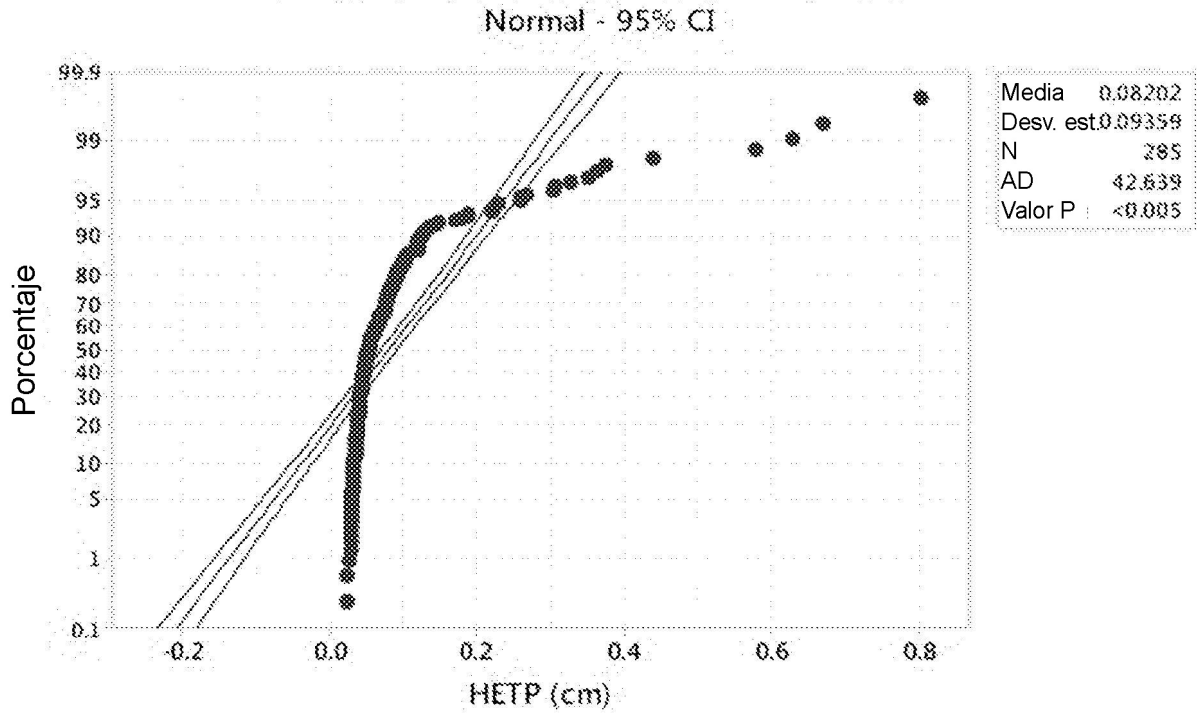


FIG. 5

Gráfico de probabilidad de ss para lavado DPC

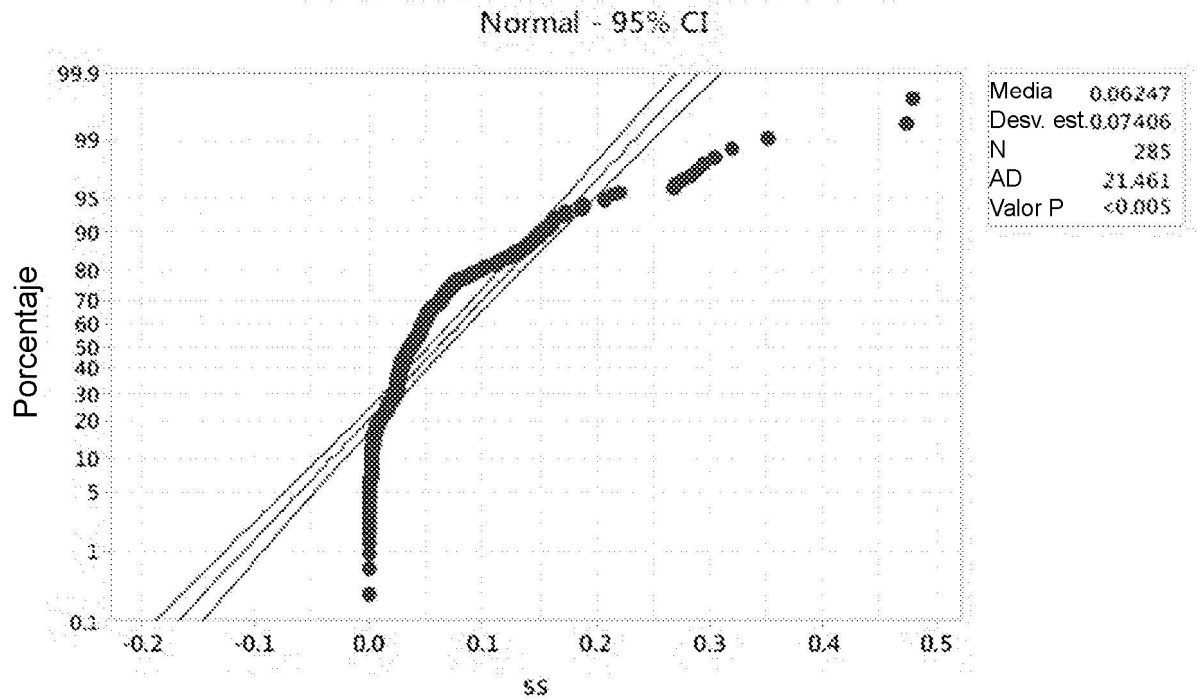


FIG. 6

Gráfico de probabilidad de HETP transformada para equil. DPC

Normal - 95% CI

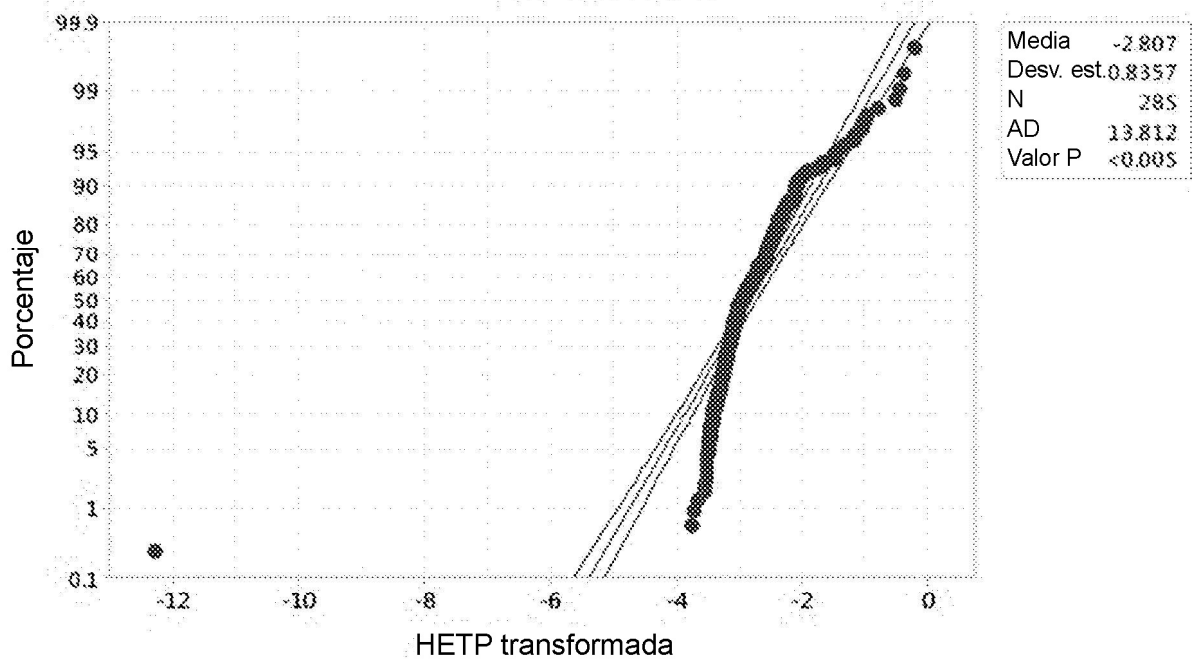


FIG. 7

Gráfico de probabilidad de ss transformada para equil. DPC

Normal - 95% CI

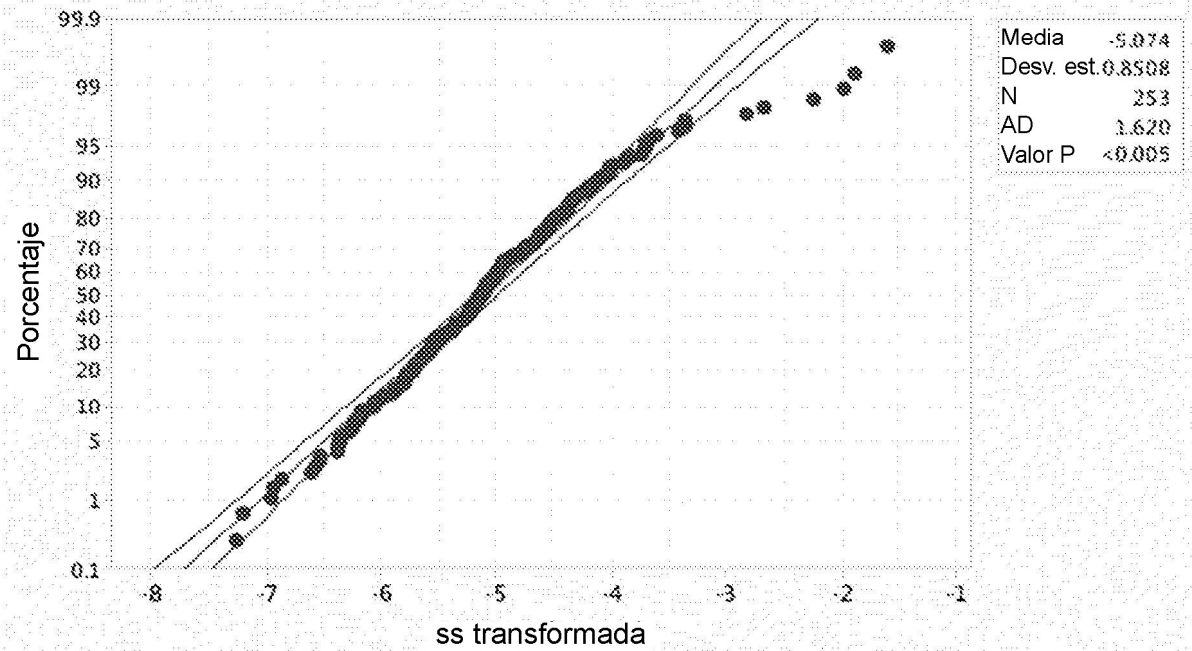


FIG. 8

Gráfico de probabilidad de HETP transformada para lavado DPC

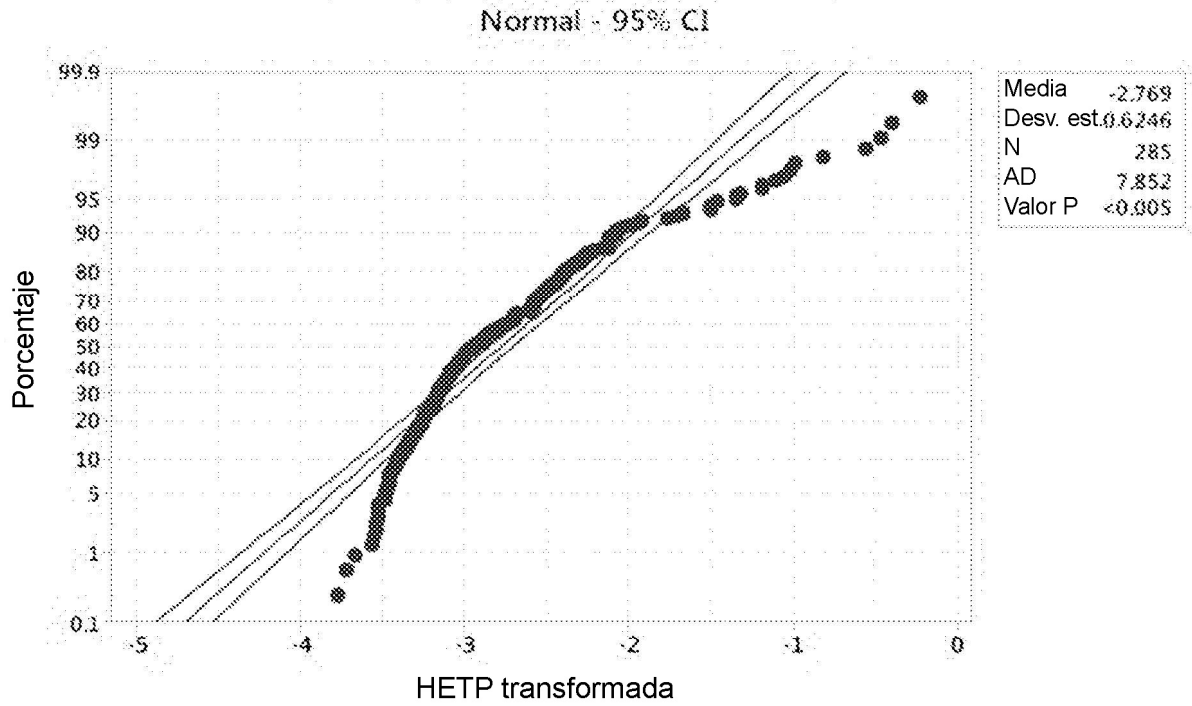


FIG. 9

Gráfico de probabilidad de ss transformada para lavado DPC

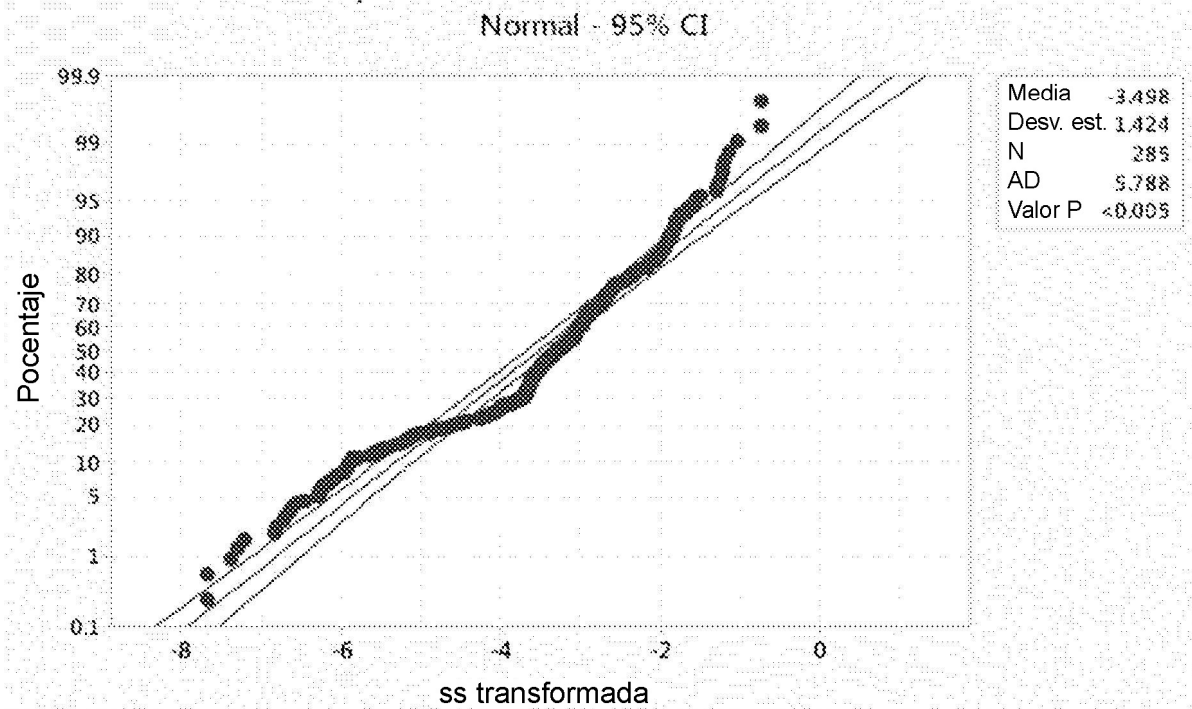


FIG. 10

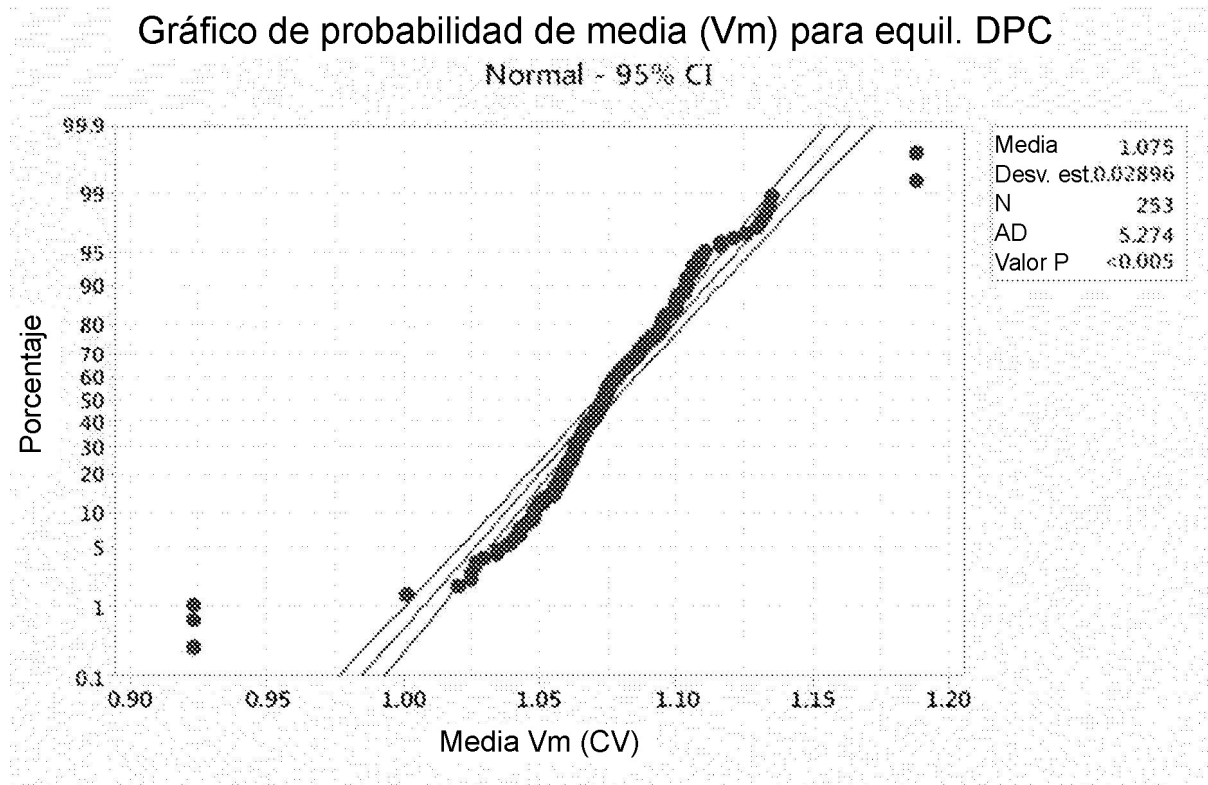


FIG. 11

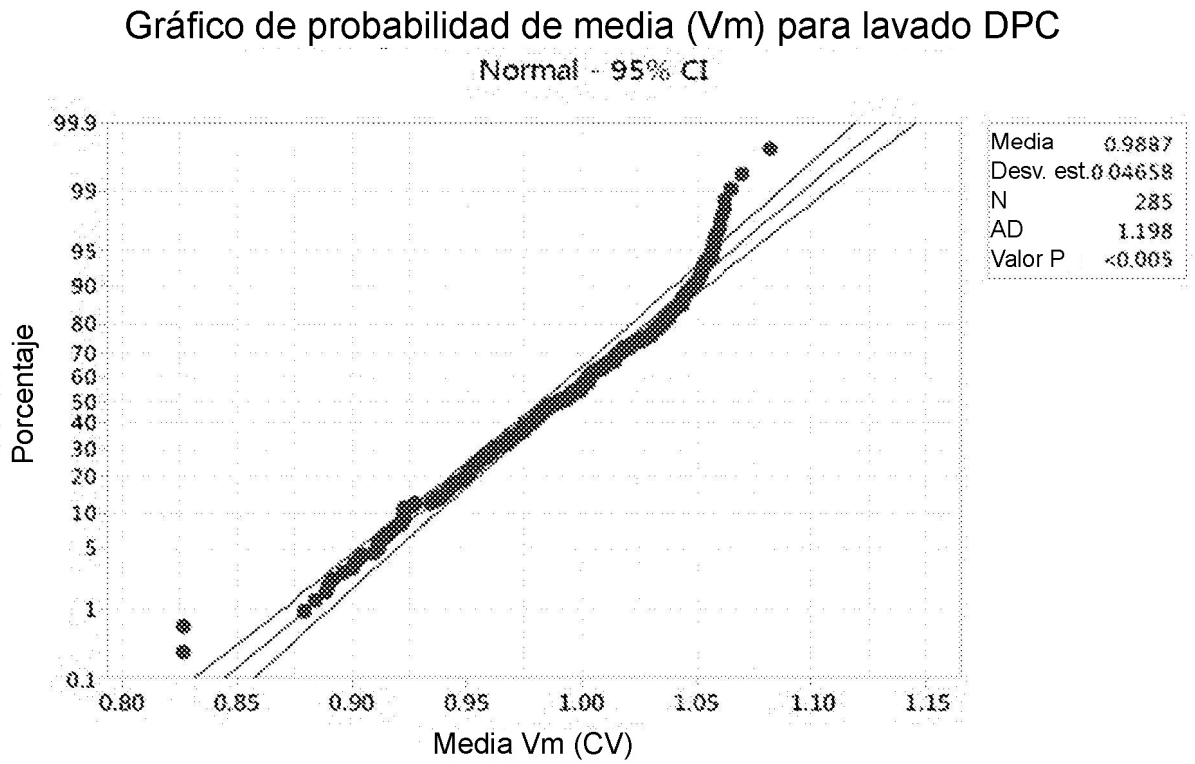


FIG. 12

I Gráfico de HETP para equil. DPC
Usando transformación Box-Cox con $\lambda = 0.00$

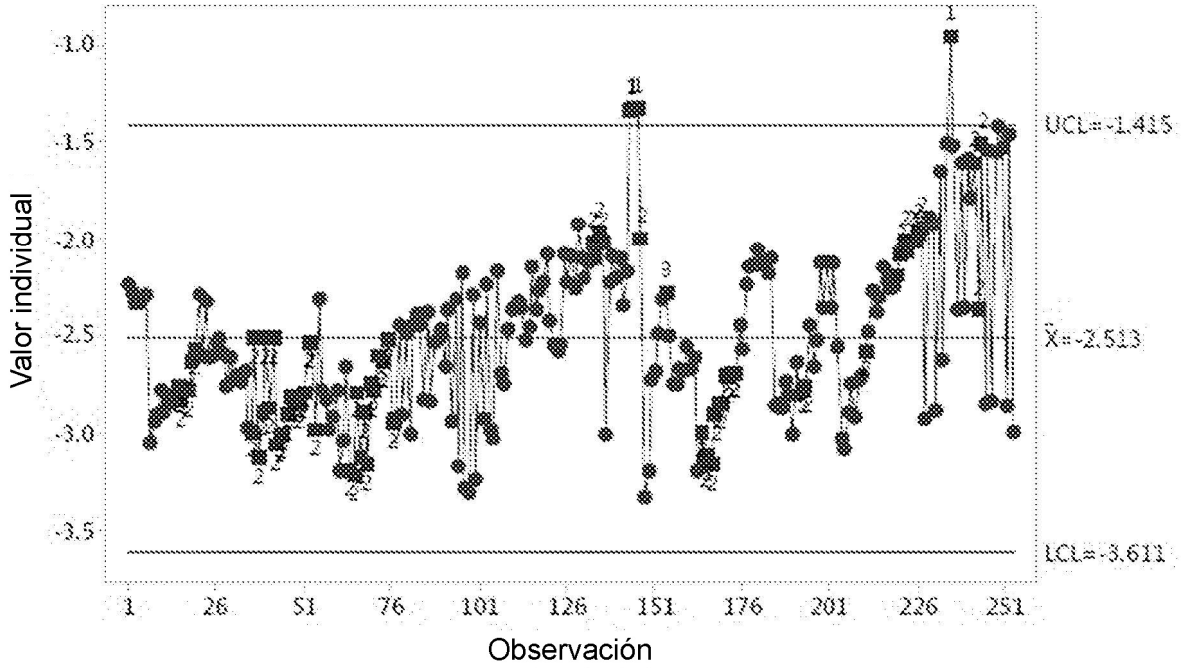


FIG. 13

Gráfico de series temporales de HETP para equil. DPC

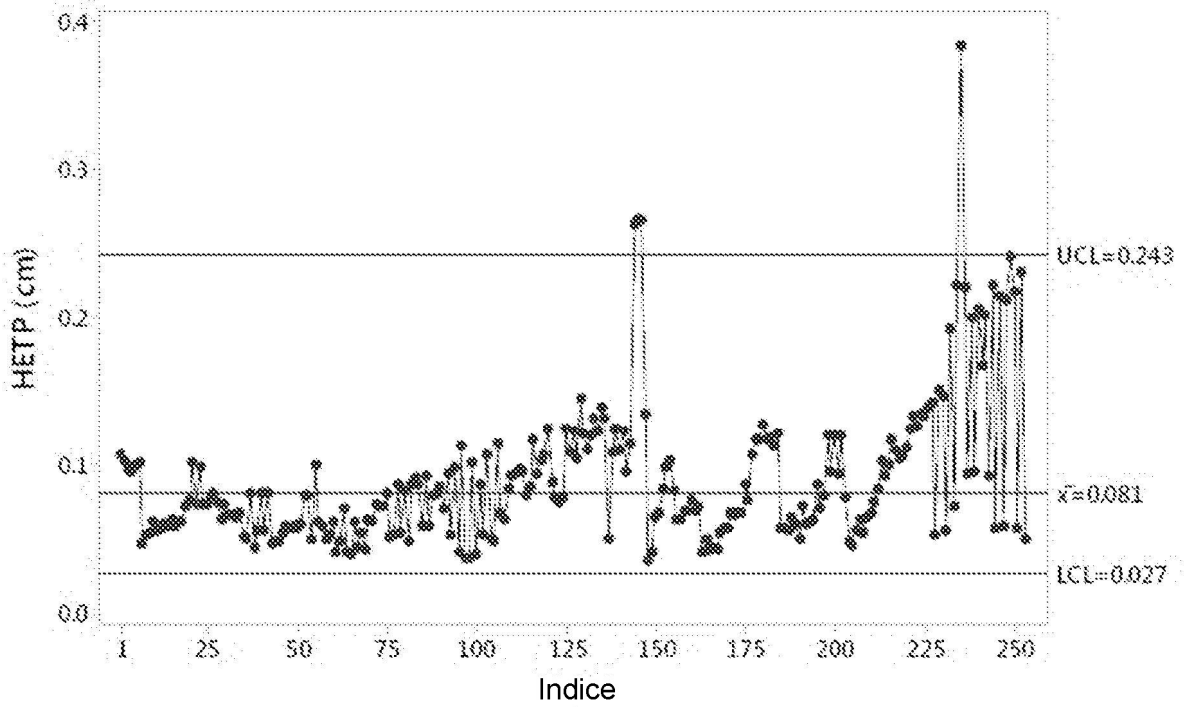


FIG. 14

I Gráfico de ss para equil. DPC
Usando transformación Box-Con con $\lambda = 0.00$

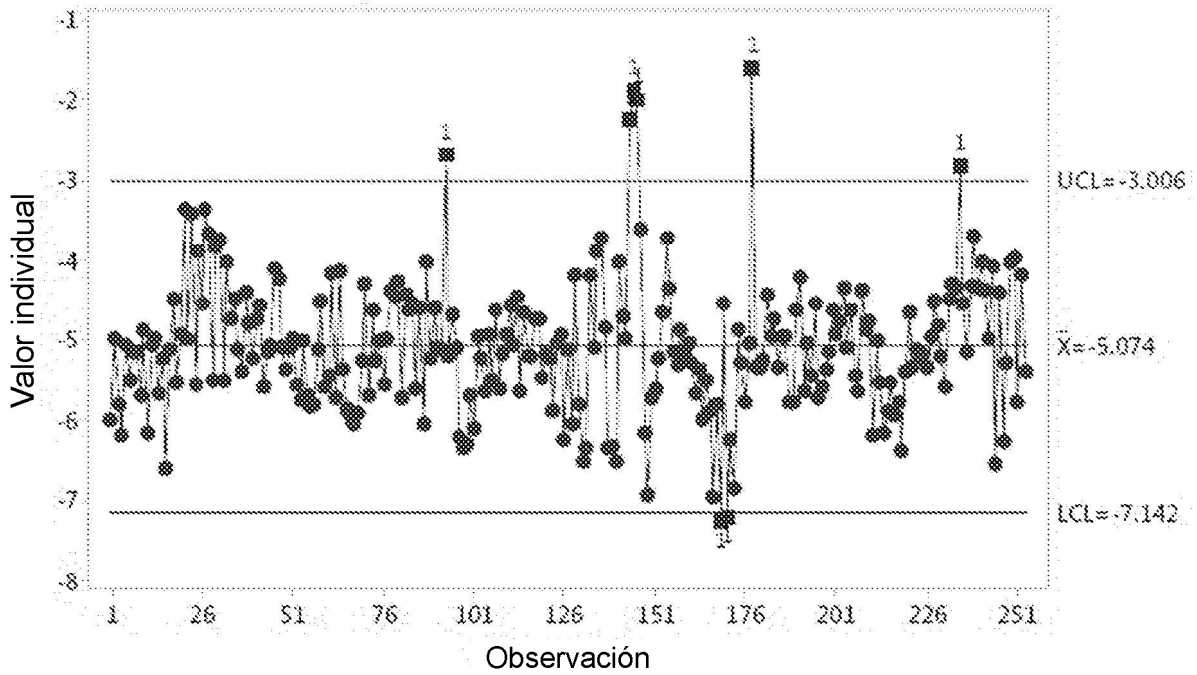


FIG. 15

Gráfico de series temporales de ss para equil. DPC

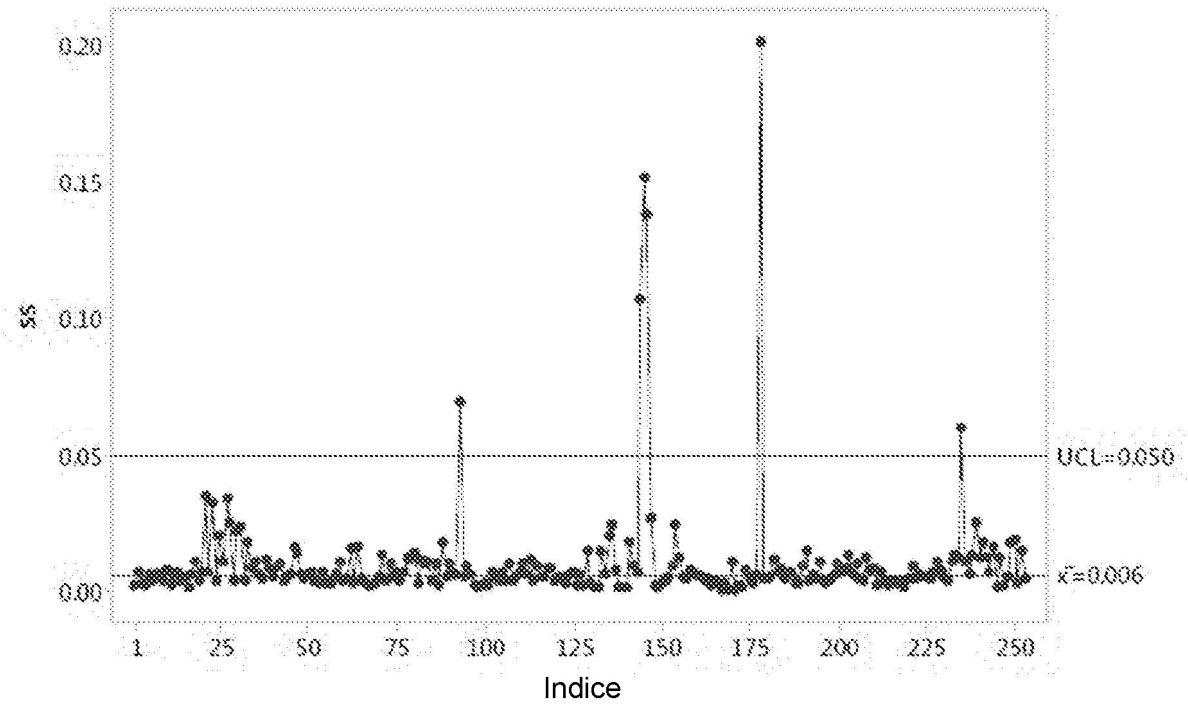


FIG. 16

I Gráfico de Media (Vm) para equil. DPC

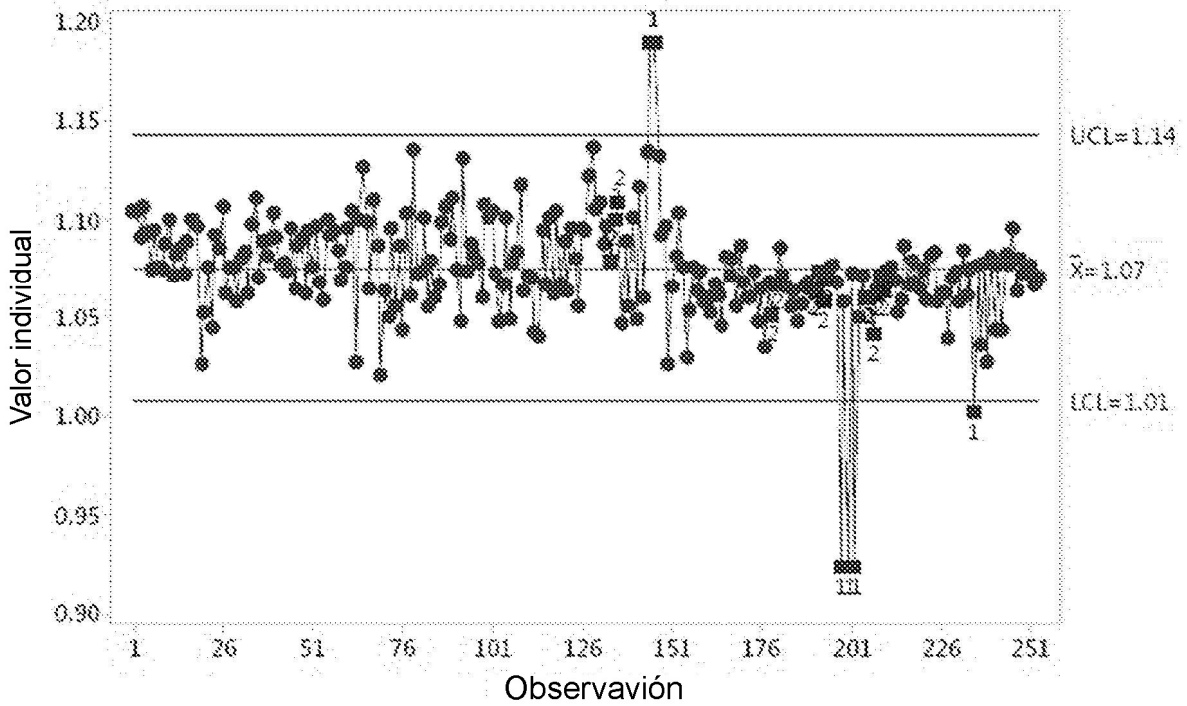


FIG. 17

I Gráfico de HETP para lavado DPC
Usando transformación Box-Cox con $\lambda = 0.00$

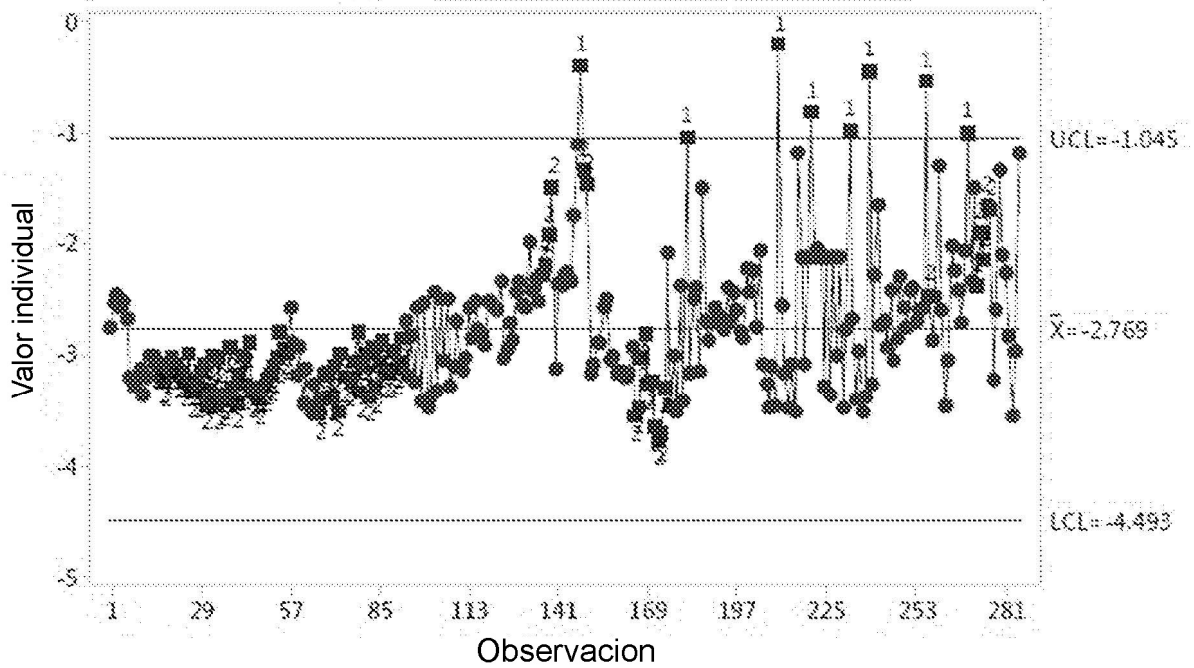


FIG. 18

Gráfico de series temporales de HETP para lavado DPC

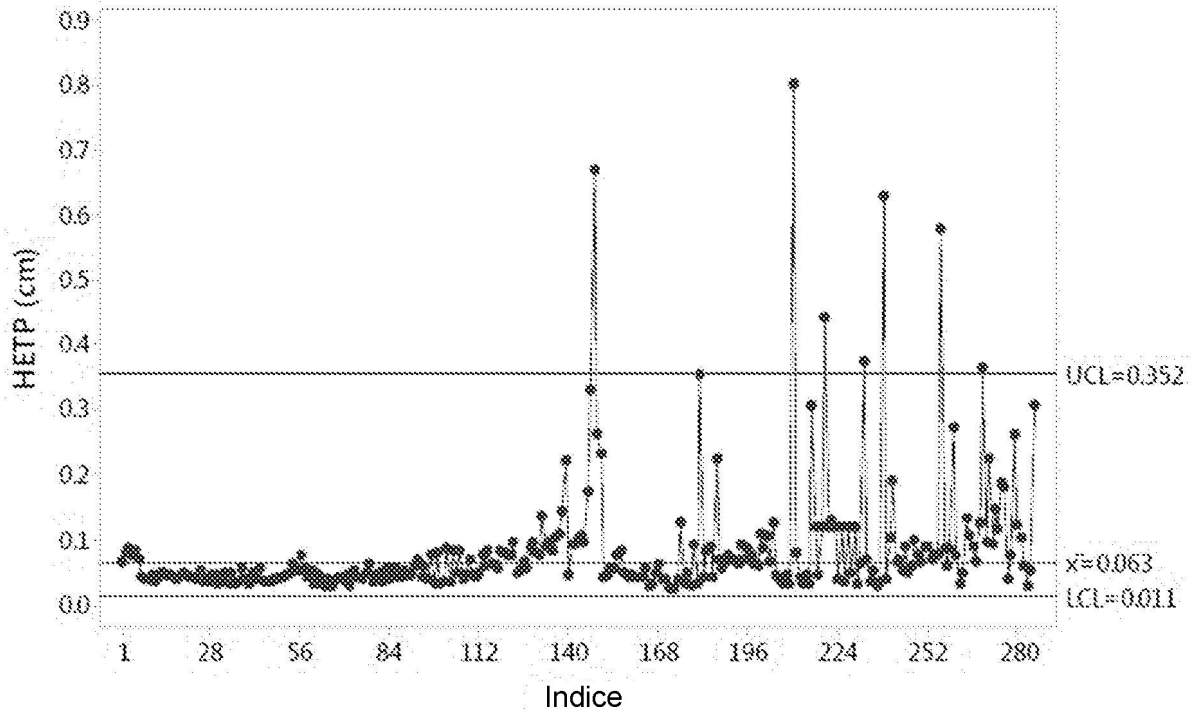


FIG. 19

I Gráfico de ss para lavado DPC
Usando transformación Box-Cox con $\lambda = 0.00$

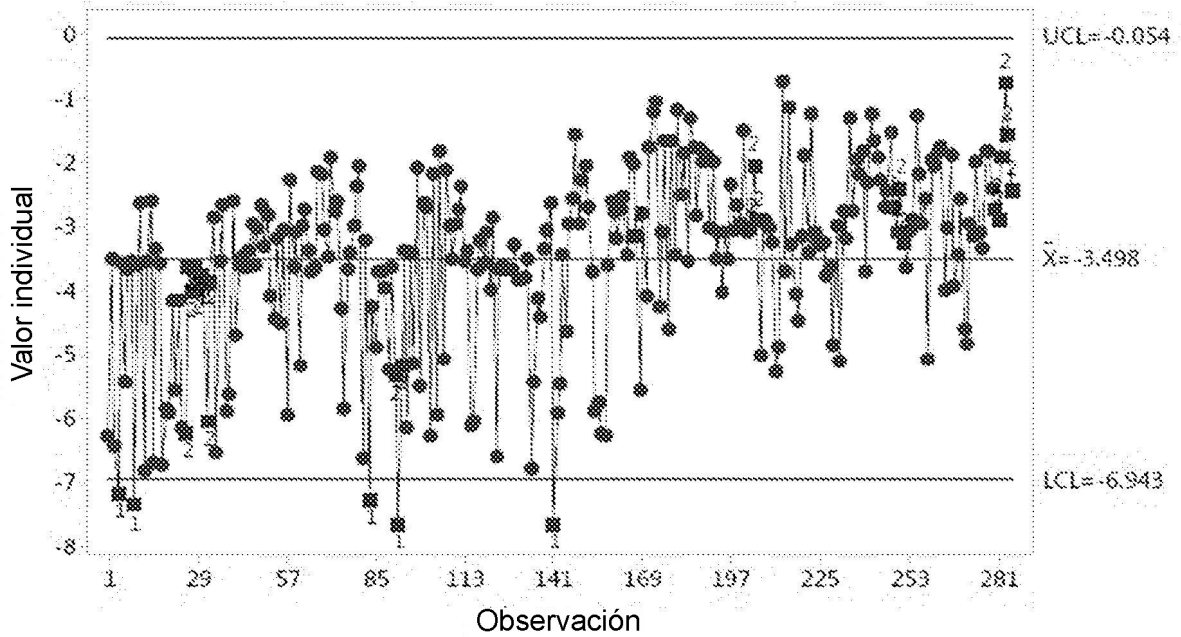


FIG. 20

Gráfico de series temporales de ss para lavado DPC

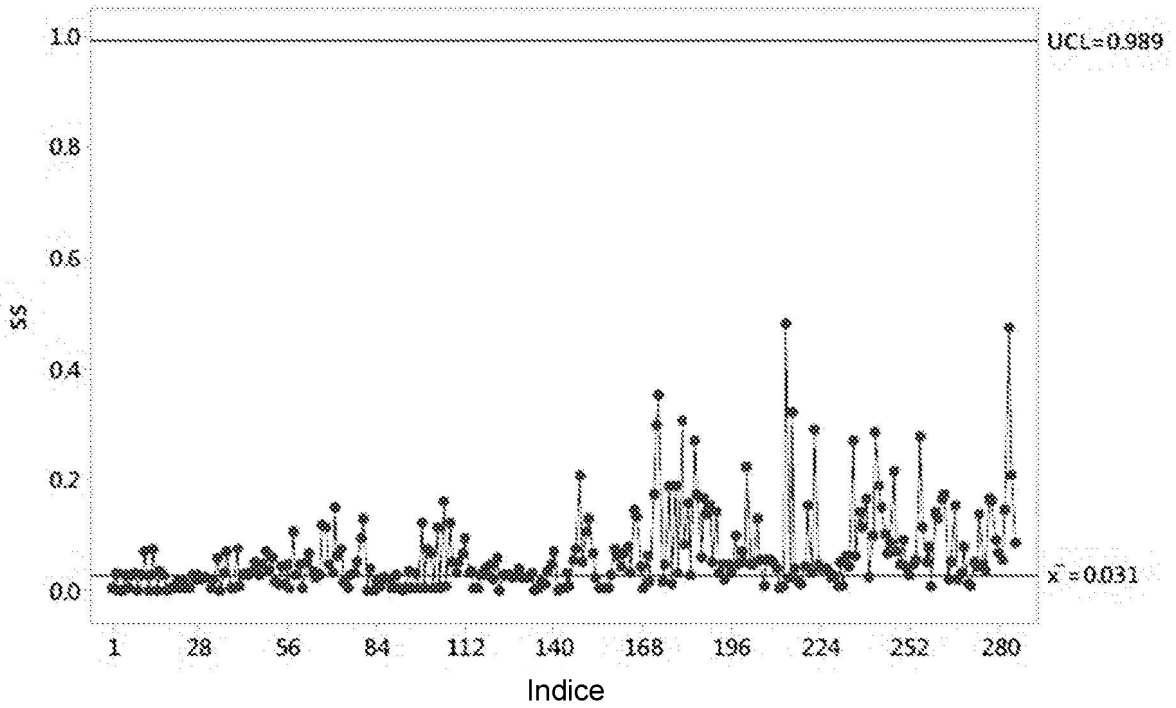


FIG. 21

I Gráfico de Media (Vm) para lavado DPC

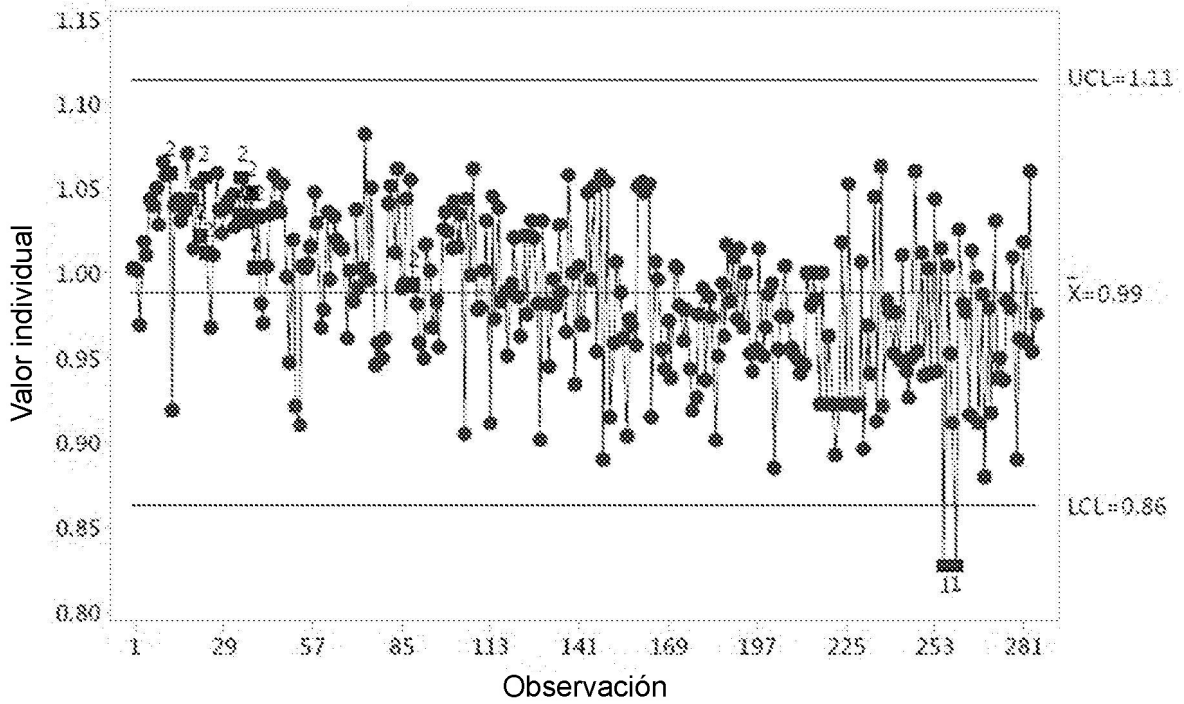


FIG. 22

Gráfico de series temporales de HETP para equil. DPC

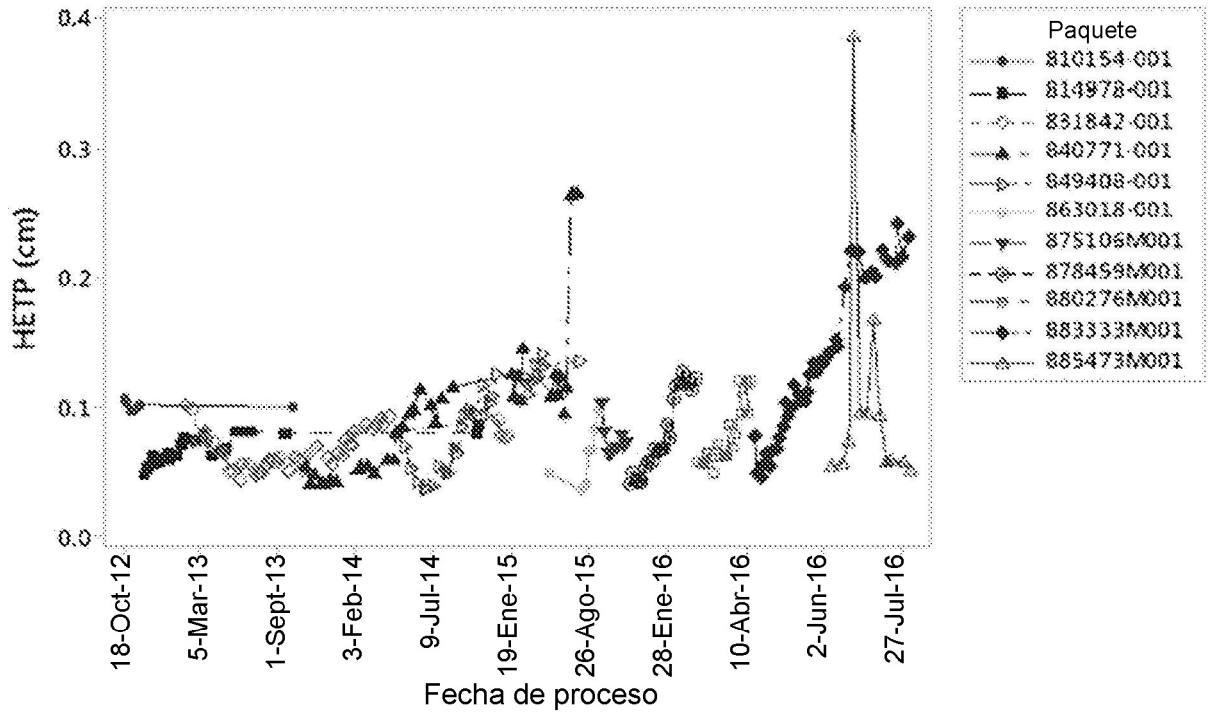


FIG. 23

Gráfico de series temporales de HETP para lavado DPC

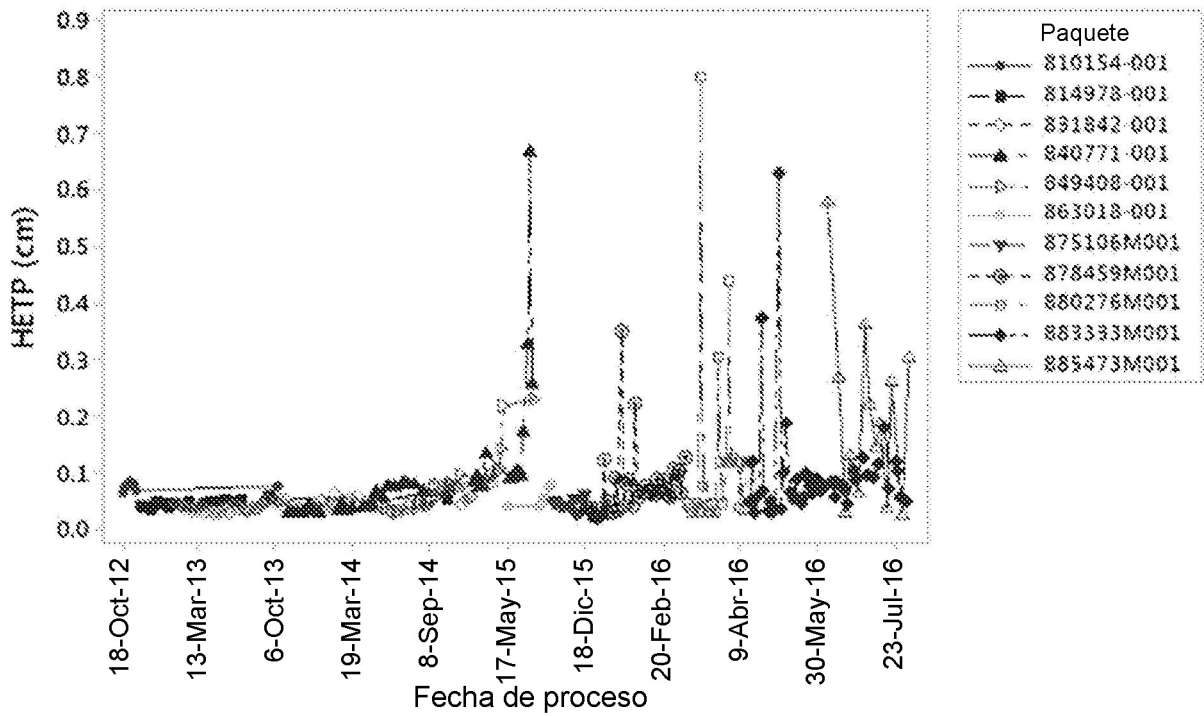


FIG. 24

Gráfico de series temporales de HETP para equil. DPC

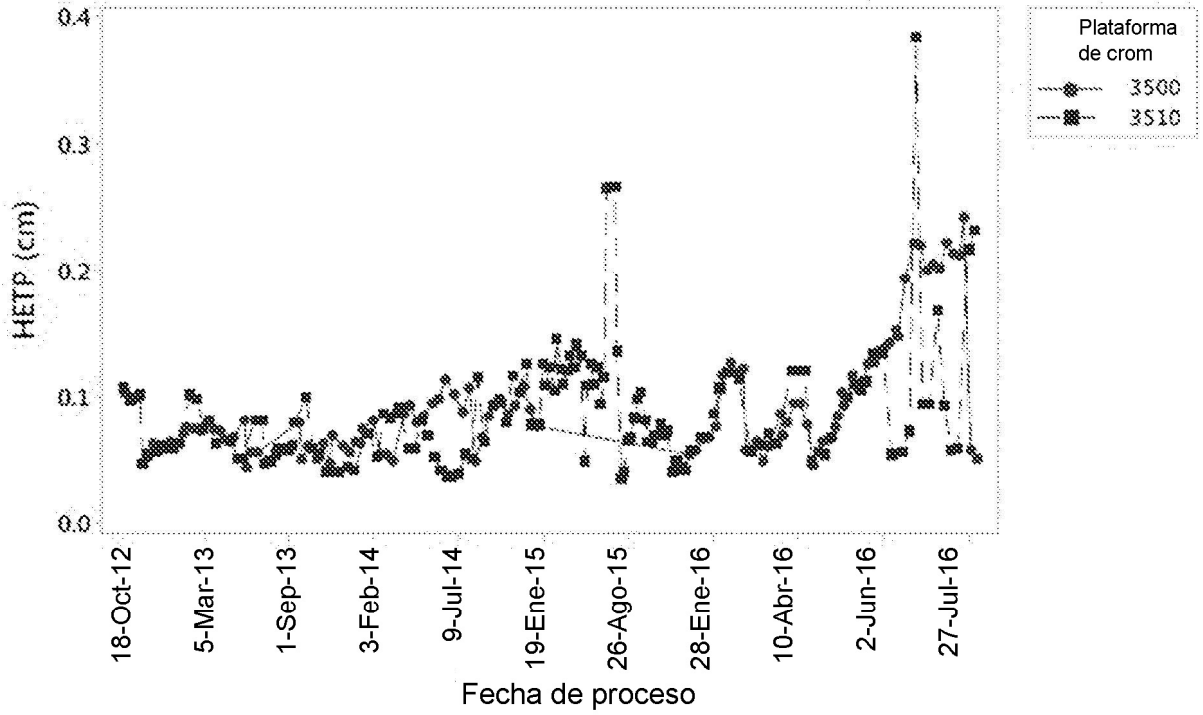


FIG. 25

Gráfico de series temporales de HETP para lavado DPC

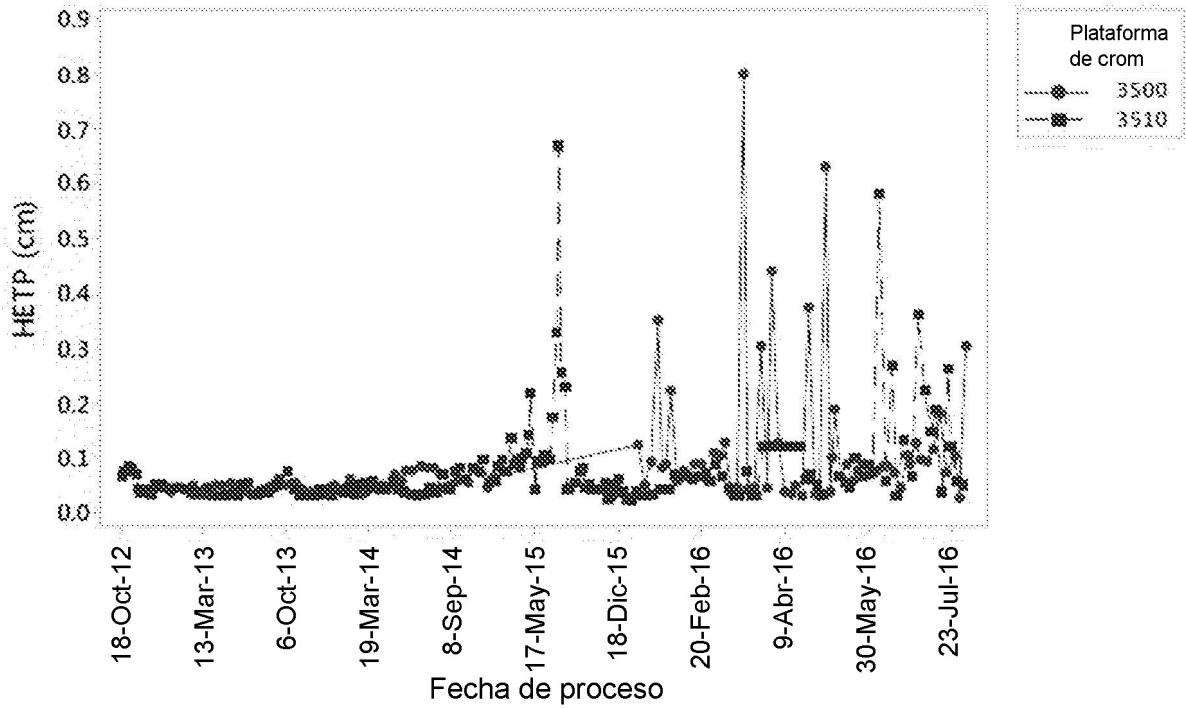


FIG. 26

I Gráfico de flujo medio para equil. DPC

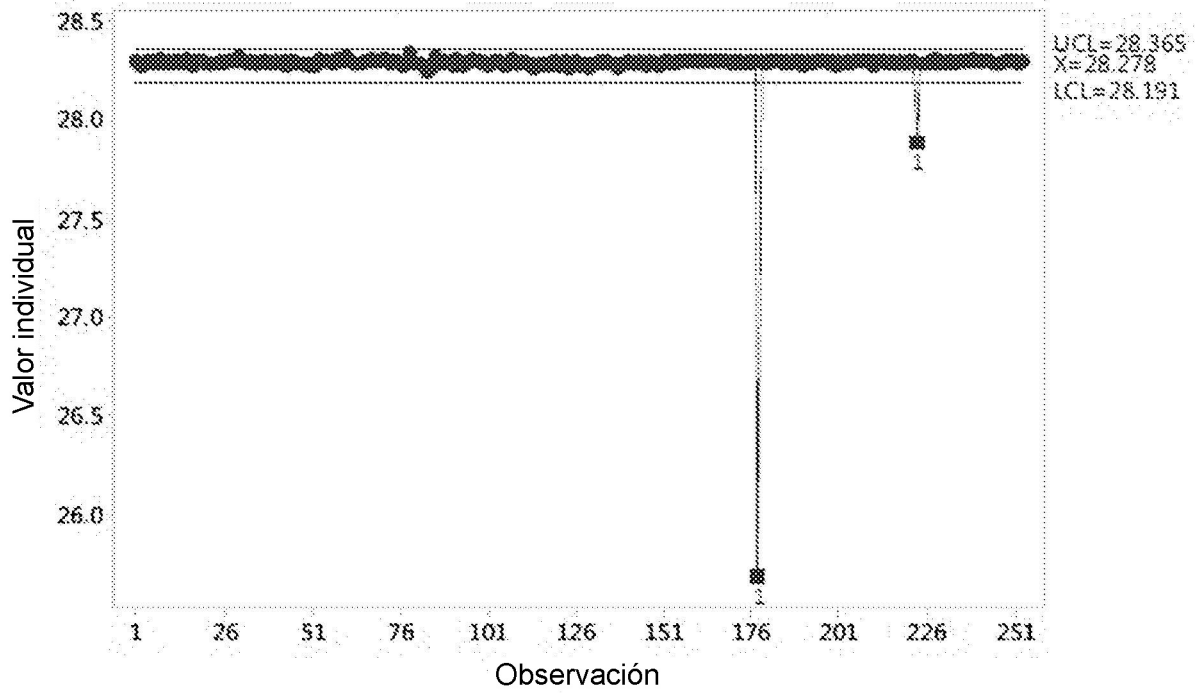


FIG. 27

I Gráfico de presión media para equil. DPC

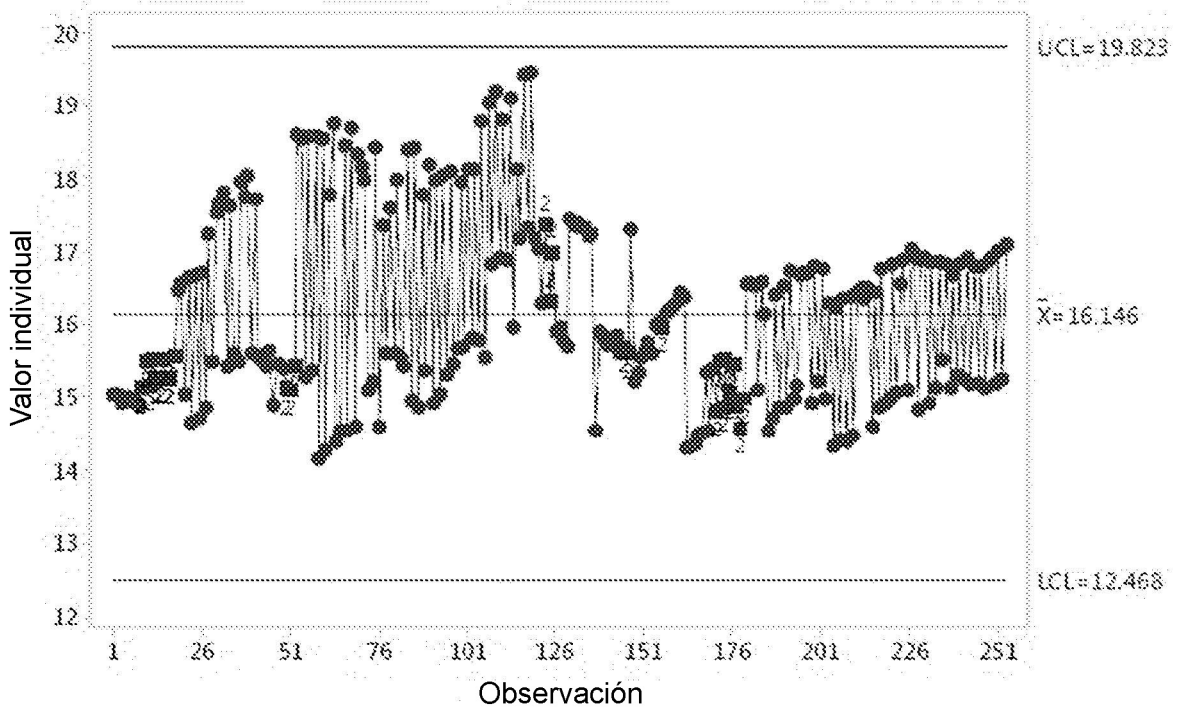


FIG. 28

I Gráfico de flujo medio para lavado DPC

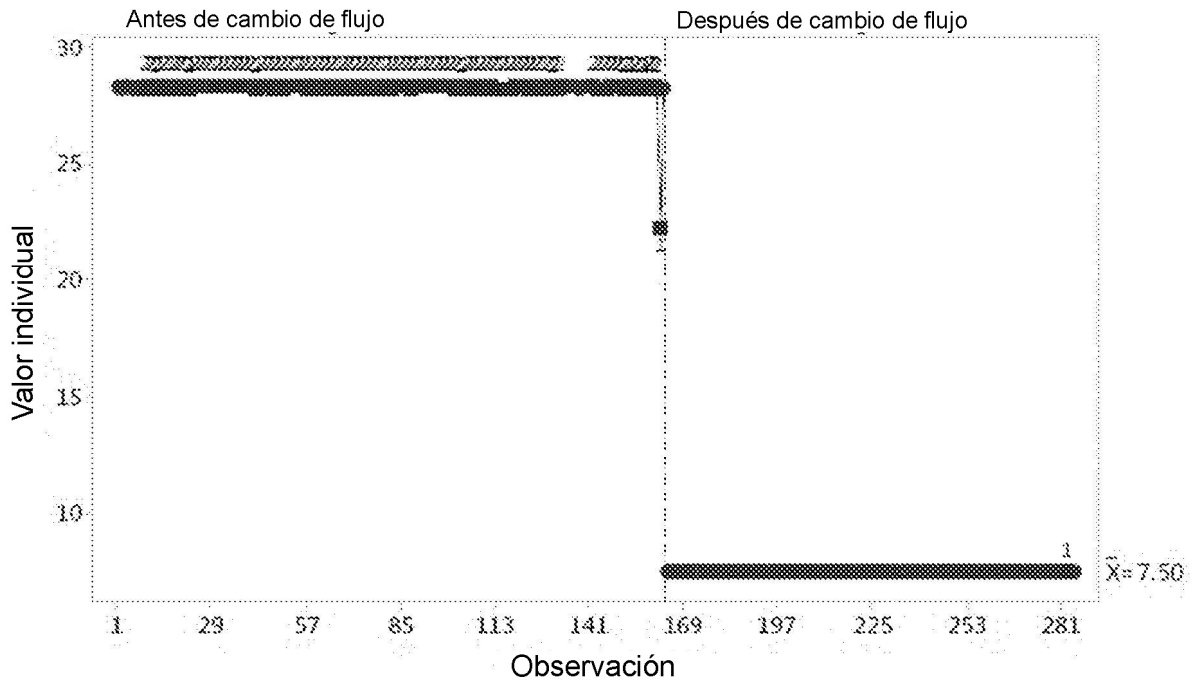


FIG. 29

I Gráfico de presión media para lavado DPC

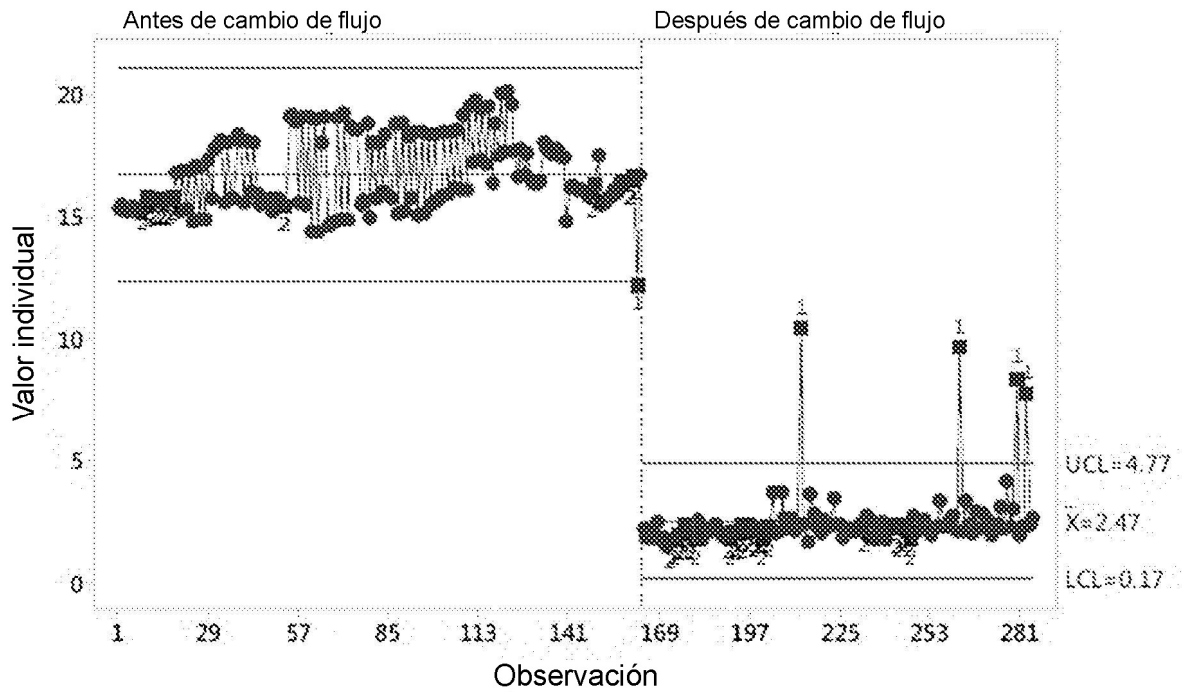


FIG. 30

I Gráfico de HETP por flujo orig. frente a nuevo
Usando transformación Box-Cox con $\lambda=0.00$

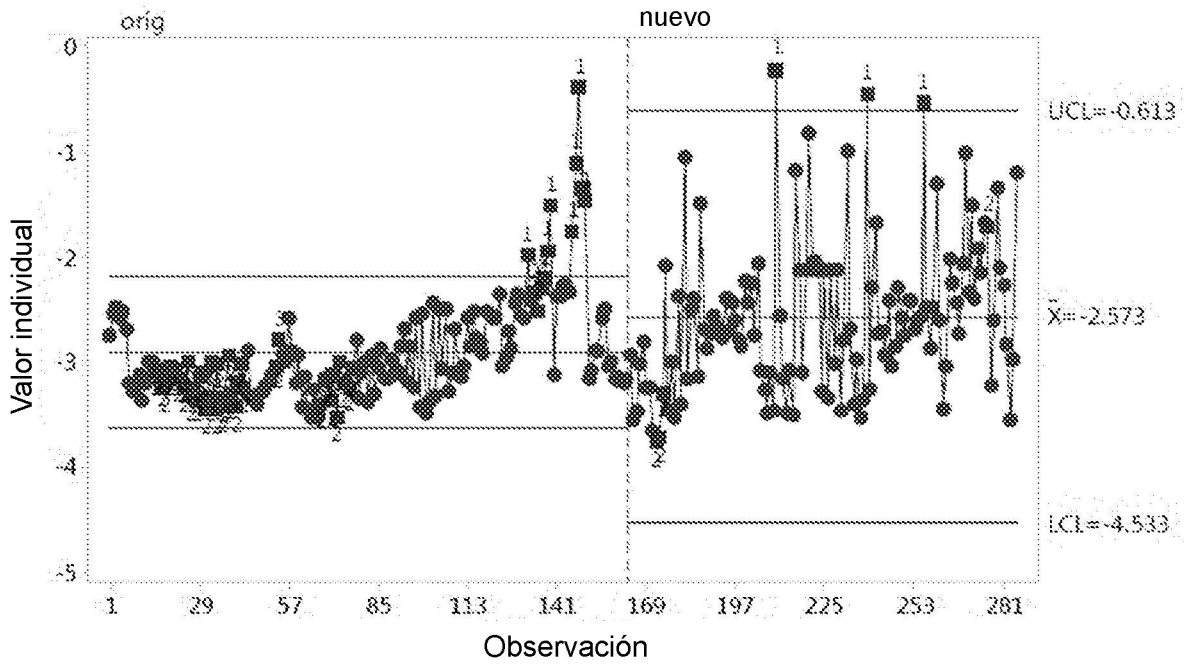


FIG. 31

Gráfico de series temporales de HETP para equil. DPC

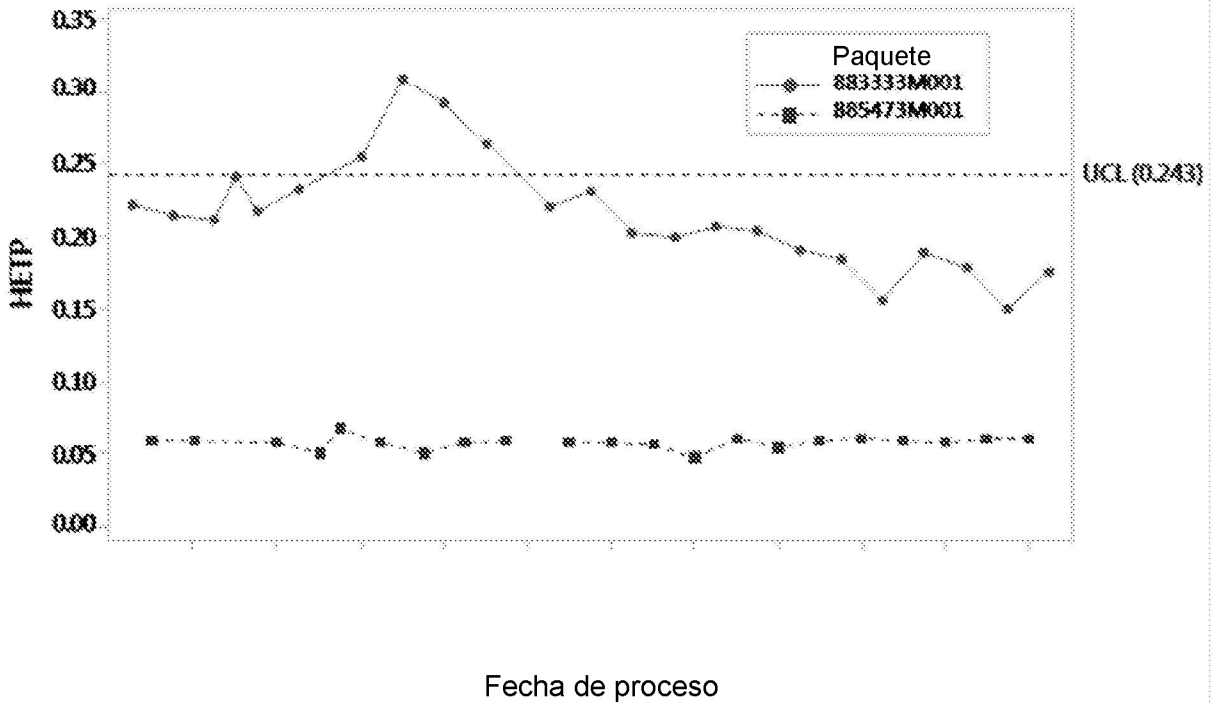


FIG. 32

Gráfico de series temporales de HETP para equil. S

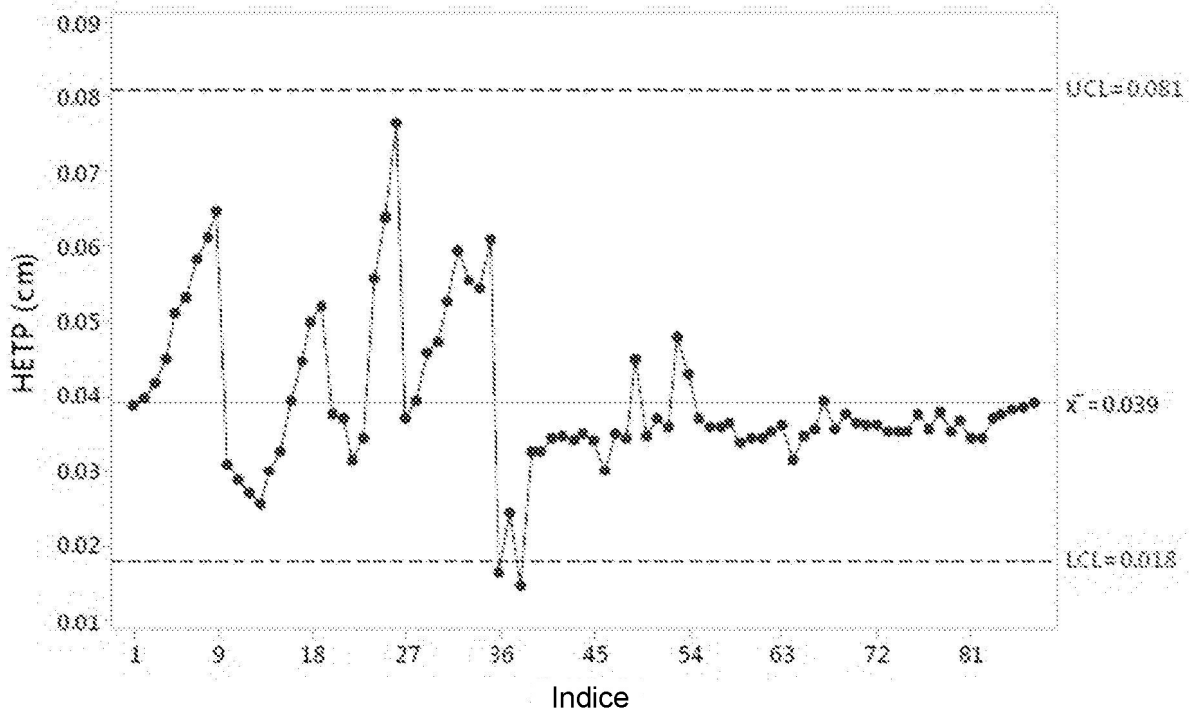


FIG. 33

Gráfico de series temporales de HETP para enjuague WFI S

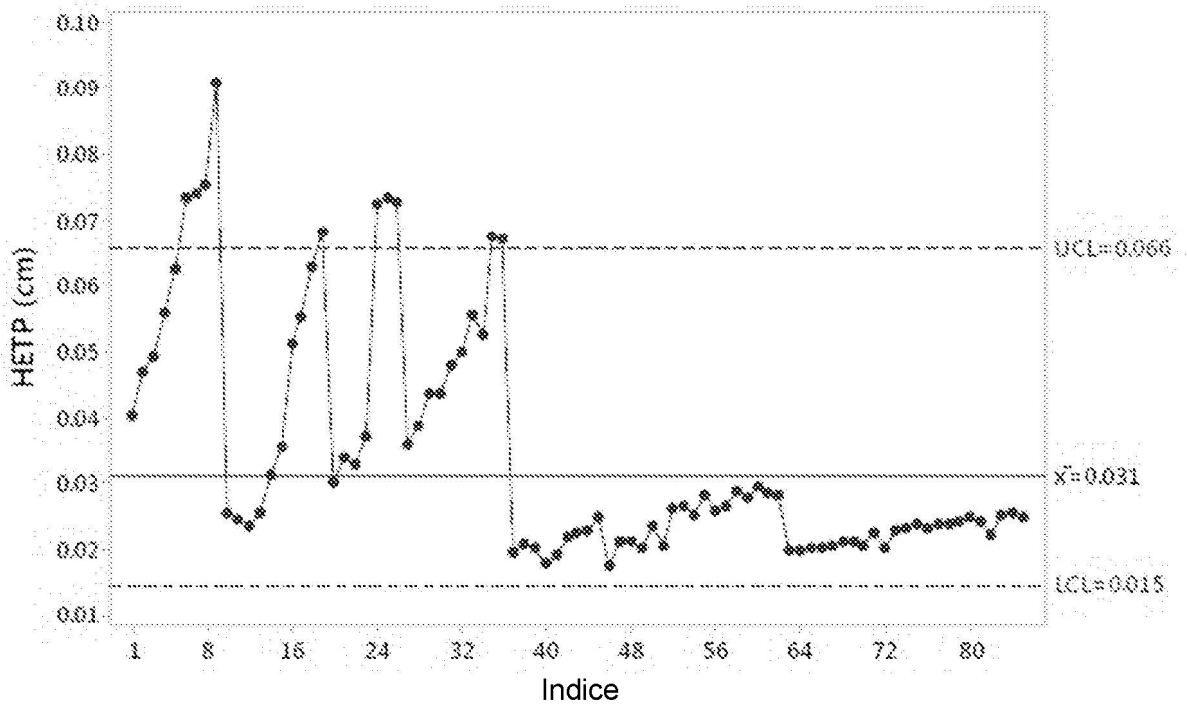


FIG. 34

Gráfico de series temporales de HETP para almacenamiento S

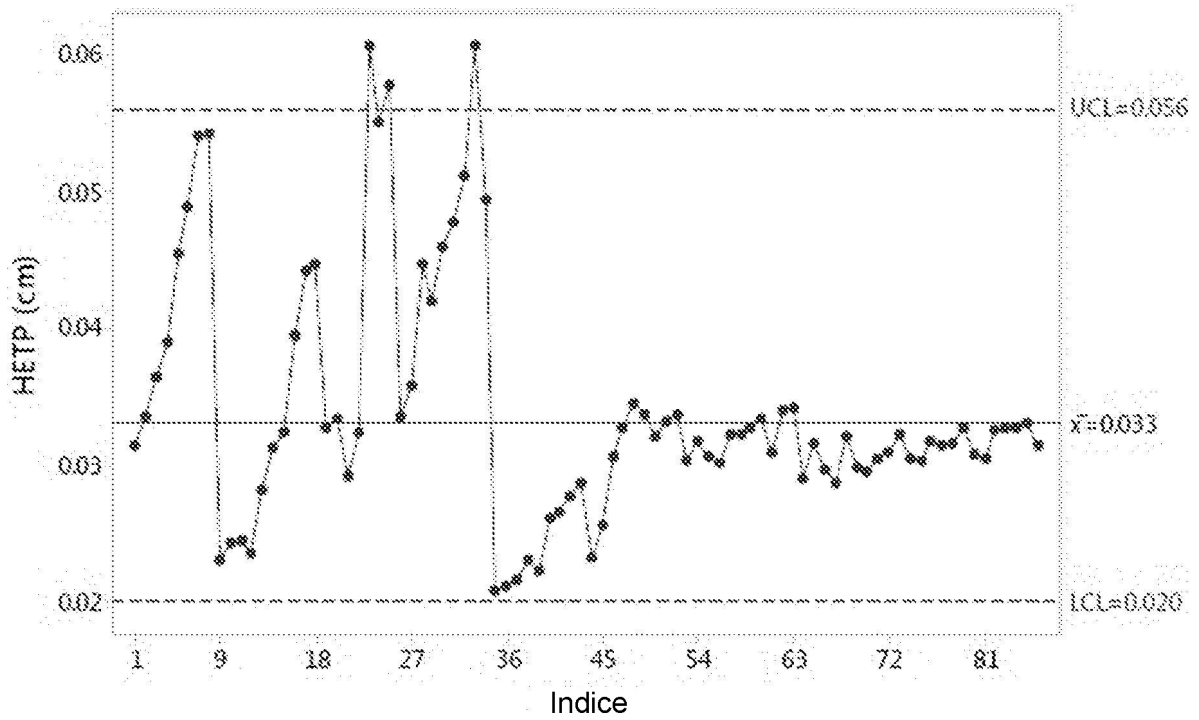


FIG. 35

Gráfico de series temporales de HETP para equil. Q2

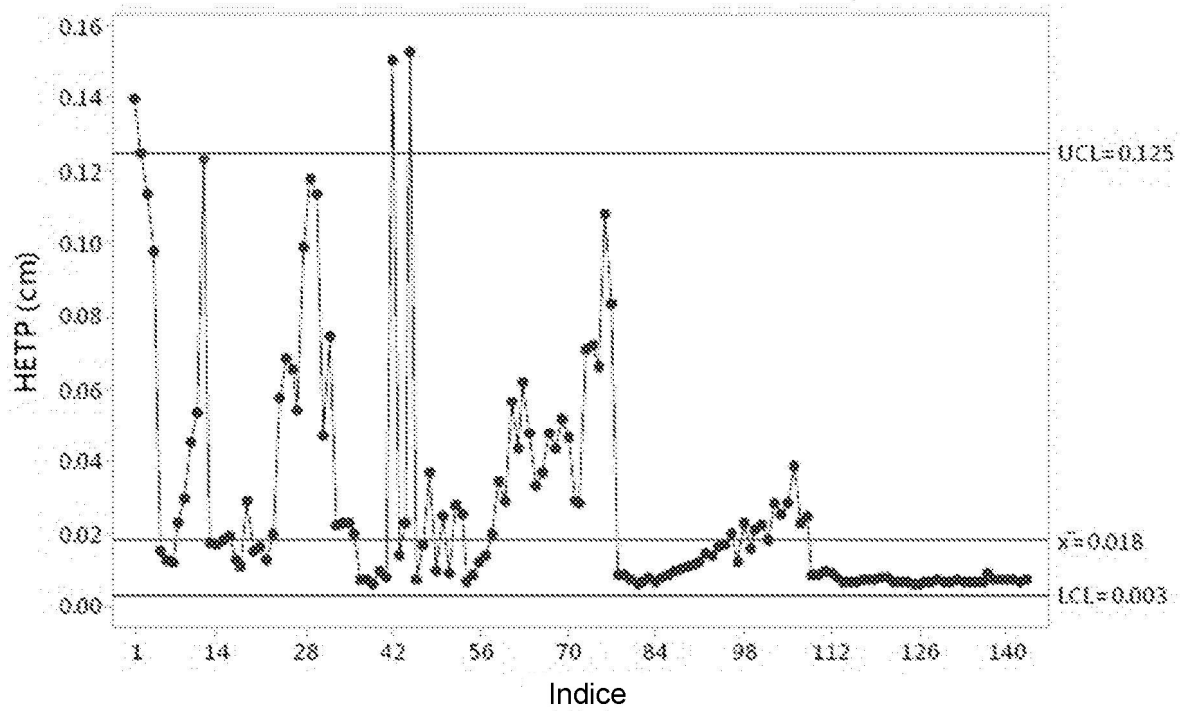


FIG. 36

Gráfico de series temporales de HETP para separación Q2

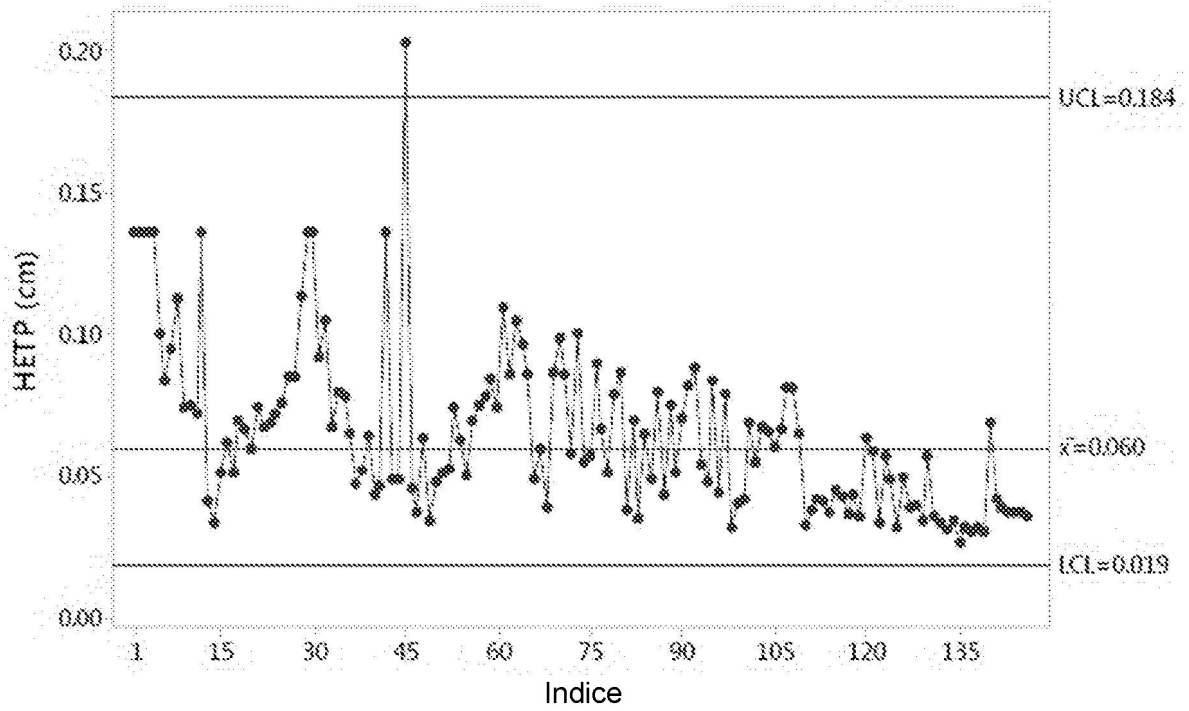


FIG. 37

Gráfico de series temporales de HETP para almacenamiento Q2

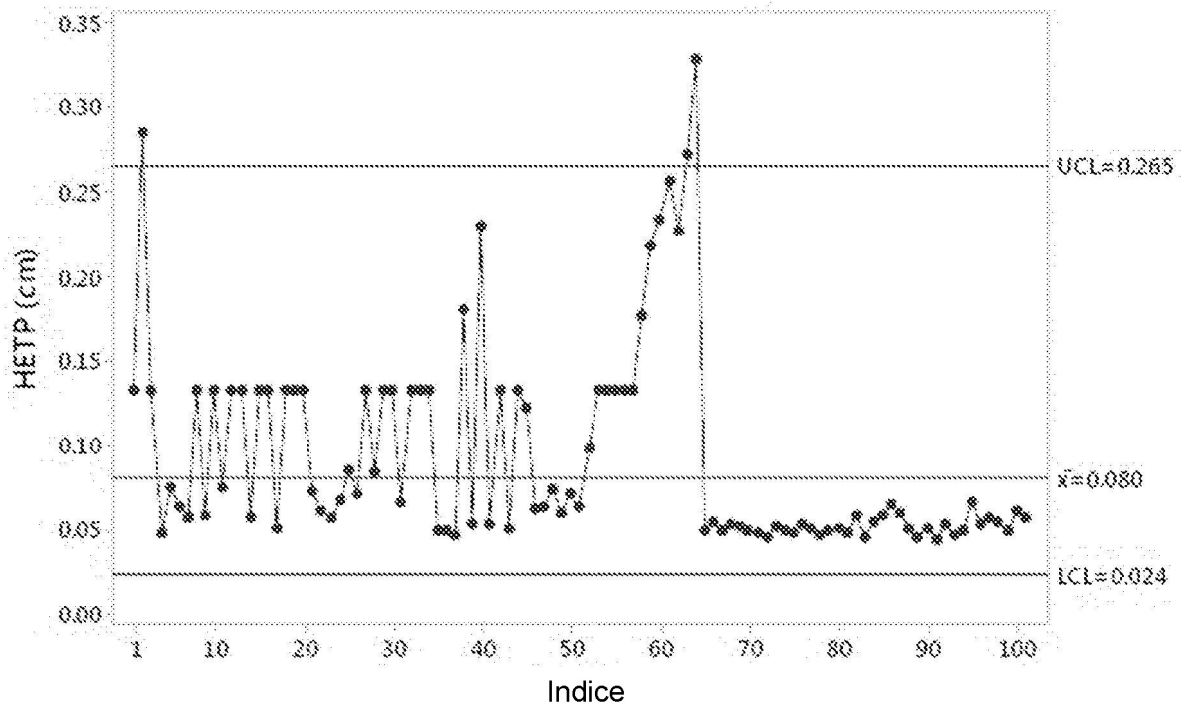


FIG. 38

Visión general de proceso de fabricación -
Etapas del proceso

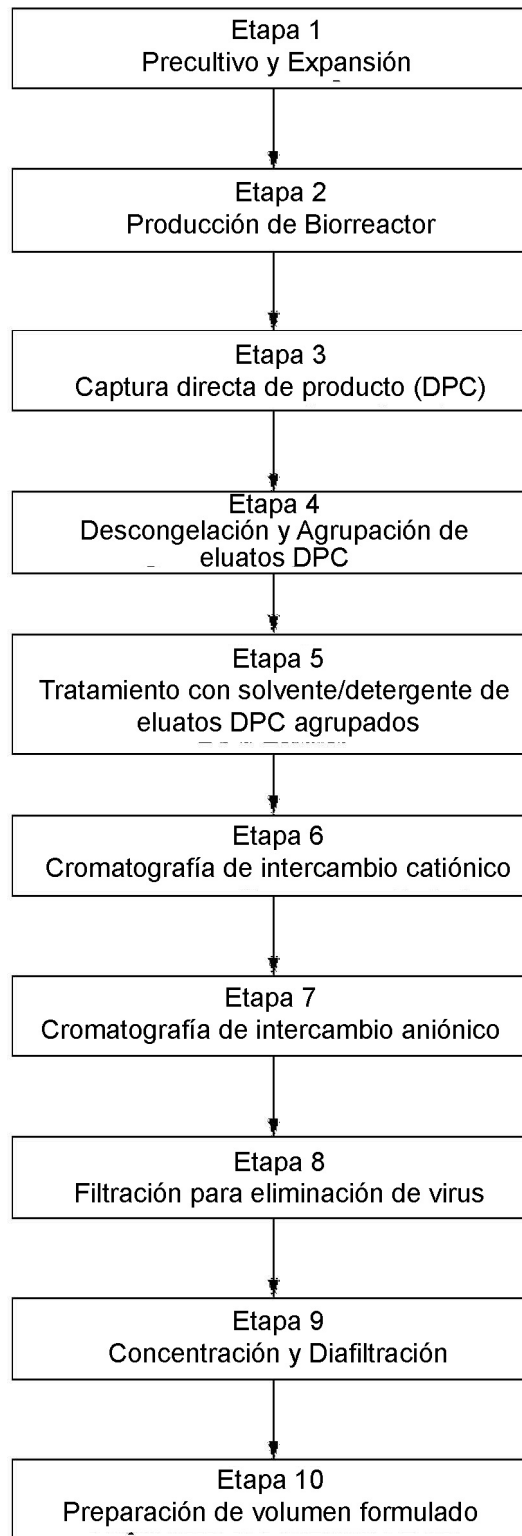


FIG. 39

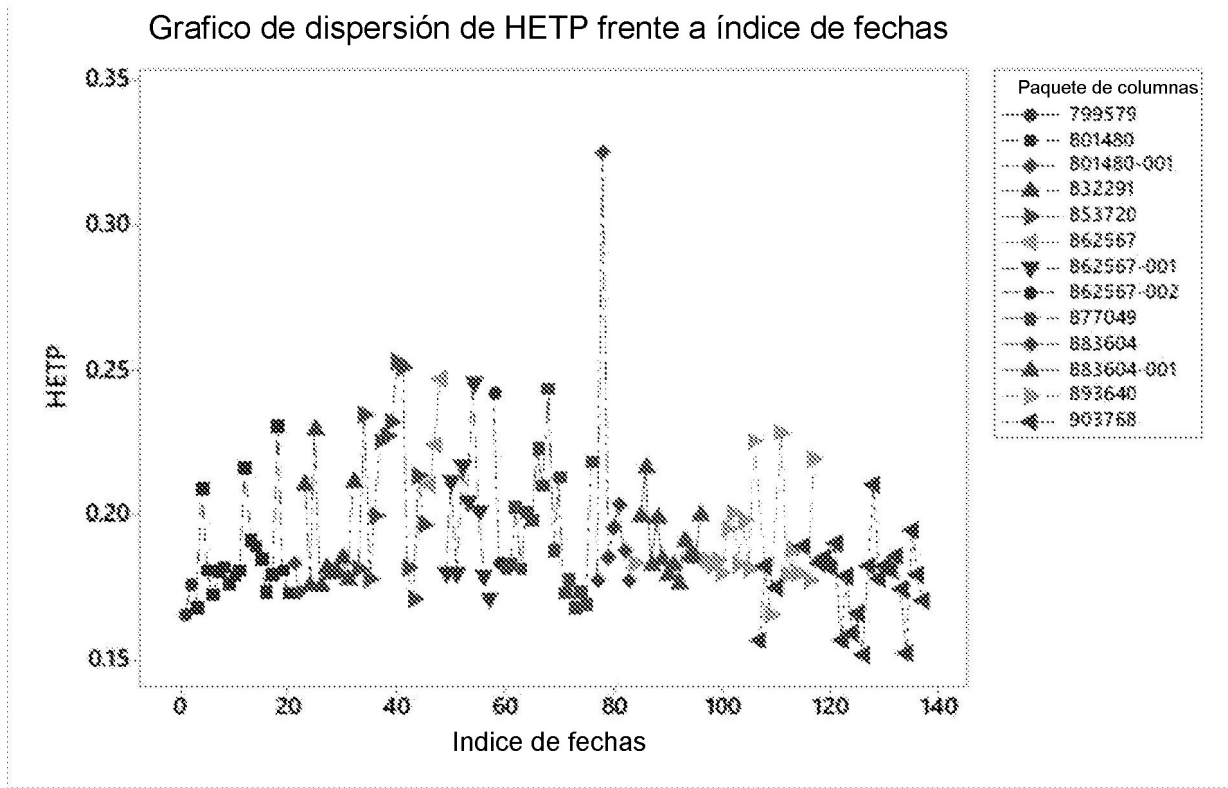
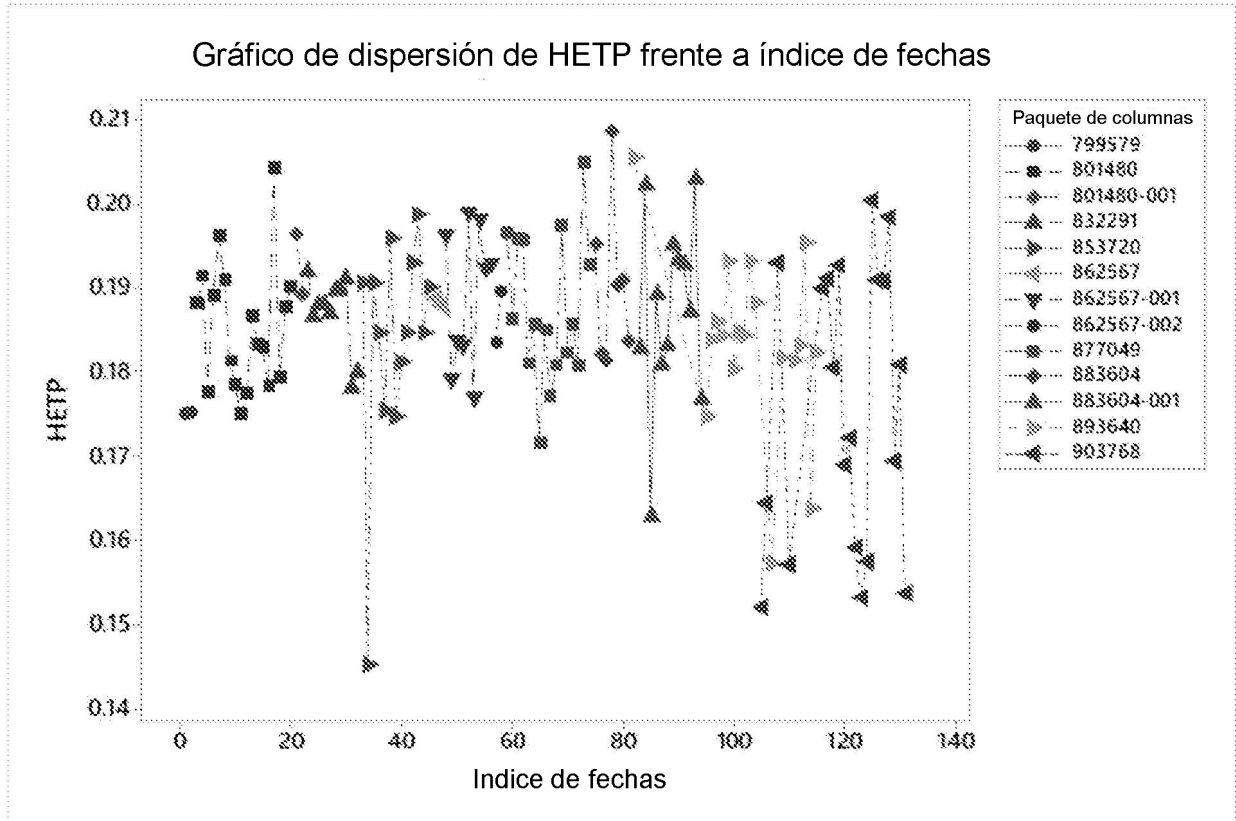


FIG. 40



HETP de elución DCP

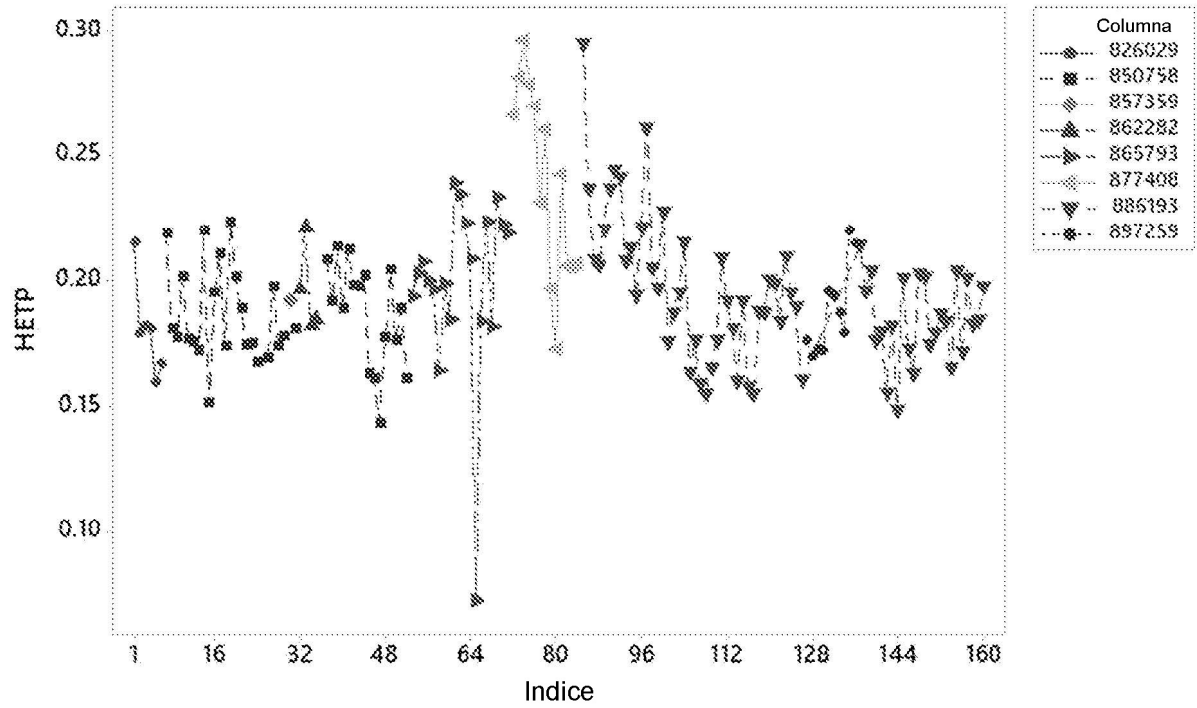


FIG. 42

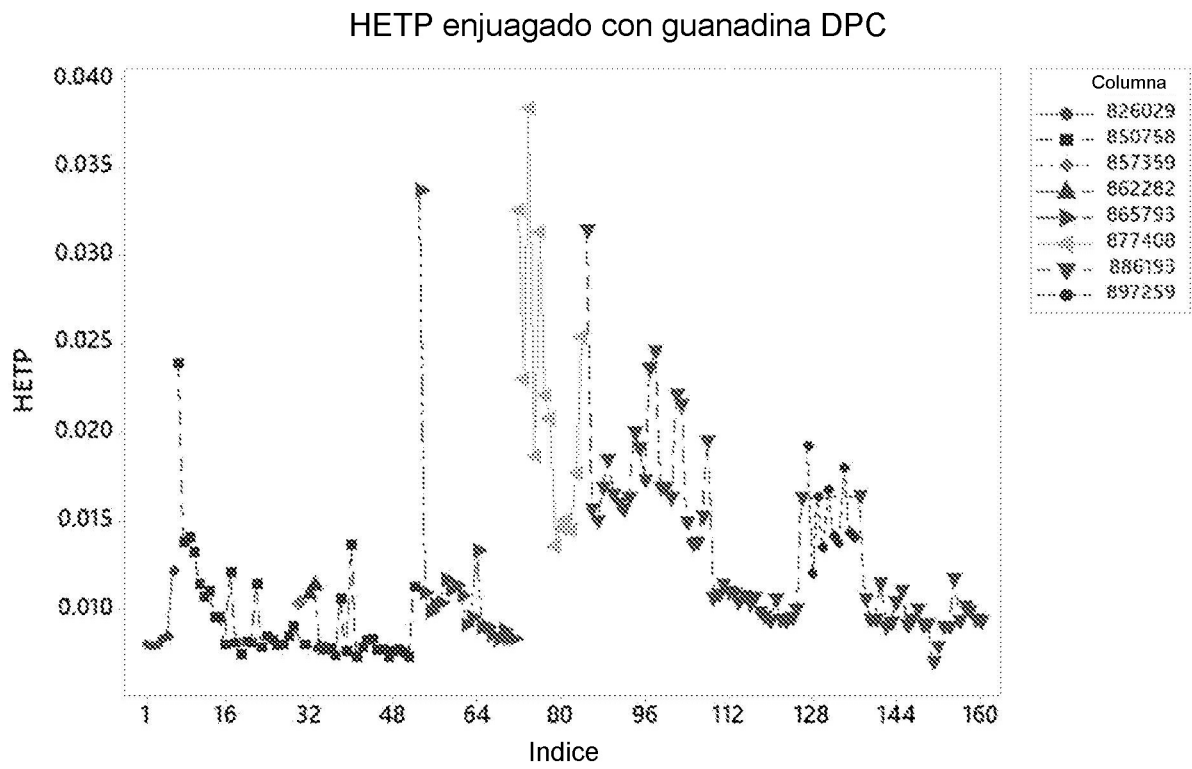


FIG. 43

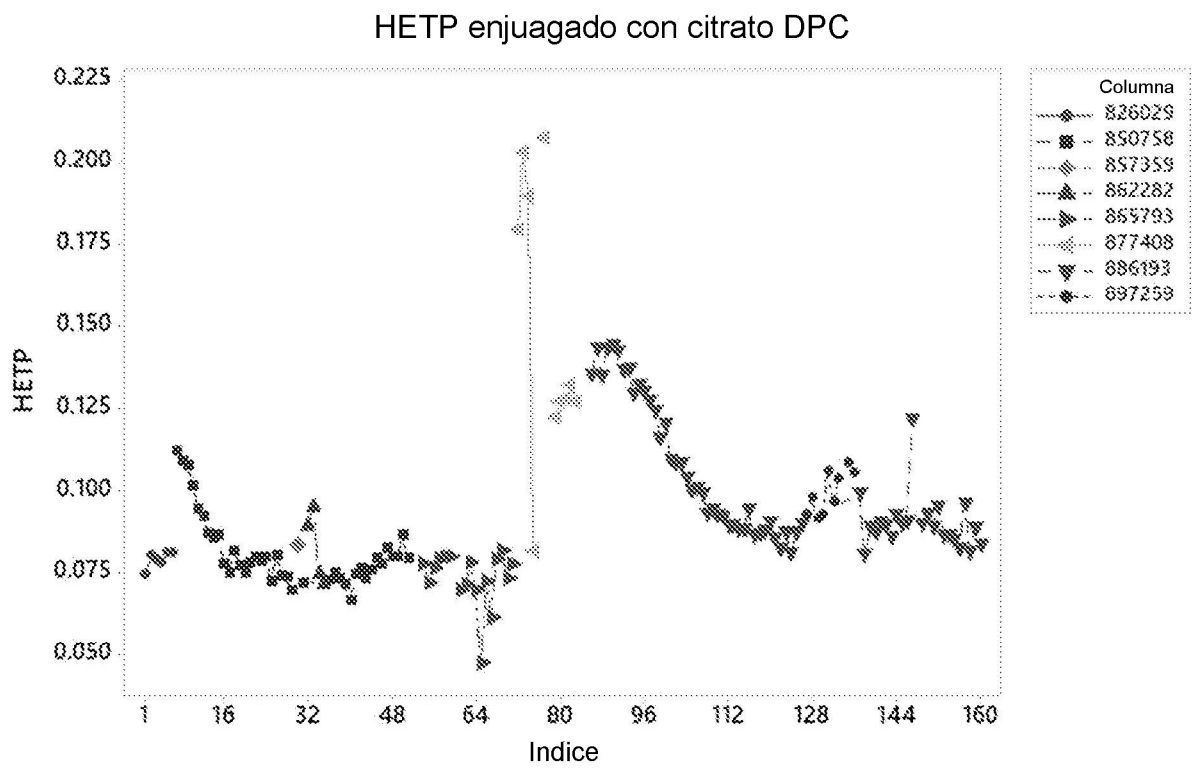


FIG. 44

HETP carga PS1

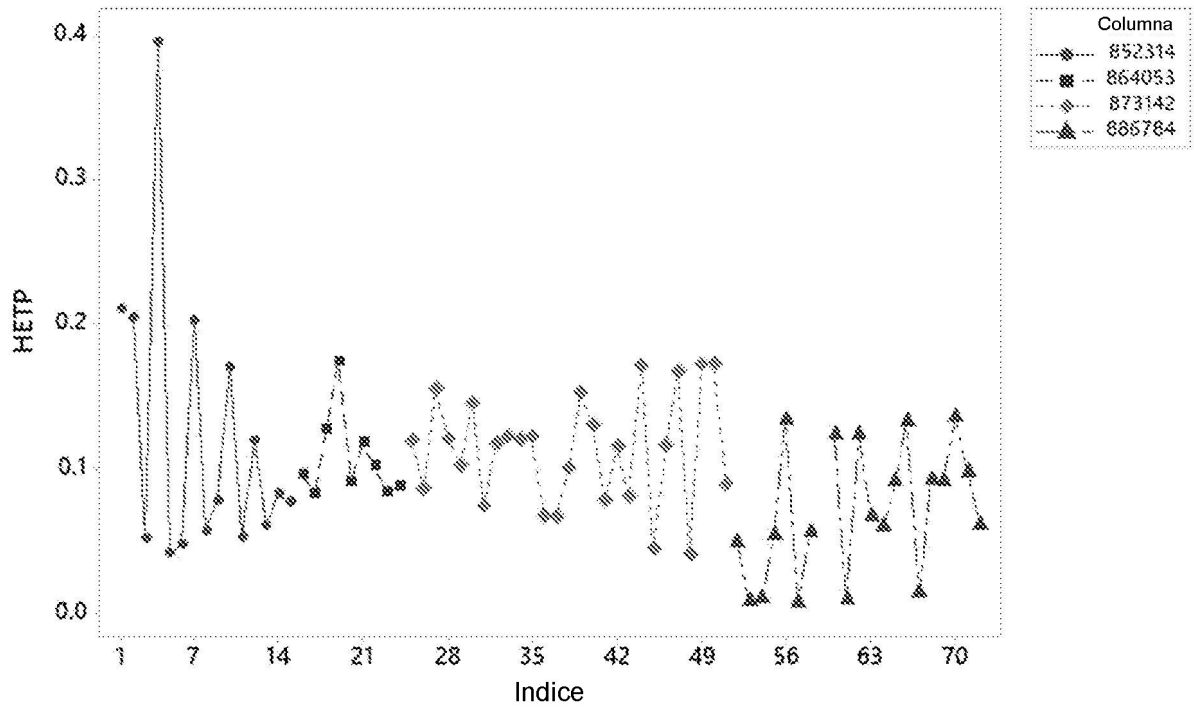


FIG. 45

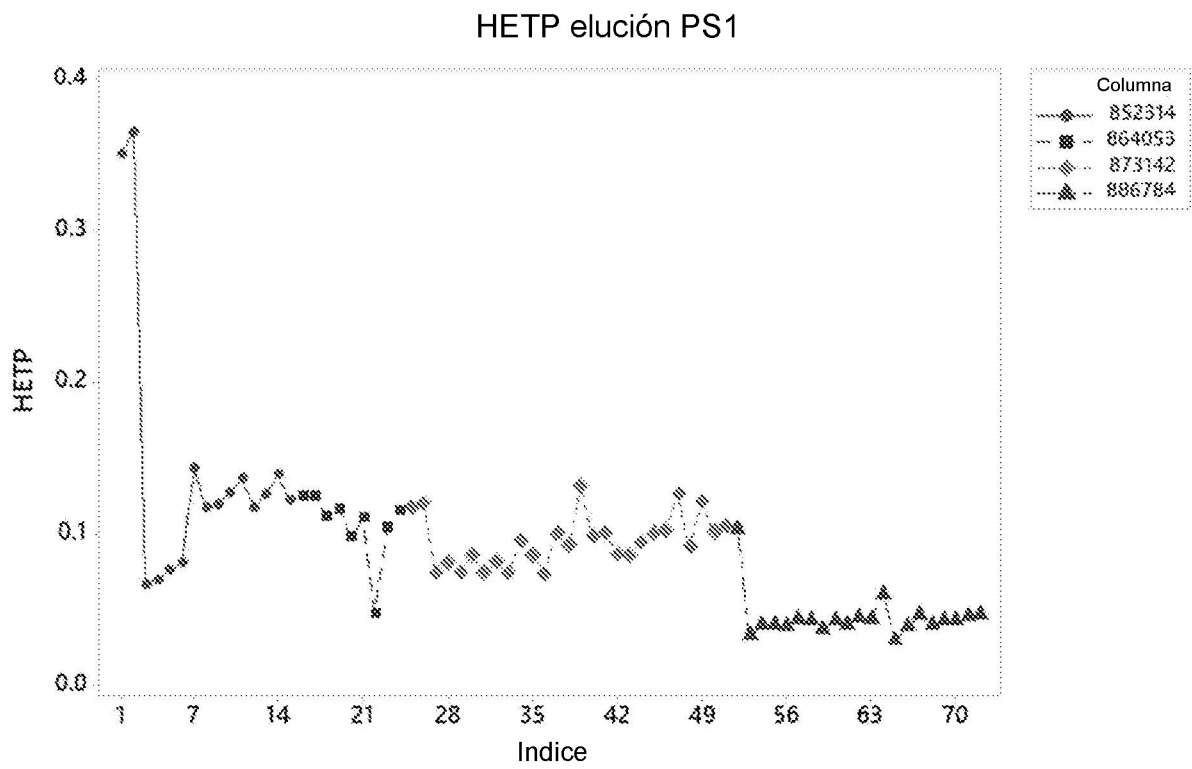


FIG. 46

HETP separación PS1

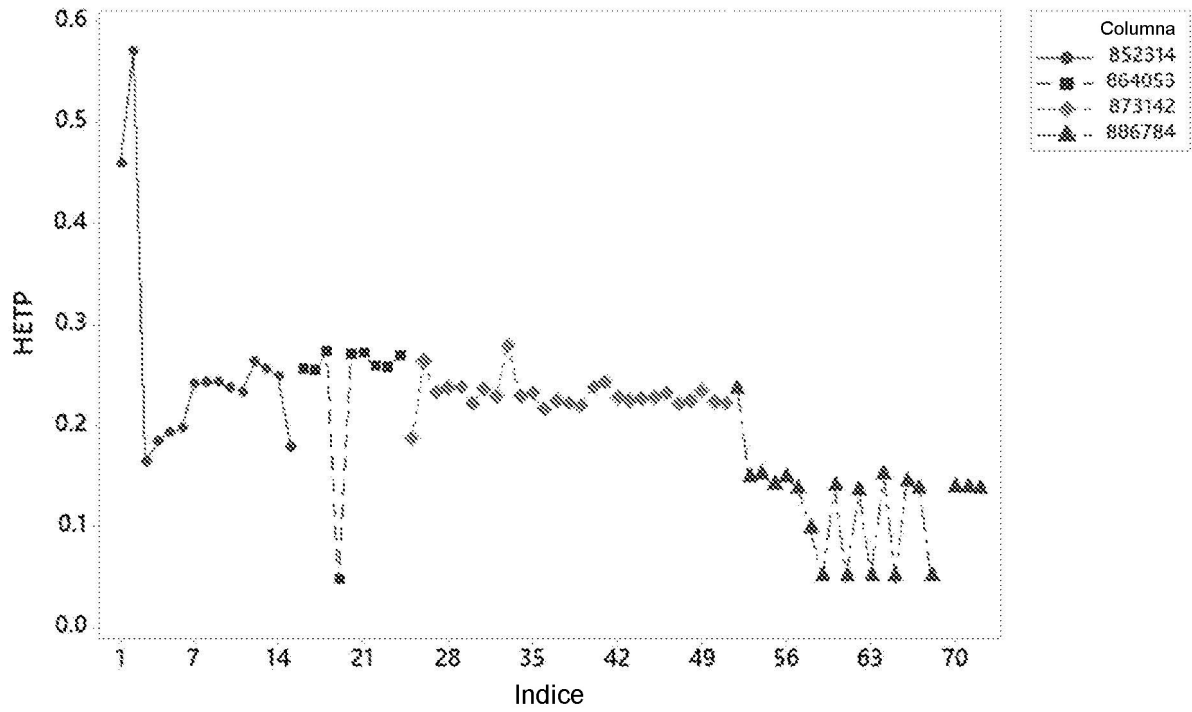


FIG. 47

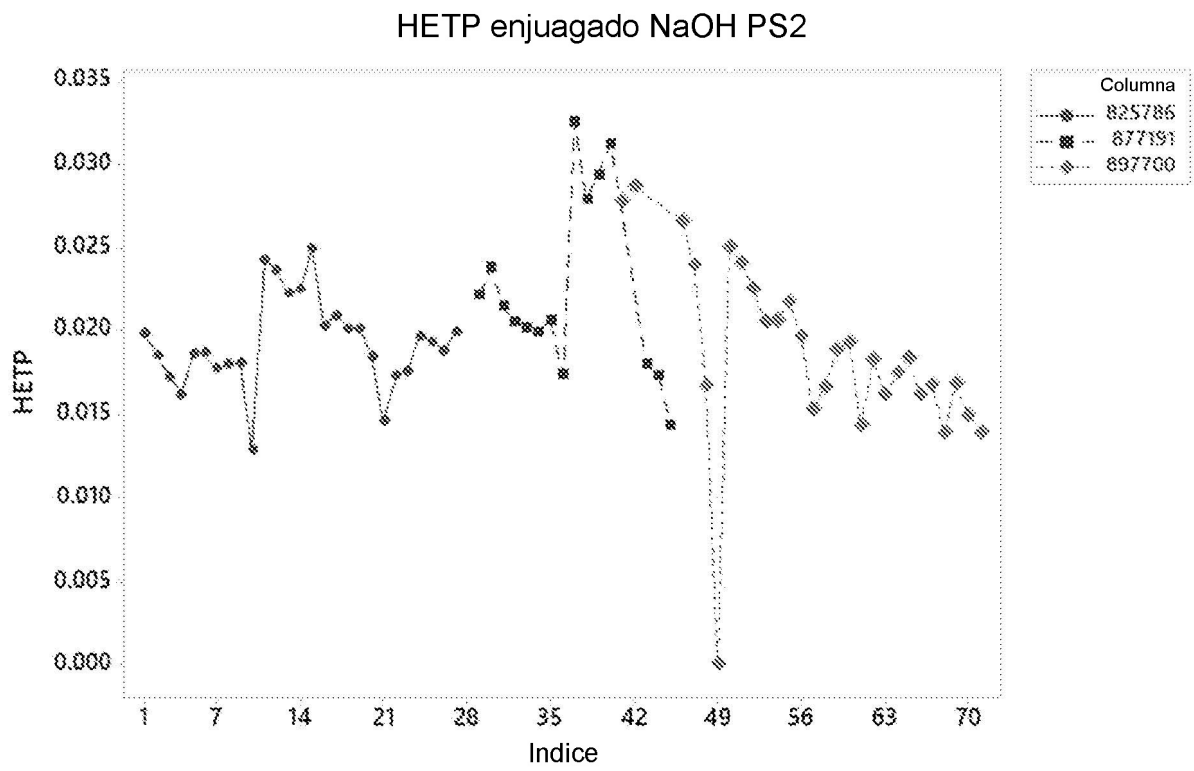


FIG. 48

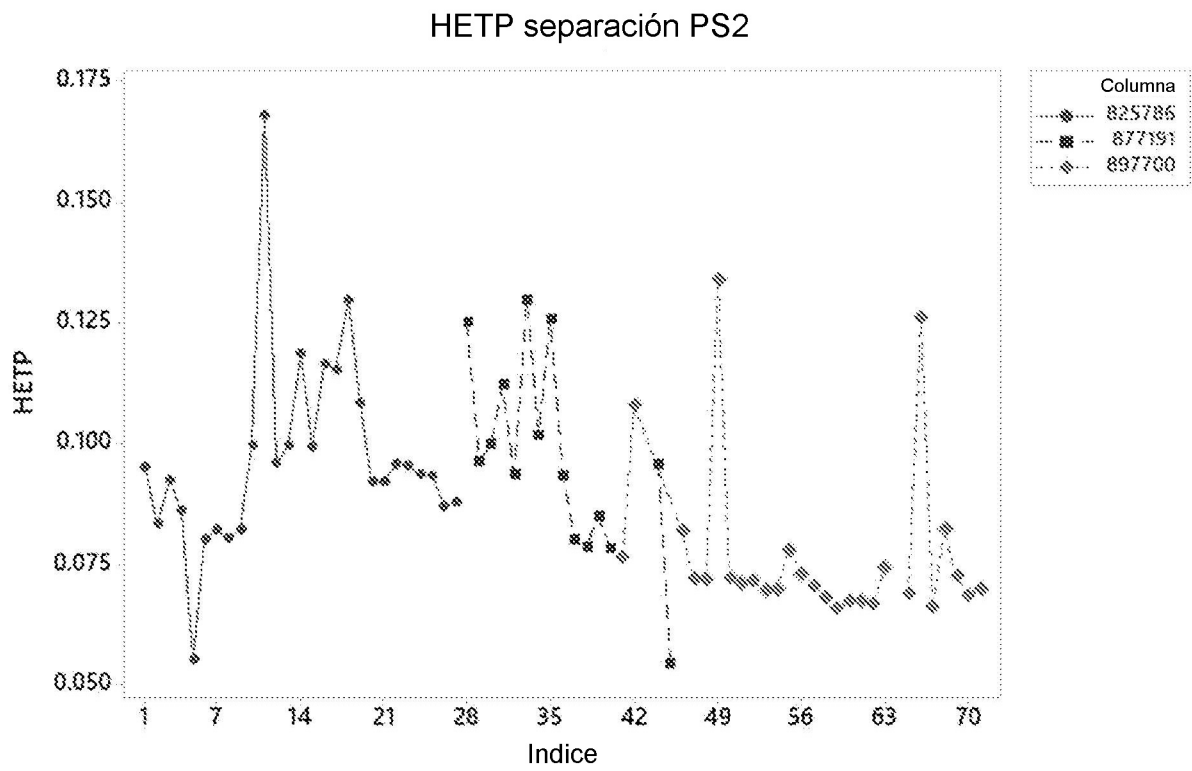


FIG. 49