

## **MÉTODO PARA INACTIVACIÓN VIRAL**

### **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA**

[001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. N° 62/881,692, presentada el 1 de agosto de 2019, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

### **CAMPO TÉCNICO**

[002] Esta descripción generalmente se relaciona con métodos para lograr un pH objetivo en una mezcla que contiene un polipéptido. Más específicamente, esta descripción se refiere a métodos para lograr un pH objetivo en una mezcla que contiene un polipéptido, para ayudar a garantizar que los virus envueltos o las partículas similares a virus se inactiven.

### **ANTECEDENTES**

[003] En la fabricación de polipéptidos, una molécula diana (p. ej., un componente polipeptídico diana de un producto farmacéutico) puede separarse de un medio de cultivo. Los procesos de separación tales como, por ejemplo, la cromatografía de afinidad y similares, pueden realizarse como parte de los procesos de preparación de moléculas diana. Después de dichos procesos de separación, la mezcla resultante que contiene el polipéptido puede incluir potencialmente virus indeseables u otros contaminantes indeseables para su inclusión en un producto farmacéutico. Por lo tanto, son deseables métodos para eliminar o inactivar tales contaminantes.

[004] En algunos procesos de síntesis de moléculas diana a escala comercial, se puede implementar la tecnología analítica de procesos (PAT). PAT incluye sistemas y métodos involucrados en el diseño, análisis y control de procesos de fabricación de moléculas objetivo. PAT incluye la identificación de los parámetros del proceso que afectan las

cualidades de los productos y el monitoreo periódico de los parámetros para garantizar que se mantengan las cualidades de los productos. Los organismos reguladores alientan a PAT a reducir en general los riesgos asociados con las moléculas diana y los productos farmacéuticos. PAT puede proporcionar validación o confirmación estadística de que se cumplen una o más condiciones del proceso que pueden mejorar o mantener la calidad de una molécula y/o producto objetivo.

[005] Los métodos y sistemas descritos en el presente documento pueden mejorar la eficiencia y/o la productividad de los métodos de preparación de polipéptidos, incluida la inactivación viral. Los métodos y sistemas descritos en este documento también pueden mejorar la eficiencia y/o la productividad de los métodos de preparación de productos farmacéuticos y pueden abordar uno o más problemas identificados anteriormente.

### **RESUMEN**

[006] Las realizaciones de la presente descripción pueden estar dirigidas a un método para inactivar un virus en una mezcla, por ejemplo, un eluato. El método puede incluir eluir, de una columna de cromatografía, la mezcla a un pH superior a 3,9 e inferior a 8,5. El método puede incluir además medir la concentración de proteína de la mezcla y medir el pH de la mezcla. A continuación, se puede calcular la cantidad de ácido necesaria para reducir el pH de la mezcla a un pH de inactivación basándose en la concentración de proteína de la mezcla. Después de calcular la cantidad de adición de ácido, se puede añadir una primera porción de ácido a la mezcla, siendo la primera porción de ácido del 68% al 99% de la cantidad de adición de ácido. El método puede incluir además añadir una porción adicional de ácido a la mezcla de modo que el pH de la mezcla sea igual o inferior al pH de inactivación. En los métodos de la presente divulgación, una mezcla se puede mantener al pH de

inactivación durante un intervalo de inactivación, configurado para inactivar un virus en la mezcla.

[007] En algunas realizaciones de la presente descripción, un método para inactivar un virus en una mezcla puede incluir cargar una mezcla que incluye una molécula objetivo en una columna de cromatografía, ocurriendo la carga a un pH mayor o igual a aproximadamente 5,0 y menor o igual a aproximadamente 8,5. El método puede incluir además eluir, de la columna de cromatografía, una mezcla eluida que incluye la molécula diana a un pH superior a aproximadamente 3,9 e inferior o igual a aproximadamente 5,0. El método también puede incluir agregar ácido a la mezcla, formando una combinación de la mezcla y el ácido, donde la combinación está configurada para demostrar una inactivación viral efectiva y la combinación tiene un pH menor o igual a aproximadamente 3,8 y mayor o igual a aproximadamente 3,0. Se puede predeterminar un pH esperado de la combinación utilizando un modelo de confirmación de pH. Además, el pH de la combinación se puede medir y/o registrar. Se puede calcular una diferencia entre el pH esperado y el pH registrado, y con base en la diferencia calculada entre el pH esperado y el pH registrado, se puede tomar una acción correctiva.

[008] Realizaciones adicionales de la presente divulgación pueden incluir un método para desarrollar un protocolo de inactivación ácida. El método puede incluir la producción de un conjunto de eluatos, en el que cada eluato del conjunto de eluatos contiene una molécula diana purificada en un proceso de captura por afinidad de proteínas. El método puede incluir medir el pH y/o la concentración de proteína de cada eluato del grupo de eluatos. Además, cada eluato del grupo de eluatos puede valorarse para determinar la cantidad de ácido necesaria para llevar el eluido a un pH de inactivación. Entonces se puede

hacer una regresión de la relación entre la cantidad de ácido añadido, la concentración de proteína eluida, el pH del eluato y el pH de inactivación.

[009] En algunas realizaciones de la presente divulgación, un método para inactivar virus en una mezcla puede incluir medir la concentración de proteína de la mezcla. A continuación, se puede calcular la cantidad de ácido necesaria para reducir el pH de la mezcla a un pH de inactivación basándose en la concentración de proteína de la mezcla. Después de calcular la cantidad de adición de ácido, se puede añadir a la mezcla la cantidad de ácido necesaria para reducir el pH de la mezcla.

### **BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

[010] Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones ejemplares y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las realizaciones descritas. Cualquier característica de una realización o ejemplo descrito en el presente documento (p. ej., composición, formulación, método, etc.) puede combinarse con cualquier otra realización o ejemplo, y todas esas combinaciones están abarcadas por la presente divulgación. Además, los sistemas y métodos descritos no se limitan a ningún aspecto único ni realización de los mismos, ni a ninguna combinación o permutación de dichos aspectos y realizaciones. En aras de la brevedad, ciertas permutaciones y combinaciones no se tratan y/o ilustran por separado en este documento.

[011] FIG. 1 representa, en forma de diagrama de flujo, un ejemplo de proceso para inactivar virus en un eluato, según la presente descripción;

[012] FIG. 2 representa, en forma de diagrama de flujo, un ejemplo de proceso para inactivar virus en un eluato, según la presente descripción; y

[013] FIG. 3 representa, en forma de diagrama de flujo, un ejemplo de proceso para desarrollar un protocolo de inactivación ácida, según la presente descripción.

[014] Como se usa en este documento, los términos "comprende", "que comprende" o cualquier otra variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no exclusiva, de modo que un proceso, método, artículo o aparato que comprende una lista de elementos no incluye solo esos elementos, pero puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, artículo o aparato. El término "ejemplar" se usa en el sentido de "ejemplo", en lugar de "ideal". Para los términos "por ejemplo" y "como" y sus equivalencias gramaticales, se entiende que sigue la frase "y sin limitación", a menos que se indique explícitamente lo contrario.

[015] Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" pretende dar cuenta de las variaciones debidas a errores experimentales. Cuando se aplican a valores numéricos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden indicar una variación de  $\pm 5\%$  del valor numérico divulgado, a menos que se especifique una variación diferente. Cuando se aplica a los valores de pH, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden indicar una variación de  $\pm 0,05$ . Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[016] Cabe señalar que todos los valores numéricos divulgados en este documento (incluidos todos los valores, límites y rangos divulgados) pueden tener una variación de  $\pm 5\%$  del valor numérico divulgado a menos que se especifique una variación diferente. Los valores de pH divulgados en este documento pueden tener una variación de  $\pm 0,05$ . Además, se entiende que todos los rangos incluyen puntos finales, por ejemplo, de 1 centímetro (cm) a 5 cm incluiría longitudes de 1 cm, 5 cm y todas las distancias entre 1 cm y 5 cm.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[017] Esta divulgación no se limita a las composiciones, formulaciones, fabricantes de materiales, productos farmacéuticos, dispositivos, sistemas, condiciones experimentales o métodos específicos divulgados en el presente documento, ya que son posibles muchas variaciones dentro del alcance de un experto en la materia. La terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitativa.

[018] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Aunque se puede usar cualquier método y material adecuado (p. ej., similar o equivalente a los descritos en el presente documento) en la práctica o prueba de la presente descripción, ahora se describen métodos particulares. Todas las publicaciones mencionadas se incorporan aquí por referencia.

[019] El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polímero de aminoácidos que tenga más de aproximadamente 20 aminoácidos unidos covalentemente a través de enlaces amida. Las proteínas contienen una o más cadenas poliméricas de aminoácidos (p. ej., polipéptidos). Por lo tanto, un polipéptido puede ser una proteína y una proteína puede contener múltiples polipéptidos para formar una sola biomolécula funcional.

[020] Las modificaciones postraduccionales pueden modificar o alterar la estructura de un polipéptido. Por ejemplo, los puentes disulfuro (p. ej., enlaces S-S entre residuos de cisteína) pueden formarse después de la traducción en algunas proteínas. Algunos puentes disulfuro son esenciales para la estructura, función e interacción apropiadas de polipéptidos, inmunoglobulinas, proteínas, cofactores, sustratos y similares. Además de la formación de

enlaces disulfuro, las proteínas pueden estar sujetas a otras modificaciones postraduccionales, como lipidación (p. ej., miristoilación, palmitoilación, farnesoilación, geranilgeranilación y formación de anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), alquilación (p. ej., metilación), acilación, amidación, glicosilación (p. ej., adición de grupos glucosilo en arginina, asparagina, cisteína, hidroxilisina, serina, treonina, tirosina y/o triptófano) y fosforilación (es decir, adición de un grupo fosfato a serina, treonina, tirosina y /o histidina). Las modificaciones posteriores a la traducción pueden afectar la hidrofobicidad, las propiedades de la superficie electrostática u otras propiedades que determinan las interacciones de superficie a superficie en las que participa el polipéptido.

[021] Como se usa aquí, el término "proteína" incluye proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes usadas en investigación o terapia, proteínas trampa y otras proteínas de fusión Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos similares a anticuerpos. moléculas, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Una proteína de interés (POI) puede incluir cualquier polipéptido o proteína que se desee aislar, purificar o preparar de otro modo. Los puntos de interés pueden incluir polipéptidos diana u otros polipéptidos producidos por una célula, incluidos los anticuerpos.

[022] El término "anticuerpo", como se usa en este documento, incluye inmunoglobulinas compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Normalmente, los anticuerpos tienen un peso molecular de más de 100 kDa, como entre 130 kDa y 200 kDa, como aproximadamente 140 kDa, 145 kDa, 150 kDa, 155 kDa o 160 kDa. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una

región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3).

[023] Una clase de inmunoglobulinas denominada inmunoglobulina G (IgG), por ejemplo, es común en el suero humano y comprende cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada a través de un enlace disulfuro de cistina, y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí a través de dos enlaces disulfuro de cistina. Otras clases de inmunoglobulinas humanas incluyen IgA, IgM, IgD e IgE. En el caso de IgG, existen cuatro subclases: IgG 1, IgG 2, IgG 3 e IgG 4. Cada subclase difiere en sus regiones constantes y, como resultado, puede tener diferentes funciones efectoras. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una POI puede comprender un polipéptido diana que incluye IgG. En al menos una realización, el polipéptido diana comprende IgG 4.

[024] El término "anticuerpo", como se usa en este documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un

anticuerpo, y similares, tal como se usan en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada, como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de dominios variable y opcionalmente constante de anticuerpo que codifica ADN. Tal ADN es conocido y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fago-anticuerpo), o puede sintetizarse. El ADN puede ser secuenciado y manipulado químicamente o utilizando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

[025] Las moléculas diana (p. ej., polipéptidos diana) se pueden producir utilizando sistemas de producción basados en células recombinantes, como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levadura (p. ej., *Pichia* sp.) o sistemas de mamíferos (p. ej., células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o multicelulares), células bacterianas (p. ej., cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (p. ej., SF-9, SF-21, células de insectos infectadas por baculovirus, *Trichoplusiani*, etc.), no -células animales humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o

cuadromas. En algunas realizaciones, una célula puede ser una célula humana, de mono, simio, hámster, rata o ratón. En algunas realizaciones, una célula puede ser eucariótica y puede seleccionarse de las siguientes células: CHO (p. ej., CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (p. ej., COS-7), célula retinal, Vero, CV1, riñón (p. ej., HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (p. ej., BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una celda antes mencionada. En algunas realizaciones, una célula puede comprender uno o más genes virales, p. una célula retinal que expresa un gen viral (p. ej., una célula PER.C6<sup>TM</sup>).

[026] El término "molécula diana" se puede usar aquí para referirse a polipéptidos diana (p. ej., anticuerpos, fragmentos de anticuerpos u otras proteínas o fragmentos de proteínas), o a otras moléculas destinadas a ser producidas, aisladas, purificadas y/o incluidas en fármacos. productos (por ejemplo, virus adenoasociados (AAV) u otras moléculas para uso terapéutico). Si bien los métodos de acuerdo con la presente descripción pueden referirse a polipéptidos diana, pueden ser aplicables a otras moléculas diana. Los AAV, por ejemplo, pueden prepararse de acuerdo con métodos adecuados (p. ej., filtración profunda, cromatografía de afinidad y similares), y las mezclas que incluyen AAV (p. ej., eluatos que incluyen AAV) pueden someterse a métodos de acuerdo con la presente descripción. Antes o después de seguir uno o más métodos de la presente descripción, las mezclas que incluyen AAV pueden someterse a procedimientos adicionales (por ejemplo, a la eliminación de "cassettes vacíos" o AAV que no contienen una secuencia objetivo).

[027] El término "contenido viral" se refiere a una descripción cualitativa de una mezcla. Por ejemplo, si una mezcla contiene virus o partículas similares a virus, esa mezcla

tiene contenido viral. En algunas realizaciones, el contenido viral se puede cuantificar en términos de número de partículas de virus o número de unidades infecciosas por volumen de mezcla (es decir, una concentración). El término "concentración viral" puede referirse a una concentración de partículas de virus (p. ej., partículas de virus activas e inactivas) o una concentración de unidades infecciosas.

[028] Un método ejemplar para la inactivación viral puede incluir la adición de ácido a una mezcla para lograr un pH conocido por inactivar algunos virus y partículas similares a virus, y mantener la mezcla en el pH logrado durante un período de tiempo predeterminado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos del presente documento pueden inactivar retrovirus y partículas similares a retrovirus. En algunas realizaciones, un método para preparar una molécula diana a partir de una mezcla que incluye la molécula diana puede comprender poner en contacto la mezcla con un aparato de cromatografía. Dichos aparatos de cromatografía pueden incluir aparatos prefabricados (p. ej., Cadence™ BioSMB (Pall Biosciences), BioSC® (novasep), Varicol® (novasep) u Octave (Semba® Biosciences)), aparatos fabricados a medida, aparatos ensamblados a mano, o simplemente dos o más aparatos de cromatografía por lotes estándar utilizados en tándem.

[029] En algunas realizaciones, la molécula diana se puede eluir de un aparato de cromatografía poniendo en contacto un tampón de separación con un aparato de cromatografía (por ejemplo, una columna de cromatografía) y/o poniendo en contacto un tampón de equilibrio con el aparato de cromatografía. En algunas realizaciones, un tampón de extracción puede comprender agua, una solución alcalina o una solución que comprende alcohol. El agua, como el agua desionizada, por ejemplo, puede tener menos del 5 % en volumen (% en volumen) de iones disueltos, menos del 1 % en volumen de iones disueltos, menos del 0,1 % en volumen de iones disueltos o incluso menos del 0,01 % en volumen de

iones disueltos. Según algunas realizaciones, una solución alcalina puede comprender uno o más compuestos iónicos alcalinos tales como LiOH, NaOH, KOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  u otro compuesto alcalino. La concentración de compuesto alcalino en el tampón de extracción puede oscilar, por ejemplo, desde alrededor de 0,1 N hasta alrededor de 1,5 N, desde alrededor de 0,1 N hasta alrededor de 1 N, desde alrededor de 0,1 N hasta alrededor de 1,5 N, desde alrededor de 0,5 N hasta alrededor de 1,5 N, de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente 0,8 N, de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente 0,6 N, de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente 0,5 N, de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente 0,4 N, o de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente 0,3 N. Por ejemplo, la concentración de compuesto alcalino en el tampón de extracción puede ser de aproximadamente 0,1 N, aproximadamente 0,2 N, aproximadamente 0,3 N, aproximadamente 0,4 N, aproximadamente 0,5 N, aproximadamente 0,6 N, aproximadamente 0,7 N, aproximadamente 0,8 N, aproximadamente 0,9 N, aproximadamente 1 N, aproximadamente 1,1 N, aproximadamente 1,2 N, aproximadamente 1,3 N, aproximadamente 1,4 N o aproximadamente 1,5 N. Un tampón de separación que comprende alcohol puede incluir metanol, etanol, propanol, alcohol bencílico u otro alcohol. La concentración de alcohol en el tampón de extracción puede oscilar entre aproximadamente el 0,1 % en volumen y aproximadamente el 30 % en volumen, como entre aproximadamente el 0,5 % en volumen y aproximadamente el 30 % en volumen, desde aproximadamente el 0,5 % en volumen hasta aproximadamente el 25 % en volumen. .%, de alrededor de 0,5% en volumen a alrededor de 25% en volumen, de alrededor de 0,5% en volumen a alrededor de 25% en volumen, de alrededor de 1% en volumen a alrededor de 20% en volumen, de alrededor de 1% en volumen a aproximadamente 15 % en volumen, desde aproximadamente 1 % en volumen hasta aproximadamente 10 % en volumen. %, de aproximadamente 10 % en

volumen a aproximadamente 50 % en volumen, de aproximadamente 10 % en volumen a aproximadamente 40 % en volumen, de aproximadamente 10 % en volumen a aproximadamente 30 % en volumen, de aproximadamente 10 % en volumen a aproximadamente 25 % en volumen, desde aproximadamente 15 % en volumen hasta aproximadamente 25 % en volumen, o desde aproximadamente 20 % en volumen hasta aproximadamente 25 % en volumen, basado en el peso total del tampón de separación. Por ejemplo, la concentración de alcohol en el tampón de extracción puede ser de aproximadamente 0,1 % en volumen, aproximadamente 0,5 % en volumen, aproximadamente 1 % en volumen, aproximadamente 2 % en volumen, aproximadamente 3 % en volumen, aproximadamente 5 % en volumen, aproximadamente 10 % en volumen, aproximadamente 15 % en volumen, aproximadamente 20 % en volumen o aproximadamente 25 % en volumen

[030] En algunas realizaciones, un tampón de equilibrio puede ser similar o idéntico en composición al tampón de extracción. En otras realizaciones, el tampón de equilibrio puede variar en composición en comparación con el tampón de extracción. En algunas realizaciones, el tampón de equilibrio puede comprender una o más sales tales como, por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, citrato, acetato, fosfato, sulfato, Tris u otra sal.

[031] En una o más realizaciones, se puede emplear un método para la inactivación viral después de que una mezcla que incluye una molécula diana se eluye de un aparato de cromatografía (p. ej., una columna de cromatografía de afinidad de lecho empacado, una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica, una columna de cromatografía de intercambio iónico y/o una columna de cromatografía de exclusión por tamaño). La carga de una molécula objetivo en el aparato de cromatografía puede variar dependiendo de los procesos aguas arriba, mientras que la mezcla que contiene la molécula objetivo puede eluirse

del aparato de cromatografía a un volumen constante. En algunas realizaciones, la mezcla que incluye la molécula diana se carga en una columna de cromatografía a un pH mayor o igual a aproximadamente 5,0 y menor o igual a aproximadamente 8,5, como, por ejemplo, mayor o igual a aproximadamente 5,5 y menos mayor o igual a aproximadamente 8,5, mayor o igual a aproximadamente 6,0 y menor o igual a aproximadamente 8,5, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5. Como resultado de las variaciones en la carga, la concentración de proteína y/o el pH del eluido (p. ej., el eluido del aparato de cromatografía) pueden variar. Debido a esta variación, también varía la cantidad de ácido que se requiere agregar para la inactivación viral.

[032] En los procesos de fabricación convencionales, la inactivación viral a bajo pH se logra a través de una metodología de prueba y error, donde se agrega una cantidad predeterminada de ácido al eluato, se mide el pH de la mezcla de eluato y ácido, y los pasos de adición y medición continúan iterativamente, hasta alcanzar un pH de inactivación. Debido a los costes y pérdidas potenciales que pueden derivarse de la adición de demasiado ácido, tales procesos son conservadores e implican pequeñas cantidades de adición de ácido y largos tiempos de proceso de inactivación, a menudo del orden de horas.

[033] Los aspectos de la presente divulgación pueden proporcionar varios beneficios al proceso de preparación de un polipéptido diana u otra molécula diana. Por ejemplo, se pueden implementar uno o más métodos y/o modelos matemáticos descritos en el presente documento para determinar una cantidad de adición de ácido, p. partículas) a un pH de inactivación. Se puede añadir a la mezcla una cantidad de ácido aproximadamente equivalente a la cantidad de ácido añadido. Como se describe con mayor detalle a continuación, la cantidad de ácido equivalente a la cantidad de ácido añadido se puede añadir como un solo bolo o en dos o más administraciones de ácido. La administración de ácido

para la inactivación viral de esta manera puede ser más eficaz y menos susceptible de error que las metodologías convencionales de prueba y error.

[034] En algunos aspectos de la presente divulgación, como parte de un proceso, se puede conocer o esperar que el contenido viral o el contenido de unidades infecciosas en una mezcla sea mínimo o inexistente. En algunos de estos aspectos de la presente descripción, los sistemas y métodos aquí descritos pueden incorporarse ventajosamente en un proceso de fabricación como parte de PAT, para, por ejemplo, disminuir las posibles variabilidades dentro de un proceso, proporcionar una confirmación en tiempo real del cumplimiento de los estándares del proceso, y/o aumentar la confianza en la integridad de un proceso.

[035] Los beneficios y ventajas adicionales de los aspectos de la presente descripción serán evidentes para los expertos en la materia.

[036] Como se mencionó anteriormente, después de preparar una molécula diana usando uno o más procesos de cromatografía y/o separación, se puede obtener una mezcla (por ejemplo, un eluido). En algunas realizaciones, se pueden tomar una o más medidas de la mezcla, que incluyen, por ejemplo, la concentración de proteína, la concentración de la molécula diana, el pH o una combinación de los mismos. La concentración de proteína se puede medir por cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, por espectroscopía de luz ultravioleta/visible. En algunas realizaciones, la concentración de proteína se mide utilizando una longitud de onda característicamente absorbida por la molécula diana, que puede ser un polipéptido. En dichas realizaciones, la concentración total de proteína puede ser aproximadamente equivalente a la concentración de la molécula diana (p. ej., polipéptido diana). En algunas realizaciones, una mezcla que incluye la molécula diana puede tener una concentración de proteína de aproximadamente 7,0 gramos de proteína por litro de eluato (g/L) a aproximadamente 35,0 g/L, mayor o igual a 7,0 g/L, menor o igual a igual a

aproximadamente 20,0 g/L, aproximadamente 8,5 g/L a aproximadamente 18,5 g/L, o aproximadamente 10,0 g/L a aproximadamente 17,0 g/L.

[037] El pH de la mezcla se puede medir por cualquier método adecuado. La medición precisa y consistente del pH es importante para la inactivación exitosa de las proteínas virales por un pH bajo. Las mediciones de pH pueden verse afectadas por la temperatura, el tipo de sonda de pH utilizada, las diferencias individuales entre sondas de pH del mismo tipo y/o las interacciones físicas entre el medio medido y la sonda de pH. Incluso en procesos de medición de pH estandarizados, la variación de  $\pm 0,05$  pH puede ser común. En los campos de fabricación de polipéptidos o inactivación viral, las variaciones en la escala de  $\pm 0,05$  pH pueden representar aproximadamente el 20% del rango de pH de trabajo y pueden afectar negativamente la inactivación viral y/o la validación del proceso. Tales variaciones pueden incluso agravarse con el tiempo, lo que lleva a la desviación del instrumento y una variación más extrema en las mediciones de pH. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las variaciones en la medición del pH pueden tenerse en cuenta al medir el pH. En algunas realizaciones, como se mencionó, el pH del eluato puede medirse mediante un método estandarizado, con el objetivo de reducir o eliminar la variabilidad en las mediciones de pH. La estandarización de un método de medición de pH puede incluir el uso de un solo fabricante de sondas de pH, el uso de un solo lote de sondas de pH, la medición del pH a una temperatura predeterminada, la estandarización de una matriz de muestra de medición y similares. En algunas realizaciones, el pH del eluato se puede medir con un medidor de pH, como, por ejemplo, un medidor de pH potenciométrico. En algunas realizaciones, el eluido que incluye la molécula diana puede tener un pH mayor o igual a aproximadamente 3,9 y menor o igual a aproximadamente 8,5, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 3,9 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente 3,9 a aproximadamente 5,5, de

aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,4, aproximadamente 3,9 a aproximadamente 4,4 o aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,3. Como se usa aquí, un valor de pH, o un rango de valores de pH, puede tener una variación de  $\pm 0,05$  unidades de pH.

[038] La presencia de algunos virus y partículas similares a virus (p. ej., virus envueltos, retrovirus, partículas similares a retrovirus, seudorrabia, virus del herpes, etc.) en mezclas (p. ej., eluatos), formulaciones y/o productos farmacéuticos pueden afectar los componentes, características o usabilidad de tales mezclas, formulaciones y/o productos farmacéuticos. Por ejemplo, la presencia de virus no deseados o partículas similares a virus en un producto farmacéutico puede afectar la estabilidad del producto, reducir la vida útil de un producto o provocar que el producto no cumpla con las normas internas, especificaciones compendiales o reglamentarias (por ejemplo, la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.). Algunos virus o partículas similares a virus pueden provocar efectos clínicos, como una reacción inmunogénica tras la administración de un producto farmacéutico que incluye un virus. Las realizaciones de la presente divulgación pueden ser útiles para inactivar virus o partículas similares a virus para disminuir o eliminar cualquiera o todos estos efectos indeseables. Por ejemplo, las realizaciones de la presente divulgación pueden ser aplicables a mezclas (por ejemplo, eluatos) que tienen contenido viral después de uno o más procesos de purificación de polipéptidos (por ejemplo, un proceso de separación que incluye una columna de afinidad de proteína A).

[039] En algunas realizaciones, antes de la inactivación viral, se puede medir la conductividad de la mezcla. En algunas realizaciones, se pueden agregar una o más sales a una mezcla para ajustar su conductividad (por ejemplo, aumentar la conductividad) antes de la inactivación viral. La una o más sales pueden incluir sales de metales alcalinos, sales de

metales alcalinotérreos, haluros y/o uno o más compuestos ionoactivos. Sin estar limitado por la teoría, la adición de una o más sales para ajustar la conductividad puede reducir la agregación de moléculas diana, virus o partículas similares a retrovirus. La agregación de moléculas objetivo, virus o partículas similares a retrovirus puede afectar la forma en que las superficies de estas especies interactúan con el ácido. La adición de sales a una mezcla puede aumentar la actividad iónica de la mezcla, aumentar la conductividad de la mezcla y disminuir la agregación de virus o moléculas diana. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la conductividad de una mezcla puede estar relacionada con el grado de agregación de moléculas o virus diana.

[040] En algunos casos, las realizaciones de la presente divulgación pueden ser aplicables a mezclas con un contenido viral extremadamente bajo (por ejemplo, menor o igual a aproximadamente 0,0001 partículas virales o unidades infecciosas por ml), o incluso un contenido viral inexistente. La cromatografía y otros procesos de separación, solos o en combinación, pueden purificar y/o separar adecuadamente una molécula objetivo y eliminar virus no deseados o partículas similares a virus de una mezcla. En algunos de estos casos, los métodos de acuerdo con la presente divulgación pueden ser beneficiosos para servir como garantía adicional de que se inactivan virus o partículas similares a virus y para garantizar la estabilidad del producto, la seguridad del producto, la eficacia del producto y el cumplimiento de las especificaciones internas o reglamentarias. Por lo tanto, las realizaciones de la presente divulgación también pueden ser aplicables a mezclas sin ningún contenido viral conocido para, por ejemplo, garantizar que se cumplan las pautas reglamentarias y/o proporcionar un control de calidad redundante.

[041] Los protocolos y métodos de inactivación viral descritos en este documento pueden implementarse sin afectar negativamente a ciertos tipos de virus, como los AAV (por

ejemplo, un AAV que incluye una secuencia objetivo). Por ejemplo, ventajosamente, los protocolos y métodos descritos en el presente documento se pueden realizar sin degradar los AAV. Por lo tanto, los métodos descritos en el presente documento pueden ser adecuados para su uso en mezclas que contienen un AAV como molécula diana.

[042] Como se mencionó anteriormente, los virus en una mezcla se pueden inactivar manteniendo la mezcla a un pH de inactivación durante un intervalo de inactivación. El pH de inactivación puede ser un pH inferior o igual a 3,8 y superior o igual a 3,0, como por ejemplo un pH de 3,35 a 3,8, inferior o igual a 3,75 y superior o igual a 3,0, inferior a o igual a 3,7 y mayor o igual a 3,0, menor o igual a 3,65 y mayor o igual a 3,0, menor o igual a 3,6 y mayor o igual a 3,0, menor o igual a 3,55 y mayor o igual a 3,0 igual a 3,0, menor o igual a 3,5 y mayor o igual a 3,0, menor o igual a 3,45 y mayor o igual a 3,0, menor o igual a 3,4 y mayor o igual a 3,0, 3,35 a 3,75, 3,5 a 3,8, 3,5 a 3,75, 3,5 a 3,7, 3,5 a 3,6 o 3,5 a 3,65. Como se usa aquí, un valor de pH, o un rango de valores de pH, puede tener una variación de  $\pm 0,05$  unidades de pH. Si se establece un pH de inactivación demasiado alto, existe el riesgo de variación dentro del proceso que permita una inactivación viral insuficiente. Si se establece un pH de inactivación demasiado bajo, existe el riesgo de desnaturalizar la molécula diana u otras proteínas, o de otra manera alterar la mezcla de manera no deseada.

[043] [043] El intervalo de inactivación describe el intervalo de tiempo durante el cual la mezcla se mantiene al pH de inactivación. El intervalo de inactivación puede ser de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 90 minutos, como, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 30 minutos aproximadamente 75 minutos, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 45 minutos

a aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 75 minutos, aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 75 minutos, o aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 95 minutos. Mantener la mezcla a un pH de inactivación durante un intervalo de inactivación puede reducir, eliminar o asegurar la ausencia de actividad viral en la mezcla. El entorno de pH bajo puede desnaturalizar las proteínas virales, como, por ejemplo, las proteínas de la cubierta viral. Las proteínas virales desnaturalizadas pueden inactivar los retrovirus y las partículas similares a retrovirus, reduciendo la actividad viral no deseada de la mezcla.

[044] La reducción de la actividad viral en una mezcla puede cuantificarse mediante un factor de reducción. Se puede calcular un factor de reducción de acuerdo con la Ecuación 1, que se muestra a continuación,

$$\text{Factor de Reduccion} = \log \left( \frac{v_1 \times c_1}{v_2 \times c_2} \right) \quad \text{Ec. 1}$$

donde V1 es el volumen de la mezcla antes de la inactivación viral, C1 es la concentración viral o unidades infecciosas por volumen de la mezcla antes de la inactivación viral, V2 es el volumen de la mezcla después de la inactivación viral y C2 es la concentración viral de la mezcla después de la inactivación viral. inactivación viral. En diversas realizaciones de la presente divulgación, incluidos los métodos para la inactivación viral, se logra un factor de reducción mayor o igual a 2,5, como, por ejemplo, un factor de reducción mayor o igual a 3, mayor o igual a 3,5, mayor mayor o igual a 4, mayor o igual a 4,5, o mayor o igual a 5. Como se usa en el presente documento, "inactivación viral efectiva" puede referirse a la inactivación viral asociada con un factor de reducción mayor o igual a 2,5, mayor o igual a igual a 3, mayor o igual a 3,5, mayor o igual a 4, mayor o igual a 4,5, o mayor o igual a 5.

[045] De acuerdo con una o más realizaciones, se puede calcular una cantidad de adición de ácido con base en la concentración de proteína de la mezcla y un pH de inactivación. Por ejemplo, se puede calcular una cantidad de adición de ácido de acuerdo con la Ecuación 2, que se muestra a continuación,

$$w = Ax + By + C \quad \text{Ec. 2}$$

donde  $x$  es la concentración de proteína de la mezcla en gramos por litro (g/L),  $y$  es el pH de inactivación,  $w$  es la cantidad de ácido añadido en moles de ácido por kilogramo de mezcla (mol/kg), y  $A$ ,  $B$ , y  $C$  son constantes. La constante  $A$  de la Ecuación 2 tiene unidades de litro-mol de ácido por gramo-kilogramo de mezcla (L·mol/g·kg). La constante  $A$  puede ser mayor o igual a 0,0003 L·mol/g·kg y menor o igual a 0,0006 L·mol/g·kg, como, por ejemplo, aproximadamente 0,0003 L·mol/g·kg a aproximadamente 0,0005 L·mol/g·kg, aproximadamente 0,0004 L·mol/g·kg a aproximadamente 0,0006 L·mol/g·kg, aproximadamente 0,00035 L·mol/g·kg a aproximadamente 0,0005 L·mol/g·kg, aproximadamente 0,00035 L·mol/g·kg a aproximadamente 0,0006 L·mol/g·kg, o aproximadamente 0,0004 L·mol/g·kg a aproximadamente 0,00055 L·mol/g·kg. Las constantes  $B$  y  $C$  de la Ecuación 2 tienen unidades de moles de ácido por kilogramos de mezcla (mol/kg). La constante  $B$  puede ser mayor o igual a -0,1 mol/kg y menor o igual a 0 mol/kg, como, por ejemplo, aproximadamente -0,1 mol/kg a aproximadamente 0 mol/kg, aproximadamente -0,1 mol/kg a aproximadamente -0,05 mol/kg, aproximadamente -0,05 mol/kg a aproximadamente 0 mol/kg, o aproximadamente -0,08 mol/kg a aproximadamente -0,01 mol/kg. La constante  $C$  puede ser mayor o igual a 0,02 mol/kg y menor o igual a 0,1 mol/kg, como, por ejemplo, aproximadamente 0,02 mol/kg a aproximadamente 0,1 mol/kg, aproximadamente 0,02 mol/kg a aproximadamente 0,05 mol/kg, aproximadamente 0,05

mol/kg a aproximadamente 0,1 mol/kg, o aproximadamente 0,04 mol/kg a aproximadamente 0,08 mol/kg.

[046] En algunas realizaciones, la cantidad de adición de ácido se puede calcular en función de la concentración de proteína de la mezcla, el pH de inactivación y el pH de la mezcla. Por ejemplo, se puede calcular una cantidad de adición de ácido de acuerdo con la Ecuación 3, que se muestra a continuación,

$$w = Ex + Fy + Gz + H \quad \text{Ec. 3}$$

donde  $x$  es la concentración de proteína de la mezcla en gramos por litro (g/L),  $y$  es el pH de inactivación,  $z$  es el pH de la mezcla,  $w$  es la cantidad de adición de ácido en moles de ácido por kilogramo de mezcla (mol/kg), y  $E$ ,  $F$ ,  $G$  y  $H$  son constantes. La constante  $E$  de la Ecuación 3 tiene unidades de litro-moles de ácido por gramo-kilogramo de mezcla ( $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ ) y las constantes  $F$ ,  $G$  y  $H$  tienen unidades de moles de ácido por kilogramo de mezcla (mol/kg). La constante  $E$  puede ser mayor o igual a 0,00005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$  y menor o igual a 0,0005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ , como, por ejemplo, aproximadamente 0,00005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$  a aproximadamente 0,0005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ , aproximadamente 0,0001  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$  a 0,0005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ , aproximadamente 0,00005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$  a 0,00045  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ , aproximadamente 0,0001  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$  a aproximadamente 0,00035  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ , o aproximadamente 0,00035  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$  a aproximadamente 0,0005  $\text{L}\cdot\text{mol}/\text{g}\cdot\text{kg}$ . La constante  $F$  puede ser mayor o igual a -0,2 mol/kg y menor o igual a 0 mol/kg, como, por ejemplo, aproximadamente -0,1 mol/kg a aproximadamente 0 mol/kg, aproximadamente -0,1 mol/kg a aproximadamente -0,05 mol/kg, aproximadamente -0,05 mol/kg a aproximadamente 0 mol/kg, o aproximadamente -0,08 mol/kg a aproximadamente -0,01 mol/kg. La constante  $G$  puede ser mayor o igual a 0 mol/kg y menor o igual a 0,03 mol/kg, como, por ejemplo, aproximadamente 0 mol/kg a aproximadamente 0,03 mol/kg, aproximadamente 0,001 mol/kg a aproximadamente 0,03

mol/kg, aproximadamente 0,005 mol/kg a aproximadamente 0,3 mol/kg, o aproximadamente 0,005 mol/kg a aproximadamente 0,025 mol/kg. La constante H puede ser un número mayor o igual a -0,1 mol/kg y menor o igual a 0,1 mol/kg, como, por ejemplo, aproximadamente -0,1 mol/kg a aproximadamente 0,1 mol/kg, aproximadamente -0,08 mol /kg a aproximadamente 0,08 mol/kg, aproximadamente -0,05 mol/kg a aproximadamente 0,1 mol/kg, o aproximadamente -0,1 mol/kg a aproximadamente 0,05 mol/kg.

[047] La ecuación específica que relaciona la concentración de proteína de la mezcla con la cantidad de ácido añadido y el pH de inactivación (que puede, opcionalmente, depender del pH de la mezcla) puede variar según la molécula diana y/o el sistema ácido utilizado. Los valores de las constantes definidas anteriormente, aplicadas a una molécula diana y sistema ácido dados, pueden determinarse por regresión de acuerdo con las ecuaciones generales definidas anteriormente. Como se describe en la sección de ejemplos a continuación, se encuentra inesperadamente que la cantidad de ácido añadido tiene una fuerte correlación con la concentración de proteína de la mezcla de acuerdo con las ecuaciones definidas anteriormente. Esta correlación inesperadamente fuerte puede permitir que las ecuaciones generales descritas aquí y sus derivados se incorporen a PAT.

[048] En una o más realizaciones, la cantidad de ácido añadido es de aproximadamente 0,002 moles de ácido por kilogramo de mezcla (mol/kg) a aproximadamente 0,025 mol/kg, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,002 mol/kg a aproximadamente 0,025 mol/kg. aproximadamente 0,01 mol/kg a aproximadamente 0,025 mol/kg, aproximadamente 0,002 mol/kg a aproximadamente 0,020 mol/kg, o aproximadamente 0,005 mol/kg a aproximadamente 0,020 mol/kg.

[049] En algunas realizaciones, después de calcular la cantidad de adición de ácido, se puede agregar ácido a una mezcla para llevar la mezcla al pH de inactivación. Por ejemplo,

en al menos una realización, se puede añadir a la mezcla un bolo de ácido, equivalente a la cantidad de ácido añadido, para que el pH de la mezcla sea inferior o igual al pH de inactivación. En otras realizaciones, se agrega una primera porción de ácido a la mezcla, luego, posteriormente, se pueden agregar una o más porciones adicionales de ácido a la mezcla de modo que el pH de la mezcla sea igual o inferior al pH de inactivación. En dichas realizaciones, la primera porción de ácido es del 68 % al 99 % de la cantidad de adición de ácido, tal como, por ejemplo, aproximadamente del 75 % a aproximadamente el 99 %, aproximadamente del 80 % a aproximadamente el 99 %, aproximadamente del 85 % a aproximadamente el 99 %, aproximadamente 90% a aproximadamente 99%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 99%.

[050] La primera porción de ácido se puede dosificar de manera que la molécula diana en una mezcla con el pH más bajo posible no se desnaturalice por la adición de la primera porción. Las porciones adicionales de ácido pueden incluir una o más adiciones de ácido que ocurren después de la adición de la primera porción de ácido, como, por ejemplo, 3 adiciones de ácido, 4 adiciones de ácido o 5 adiciones de ácido que ocurren después de la adición de la primera porción de ácido. Cada adición de una o más adiciones de ácido puede ser en una cantidad que es del 0,1 % al 32 % de la cantidad de adición de ácido, tal como, por ejemplo, aproximadamente del 0,1 % al 30 % aproximadamente, del 0,1 % al 25 % aproximadamente, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20%, aproximadamente 1% a aproximadamente 25%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%. Cada adición de una o más adiciones de ácido puede ser en la misma

cantidad que una o más adiciones de ácido. En otras realizaciones, cada adición de ácido es la misma cantidad que cada otra adición de ácido.

[051] En algunas realizaciones, el pH puede medirse después de agregar la primera porción de ácido a la mezcla, pero antes de agregar porciones adicionales de ácido. En algunas de tales realizaciones, el pH de la mezcla, medido después de agregar la primera porción de ácido, es mayor o igual a 3,5 y menor o igual a 3,75, como, por ejemplo, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 3,75, aproximadamente 3,6 a aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 3,65, aproximadamente 3,6 a aproximadamente 3,75 o aproximadamente 3,5 a aproximadamente 3,65. Como se usa aquí, un valor de pH, o un rango de valores de pH, puede tener una variación de  $\pm 0,02$  unidades de pH.

[052] El ácido se puede añadir en forma de una o más soluciones ácidas. Las soluciones ácidas pueden incluir cualquier ácido adecuado, como, por ejemplo, HCl, HBr,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HO}_2\text{C}_2\text{O}_2\text{H}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{HClO}$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  o una combinación de los mismos. Además o alternativamente, las soluciones ácidas pueden incluir una o más sales, tales como, por ejemplo, glicina, arginina, acetato de sodio y/o cloruro de sodio.

[053] Después de agregar la cantidad de ácido a la mezcla que incluye la molécula diana, la mezcla formada tiene un pH que es igual o inferior al pH de inactivación. En algunas realizaciones, se puede medir el pH de la mezcla formada, por ejemplo, para confirmar que está dentro del rango deseado. Como se describió anteriormente, la mezcla se puede mantener al pH de inactivación durante un intervalo de inactivación. Después de que la mezcla se mantiene al pH de inactivación durante un intervalo de inactivación, puede ocurrir una reducción en la actividad viral equivalente a un factor de reducción de, por ejemplo, mayor

o igual a 2,5, mayor o igual a 3, mayor o igual a 3,5, o mayor o igual a 4. Después de que la mezcla se mantiene en el pH de inactivación durante el intervalo de inactivación, la mezcla se puede titular agregando una solución alcalina para que el pH de la mezcla sea mayor o igual a 4,5 y menos. mayor o igual a 8,5, como por ejemplo mayor o igual a 4,5 y menor o igual a 8,5, mayor o igual a 5,0 y menor o igual a 8,5, mayor o igual a 5,8 y menor o igual a 8,5 igual a 8,5, mayor o igual a 5,9 y menor o igual a 8,5, mayor o igual a 6,0 y menor o igual a 8,5, mayor o igual a 6,1 y menor o igual a 8,5, mayor o igual a 6,2 y menor o igual a 8,5, mayor o igual a 6,3 y menor mayor o igual a 8,5, o mayor o igual a 6,4 y menor o igual a 8,5. Como se usa aquí, un valor de pH, o un rango de valores de pH, puede tener una variación de  $\pm 0,02$  unidades de pH. La solución alcalina puede incluir una o más bases, como por ejemplo NaOH, KOH, LiOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$  y/o  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ .

[054] En algunas realizaciones, la mezcla se titula menos de una hora después de agregar la primera porción de ácido, como, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 40 minutos, menos de aproximadamente 35 minutos, o menos de aproximadamente 30 minutos después de agregar la primera porción de ácido.

[055] Los aspectos de la presente descripción también pueden incluir métodos para determinar una función predictiva del pH de la combinación (es decir, mezcla y ácido combinados). Por ejemplo, se puede determinar una función que predice el pH de la combinación (p. ej., un pH de inactivación) basándose en una concentración de proteína medida y/o el pH de la mezcla, y una cantidad de ácido añadida a la mezcla. Dicha función se puede utilizar para detectar un error de procesamiento (por ejemplo, mezcla insuficiente, muestreo deficiente o similar) o una deficiencia en el equipo (error instrumental, desviación del instrumento, mal funcionamiento de la sonda de pH o similar).

[056] En algunas realizaciones, el pH esperado de una mezcla acidificada puede estar predeterminado según un modelo de confirmación. El modelo de confirmación puede tener la forma de la Ecuación 4, que se muestra a continuación,

$$y = Kx + Lw + Mz + N \quad \text{Ec. 4}$$

donde y es el pH de inactivación, x es la concentración de proteína de la mezcla en gramos por litro (g/L), z es el pH de la mezcla, w es la cantidad de adición de ácido en moles de ácido por kilogramo de mezcla (mol/kg) , y K, L, M y N son constantes. La constante K de la Ecuación 4 tiene unidades de litros por gramo, la constante L tiene unidades de kilogramo de mezcla por moles de ácido y las constantes M y N no tienen unidades. La constante K puede ser mayor o igual a 0 L/g y menor o igual a 0,03 L/g, como, por ejemplo, aproximadamente 0 L/g a aproximadamente 0,03 L/g, aproximadamente 0,001 L/g a aproximadamente 0,03 L/g, aproximadamente 0 L/g a aproximadamente 0,025 L/g, o aproximadamente 0,001 L/g a aproximadamente 0,025 L/g. La constante L puede ser mayor o igual a -80 kg/mol y menor o igual a -60 kg/mol, como, por ejemplo, aproximadamente -75 kg/mol a aproximadamente -60 kg/mol, aproximadamente -80 kg /mol a aproximadamente -65 kg/mol, o aproximadamente -75 kg/mol a aproximadamente -65 kg/mol. La constante M puede ser mayor o igual a 0 y menor o igual a 2,0, tal como, por ejemplo, aproximadamente 0 a aproximadamente 2,0, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2,0, aproximadamente 0 a aproximadamente 1,7 o aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,7. La constante N puede ser un número mayor o igual a -1,0 y menor o igual a 0, como, por ejemplo, aproximadamente -1,0 a aproximadamente 0, aproximadamente -1,0 a aproximadamente -0,1 o aproximadamente -0,9 a aproximadamente -0,1.

[057] En algunas realizaciones, el pH y la concentración de proteínas de una mezcla antes de la adición de ácido pueden medirse y/o registrarse. En función del pH de la mezcla,

la concentración de proteínas de la mezcla y la cantidad de ácido añadido, se puede predeterminar un pH esperado de la mezcla acidificada utilizando el modelo de confirmación. Se puede medir, registrar y/o comparar un pH real de la mezcla acidificada con el pH esperado. La comparación del pH registrado con el pH esperado puede incluir el cálculo de una diferencia (por ejemplo, una diferencia porcentual) entre el pH registrado y el pH esperado.

[058] En algunas realizaciones, si la diferencia entre el pH registrado y el pH esperado es mayor que una cantidad umbral, se pueden tomar medidas correctivas. Una cantidad umbral puede ser, por ejemplo,  $\pm 0,03$  pH desde el pH esperado,  $\pm 0,05$  pH desde el pH esperado,  $\pm 0,07$  pH desde el pH esperado,  $\pm 0,09$  pH desde el pH esperado,  $\pm 0,1$  pH desde el pH esperado,  $\pm 0,15$  pH del pH esperado, o  $\pm 0,2$  pH del pH esperado. La acción correctiva puede incluir, pero no se limita a, ajustar un medidor de pH, ajustar la composición de la mezcla, ajustar una o más condiciones ambientales del proceso, o una combinación de las mismas. El ajuste de un medidor de pH puede incluir la estandarización, el medidor de pH, la recalibración del medidor de pH, la limpieza, el restablecimiento y/o el reemplazo de la sonda de pH, el ajuste de la solución del electrodo de referencia, el reemplazo de una parte del medidor de pH, el ajuste de la posición de la sonda de pH, y/u otra acción que altere la relación señal/ruido del medidor de pH. Ajustar la composición de la mezcla puede incluir reformular cualquier solución componente de la mezcla o composición corriente arriba, alterar las condiciones del proceso o los componentes del aparato de uno o más procesos cromatográficos o de separación, y/u otra acción que altere la composición material de la mezcla. El ajuste de una o más condiciones ambientales del proceso puede incluir el ajuste de los procesos y sistemas de mezcla y/u homogeneización, el ajuste de la temperatura del proceso, el ajuste de la humedad del proceso, el ajuste de la presión del proceso o una

combinación de los mismos. Dichos ajustes basados en la desviación de los parámetros esperados pueden incorporarse como parte del PAT.

[059] Las ecuaciones y modelos matemáticos descritos anteriormente pueden generarse como parte de un método para desarrollar un protocolo de inactivación ácida. El método para desarrollar el protocolo de inactivación ácida puede incluir la producción de un grupo de mezclas (p. ej., eluatos), en el que cada mezcla del grupo contiene una molécula diana purificada en un proceso de captura por afinidad de proteínas. Por ejemplo, se puede recoger un grupo de muestras del eluato de una columna de cromatografía de afinidad de proteínas. El método puede incluir además medir el pH y la concentración de proteína (por ejemplo, la concentración de la molécula diana) de cada muestra. Después de determinar el pH y la concentración de proteína de cada muestra, cada muestra puede titularse para determinar la cantidad de ácido necesaria para llevar la muestra a un pH de inactivación. En algunas realizaciones, el pH de inactivación se puede definir como un rango lo suficientemente amplio como para que se puedan realizar dos o más iteraciones de titulación, lo que permite la recopilación de múltiples puntos de datos de cada muestra del grupo. En otras realizaciones, solo se puede recopilar un solo punto de datos de cada muestra.

[060] En algunas realizaciones, se puede hacer una regresión de una relación (p. ej., un modelo matemático) entre la cantidad de ácido añadido, la concentración de proteína eluida, el pH de la mezcla y/o el pH de inactivación. La relación puede retroceder de acuerdo con la Ecuación 2 o la Ecuación 3, como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, un método para desarrollar un protocolo de inactivación ácida comprende además hacer retroceder un modelo de confirmación. El modelo de confirmación puede retroceder de acuerdo con la Ecuación 4, descrita anteriormente.

[061] FIG. 1 representa, en forma de diagrama de flujo, un proceso ejemplar 100 para inactivar virus en una mezcla, según la presente descripción. De acuerdo con el paso 101, una mezcla a un primer pH (p. ej., superior a 3,9) se puede eluir de una columna de cromatografía. De acuerdo con el paso 102, la concentración de proteína (por ejemplo, la concentración de la molécula diana) de la mezcla se puede medir mediante, por ejemplo, espectroscopía de luz ultravioleta/visible u otro método.

Opcionalmente, la conductividad y/o el pH de la mezcla se pueden medir mediante, por ejemplo, un medidor de pH potenciométrico u otro método. De acuerdo con el paso 103, se pueden agregar una o más sales a la mezcla en una cantidad suficiente para ajustar la conductividad de la mezcla. De acuerdo con el paso 104, se puede calcular una cantidad de ácido necesaria para reducir el pH de la mezcla a un segundo pH (por ejemplo, un pH de inactivación). Este cálculo puede realizarse sobre la base de la concentración de proteína de la mezcla, el pH de la mezcla o una combinación de los mismos. Según el paso 105, se puede añadir a la mezcla una primera porción de ácido. En algunas realizaciones, la primera porción de ácido es un bolo de ácido equivalente a la cantidad de adición de ácido calculada. En otras realizaciones, la primera porción de ácido puede ser del 68% al 99% del volumen o cantidad de ácido como la cantidad de adición de ácido calculada. De acuerdo con el paso 105, opcionalmente, se puede agregar ácido secundario a la mezcla de manera que la combinación de mezcla y ácido esté en o por debajo del segundo pH (p. ej., el pH de inactivación). De acuerdo con el paso 106, la combinación de mezcla y ácido puede mantenerse en el segundo pH (p. ej., el pH de inactivación) durante un intervalo de inactivación, inactivando el virus en el eluato. En algunas realizaciones,

[062] FIG. 2 representa, en forma de diagrama de flujo, un ejemplo de proceso 200 para inactivar virus en una mezcla, según la presente divulgación. De acuerdo con el paso

201, una mezcla que incluye una molécula diana puede cargarse en una columna de cromatografía a un primer pH (por ejemplo, mayor o igual a aproximadamente 5,0 y menor o igual a aproximadamente 8,5). De acuerdo con el paso 202, una mezcla eluida a un segundo pH (por ejemplo, superior a aproximadamente 3,9 y menor o igual a aproximadamente 5,0) se puede eluir de la columna de cromatografía. De acuerdo con el paso 203, la concentración de proteína (por ejemplo, la concentración de la molécula diana) de la mezcla eluida puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopia de luz ultravioleta/visible y/o registrarse. De acuerdo con el paso 204, opcionalmente, se puede medir el pH y/o la conductividad de la mezcla eluida. El pH puede medirse mediante, por ejemplo, un medidor de pH potenciométrico y/o registrarse. De acuerdo con el paso 205, se pueden agregar una o más sales a la mezcla en una cantidad suficiente para ajustar la conductividad de la mezcla. De acuerdo con el paso 206, se puede agregar ácido a la mezcla eluida, formando una combinación de la mezcla eluida y el ácido, de modo que la combinación esté configurada para demostrar una inactivación viral efectiva. Además, la combinación puede tener un pH inferior o igual al segundo pH (por ejemplo, inferior o igual a aproximadamente 3,8 y superior o igual a aproximadamente 3,0). De acuerdo con el paso 207, se puede predeterminar un pH esperado de la combinación utilizando un modelo de confirmación de pH. De acuerdo con el paso 208, el pH de la combinación puede medirse y/o registrarse. De acuerdo con el paso 209, se puede calcular una diferencia entre el pH esperado y el pH medido/registrado de la combinación. De acuerdo con el paso 210, se puede tomar una acción correctiva con base en la diferencia calculada entre el pH esperado y el pH medido y/o registrado de la combinación.

[063] FIG. 3 representa, en forma de diagrama de flujo, un ejemplo de proceso 300 para desarrollar un protocolo de inactivación ácida, según la presente divulgación. De

acuerdo con el paso 301, se puede producir un conjunto de muestras de eluidos, en el que cada muestra de eluato del conjunto de muestras de eluatos contiene una molécula diana purificada en un proceso de captura por afinidad. De acuerdo con el paso 302, la concentración de proteína (p. ej., la concentración de la molécula diana) de cada muestra de eluato del conjunto de muestras de eluato puede medirse mediante, por ejemplo, espectroscopia de luz ultravioleta/visible. Opcionalmente, el pH de cada muestra de eluato del grupo de muestras de eluato puede medirse, por ejemplo, mediante un medidor de pH potenciométrico. De acuerdo con el paso 303, la cantidad de ácido necesaria para reducir el pH de cada muestra de eluato a un pH de inactivación puede determinarse valorando cada muestra de eluato del grupo de muestras de eluato. De acuerdo con el paso 304, se puede hacer una regresión de la relación entre la cantidad de ácido añadido, la concentración de proteína del eluato, el pH del eluato y/o el pH de inactivación. De acuerdo con el paso 305, opcionalmente, también puede retroceder un modelo de confirmación.

[064] Aunque cada una de las FIGs. 1-3 representa un orden específico de pasos, debe entenderse que los pasos realizados y el orden en que se realizan pueden modificarse. Además, pueden agregarse o eliminarse pasos (p. ej., uno o más de los pasos de medición y/o registro) de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Además, aunque cada una de las FIGs. 1-3 representan los pasos en relación con un eluato, debe entenderse que los pasos pueden ser aplicables a cualquier mezcla que contenga una molécula diana.

### **EJEMPLOS**

[065] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente divulgación sin ser de naturaleza limitativa. Se entiende que la presente descripción abarca aspectos y realizaciones adicionales consistentes con la descripción anterior y los siguientes ejemplos.

[066] En los siguientes ejemplos, se preparó un polipéptido diana a partir de una mezcla que incluía el polipéptido diana, la proteína de la célula huésped, virus y otros contaminantes, impurezas y componentes. El polipéptido diana se preparó en células de ovario de hámster chino cultivadas en un cultivo en suspensión.

### **EJEMPLO 1**

[067] El polipéptido diana se eluyó de una columna de afinidad de proteína A y se obtuvieron múltiples muestras de una mezcla. La concentración de proteína de cada muestra de mezcla se obtuvo mediante espectroscopia ultravioleta/visible y se muestra en la Tabla 1, a continuación, en unidades de gramos de proteína por litro de mezcla. Adicionalmente, se midió el pH de cada muestra de la mezcla y se muestra en la Tabla 1.

[068] El grupo de eluatos incluía cuarenta muestras de eluidos (es decir, cuarenta muestras de la mezcla) y cada muestra se tituló a un pH de inactivación de 3,35 a 3,86 con una solución 0,25 M de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) para determinar la cantidad de adición de ácido (p. ej., una cantidad de ácido que sería necesario agregar para llevar la mezcla al pH de inactivación). Para seis de las cuarenta muestras (Muestras 1 a 6, que se muestran en la Tabla 1), la titulación se realizó en múltiples iteraciones para producir múltiples puntos de datos. Por ejemplo, 30,89 gramos de ácido por kilogramo de mezcla que llevan a la Muestra n.º 1 a un pH de inactivación de 3,70 es un punto de datos, y cuando se agregan 5,35 gramos adicionales de ácido por kilogramo de mezcla, 36,24 gramos de ácido por kilogramo de mezcla llevan La muestra No. 1 a un pH de inactivación de 3,59 es otro punto de datos. Los datos para estas titulaciones se muestran en la Tabla 1, a continuación, con la cantidad de ácido adicional que se muestra en unidades de gramos de ácido por kilogramo de mezcla y moles de ácido por kilogramo de mezcla.

| Muestra No. | Concentración de proteína de mezcla (g/L) | pH de la mezcla | pH de inactivation | Cantidad de adición de ácido (g/kg) | Cantidad de adición de ácido (mol/kg) |
|-------------|-------------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 1           | 17,6                                      | 4,25            | 3,70               | 30,89                               | 0,007723                              |
| 1           | 17,6                                      | 4,25            | 3,59               | 36,24                               | 0,009060                              |
| 2           | 17,3                                      | 4,23            | 3,86               | 22,75                               | 0,005688                              |
| 2           | 17,3                                      | 4,23            | 3,74               | 28,15                               | 0,007038                              |
| 2           | 17,3                                      | 4,23            | 3,63               | 33,20                               | 0,008300                              |
| 3           | 18,7                                      | 4,30            | 3,81               | 27,23                               | 0,006808                              |
| 3           | 18,7                                      | 4,30            | 3,67               | 33,39                               | 0,008348                              |
| 3           | 18,7                                      | 4,30            | 3,53               | 39,17                               | 0,009793                              |
| 4           | 15,0                                      | 4,24            | 3,84               | 21,96                               | 0,005490                              |
| 4           | 15,0                                      | 4,24            | 3,68               | 29,00                               | 0,007250                              |
| 4           | 15,0                                      | 4,24            | 3,53               | 35,19                               | 0,008798                              |
| 5           | 15,5                                      | 4,23            | 3,74               | 27,78                               | 0,006945                              |
| 5           | 15,5                                      | 4,23            | 3,65               | 31,43                               | 0,007858                              |
| 6           | 13,9                                      | 4,23            | 3,76               | 25,10                               | 0,006275                              |
| 6           | 13,9                                      | 4,23            | 3,68               | 28,20                               | 0,007050                              |
| 6           | 13,9                                      | 4,23            | 3,63               | 30,20                               | 0,007550                              |
| 7           | 17,5                                      | 4,26            | 3,70               | 33,41                               | 0,008353                              |
| 8           | 15,5                                      | 4,17            | 3,43               | 38,00                               | 0,009500                              |
| 9           | 15,8                                      | 4,18            | 3,66               | 28,33                               | 0,007083                              |
| 10          | 15,4                                      | 4,20            | 3,70               | 27,67                               | 0,006918                              |
| 11          | 15,3                                      | 4,18            | 3,54               | 32,67                               | 0,008168                              |
| 12          | 7,11                                      | 4,04            | 3,8                | 11,75                               | 0,002938                              |
| 13          | 7,28                                      | 4,04            | 3,39               | 24,67                               | 0,006168                              |
| 14          | 15,6                                      | 4,17            | 3,68               | 27,50                               | 0,006875                              |
| 15          | 7,31                                      | 4,01            | 3,69               | 14,67                               | 0,003668                              |
| 16          | 7,30                                      | 4,05            | 3,41               | 25,00                               | 0,006250                              |
| 17          | 11,8                                      | 4,13            | 3,38               | 33,33                               | 0,008333                              |
| 18          | 15,4                                      | 4,14            | 3,45               | 38,00                               | 0,009500                              |
| 19          | 7,32                                      | 4,06            | 3,39               | 25,00                               | 0,006250                              |
| 20          | 7,33                                      | 4,06            | 3,51               | 20,33                               | 0,005083                              |
| 21          | 15,5                                      | 4,20            | 3,41               | 40,00                               | 0,01000                               |
| 22          | 7,34                                      | 4,06            | 3,69               | 15,00                               | 0,003750                              |
| 23          | 19,3                                      | 4,35            | 3,53               | 46,00                               | 0,01150                               |
| 24          | 14,3                                      | 4,30            | 3,72               | 31,00                               | 0,007750                              |
| 25          | 8,76                                      | 4,22            | 3,41               | 33,67                               | 0,008418                              |
| 26          | 18,7                                      | 4,36            | 3,45               | 50,33                               | 0,01258                               |
| 27          | 18,6                                      | 4,37            | 3,42               | 51,67                               | 0,01292                               |
| 28          | 13,9                                      | 4,27            | 3,56               | 36,42                               | 0,009105                              |
| 29          | 8,67                                      | 4,22            | 3,4                | 33,33                               | 0,008333                              |
| 30          | 6,88                                      | 4,21            | 3,64               | 25,83                               | 0,006458                              |
| 31          | 8,70                                      | 4,23            | 3,57               | 28,58                               | 0,007145                              |
| 32          | 8,69                                      | 4,20            | 3,70               | 23,83                               | 0,005958                              |

|    |      |      |      |       |          |
|----|------|------|------|-------|----------|
| 33 | 8,68 | 4,21 | 3,41 | 33,75 | 0,008438 |
| 34 | 8,86 | 4,21 | 3,71 | 24,33 | 0,006083 |
| 35 | 18,4 | 4,33 | 3,72 | 37,08 | 0,009270 |
| 36 | 8,73 | 4,21 | 3,41 | 33,75 | 0,008438 |
| 37 | 18,6 | 4,35 | 3,76 | 35,67 | 0,008918 |
| 38 | 18,6 | 4,37 | 3,39 | 53,33 | 0,01333  |
| 39 | 8,74 | 4,22 | 3,55 | 29,33 | 0,007333 |
| 40 | 7,34 | 4,05 | 3,35 | 25,00 | 0,006250 |

Tabla 1 - Datos de Titulación de Muestra

**EJEMPLO 2**

[069] Los datos de titulación que se muestran en la Tabla 1 se usaron para hacer una regresión de la relación entre la concentración de proteína de la mezcla, el pH de inactivación y la cantidad de ácido agregado, de acuerdo con la Ecuación 2. Se determinó que la ecuación de regresión (Ecuación 5), que se muestra a continuación, tenía un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,84.

$$w = 0,0004532x - 0,01135y + 0,04213 \quad \text{Ec. 5}$$

**EJEMPLO 3**

[070] Todavía con referencia a los datos de titulación que se muestran en la Tabla 1, se hizo una regresión de la relación entre la concentración de proteína de la mezcla, el pH de la mezcla, el pH de inactivación y la cantidad de ácido añadido, de acuerdo con la Ecuación 3. La ecuación de regresión (Ecuación 6), que se muestra a continuación, se determinó para tienen un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,97. Inesperadamente, la cantidad de ácido añadido estuvo altamente correlacionada con la relación entre la concentración de proteína, el pH de la mezcla y el pH de inactivación que se muestra en las Ecuaciones generales 2 y 3.

$$w = 0,0001986x - 0,01162y + 0,01510z - 0,01692 \quad \text{Ec. 6}$$

**EJEMPLO 4**

[071] Los datos de titulación que se muestran en la Tabla 1 también se usaron para hacer una regresión de un modelo de confirmación de acuerdo con la Ecuación general 4. Se determinó que la ecuación de regresión (Ecuación 7), que se muestra a continuación, tenía un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 0,93. También inesperadamente, el pH de inactivación estuvo altamente correlacionado con la relación entre la concentración de proteína, el pH de la mezcla y el pH de inactivación.

$$y = 0,01488x - 71,65w + 1,094z - 0,6727 \quad \text{Ec. 7}$$

[072] Los expertos en la técnica apreciarán que la concepción en la que se basa esta descripción se puede usar fácilmente como base para diseñar otros métodos y sistemas para llevar a cabo los diversos propósitos de la presente descripción. Además, mientras que los aspectos de la presente descripción se describen con respecto a pasos particulares en procesos particulares (p. ej., inactivación viral en una mezcla), un experto en la técnica apreciará que los sistemas y métodos descritos en este documento pueden ser aplicables en otros contextos (por ejemplo, inactivación viral en otras mezclas que incluyen un polipéptido, como antes de un proceso de cromatografía o después de la combinación de un eluato con otros ingredientes en el proceso de elaboración de una sustancia farmacológica formulada). En consecuencia, las reivindicaciones no deben considerarse limitadas por la descripción anterior.