

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290442** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.04.26**

(51) Int. Cl. **C07K 1/36** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.04.23**

---

(54) **СПОСОБ ВИРУСНОЙ ИНАКТИВАЦИИ**

---

(31) **62/881,692**

(32) **2019.08.01**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/029468**

(87) **WO 2021/021260 2021.02.04**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Маггила Джон, Бармасс Эндрю,  
Чибороски Марк (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к системам и способам модуляции pH в смеси, содержащей полипептид. pH можно модулировать для любой подходящей цели, например для инактивации вируса в смеси. Способы могут включать элюирование смеси из хроматографической колонки (например, элюата), имеющего pH больше, например, 3,9 и меньше, например, 8,5. Способы могут дополнительно включать одно или более измерений концентрации белка в смеси и измерение pH смеси. Затем может быть рассчитано количество кислоты, необходимое для снижения pH смеси до целевого pH на основе концентрации белка в смеси, pH смеси или того и другого. После расчета добавляемого количества кислоты к смеси может быть добавлена порция кислоты, которой достаточно для достижения целевого pH.

---

**A1**

**202290442**

**202290442**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572648EA/042

### СПОСОБ ВИРУСНОЙ ИНАКТИВАЦИИ

Перекрестная ссылка на родственную заявку

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании Временной заявки на патент № 62/881,692, поданной 1 августа 2019 г., полное описание которой настоящим включено посредством ссылки в полном объеме.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Настоящее описание в целом относится к способам достижения целевого рН в смеси, содержащей полипептид. Более конкретно, настоящее описание относится к способам достижения целевого значения рН в смеси, содержащей полипептид, способствуя обеспечению инактивации оболочечных вирусов или вирусоподобных частиц.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] При производстве полипептидов целевая молекула (например, целевой полипептидный компонент лекарственного средства) может быть отделена от культуральной среды. Процессы разделения, такие как, например, аффинная хроматография и т. п., могут выполняться как часть процессов получения целевых молекул. После таких процессов разделения полученная смесь, содержащая полипептид, потенциально может включать нежелательные вирусы или другие примеси, нежелательные для включения в лекарственное средство. Поэтому необходимы способы удаления или инактивации таких загрязнителей.

[004] В некоторых процессах синтеза целевых молекул в промышленных масштабах может применяться процессно-аналитическая технология (РАТ). РАТ включает в себя системы и методы, связанные с проектированием, анализом и контролем процессов производства целевых молекул. РАТ включает в себя определение параметров процесса, влияющих на качество продуктов, и периодический мониторинг параметров для обеспечения поддержания качества продуктов. Регулирующие органы поощряют РАТ в целом снижать риски, связанные с целевыми молекулами и лекарственными средствами. РАТ может обеспечить статистическую проверку или подтверждение того, что одно или более условий процесса соблюдаются, что может улучшить или сохранить качество целевой молекулы и/или продукта.

[005] Способы и системы, раскрытые в настоящем описании, могут повысить эффективность и/или производительность способов получения полипептидов, включая вирусную инактивацию. Раскрытые в настоящем описании способы и системы могут также повысить эффективность и/или продуктивность способов получения лекарственного средства и могут решить одну или более проблем, указанных выше.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Способы и системы, раскрытые в настоящем описании, могут повысить эффективность и/или производительность способов получения полипептидов, включая

вирусную инактивацию. Способ может включать элюирование из хроматографической колонки смеси при рН больше 3,9 и меньше 8,5. Способ может дополнительно включать измерение концентрации белка в смеси и измерение рН смеси. Затем может быть рассчитано количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси до рН инактивации, на основе концентрации белка в смеси. После расчета добавляемого количества кислоты к смеси может быть добавлена первая порция кислоты, которая составляет от 68% до 99% добавляемого количества кислоты. Способ может дополнительно включать добавление к смеси дополнительной порции кислоты таким образом, чтобы рН смеси было равно или ниже рН инактивации. В способах по настоящему изобретению смесь можно поддерживать при рН инактивации в течение периода инактивации, сконфигурированного для инактивации вируса в смеси.

[007] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ инактивации вируса в смеси может включать загрузку смеси, включающей целевую молекулу, на хроматографическую колонку, причем загрузка происходит при рН больше или равном приблизительно 5 и меньше или равном приблизительно 8,5. Способ может дополнительно включать элюирование из хроматографической колонки элюированной смеси, включающей молекулу, при рН больше чем приблизительно 3,9 и меньше или равном примерно 5. Способ может также включать добавление кислоты к смеси с образованием комбинации смеси и кислоты, где комбинация сконфигурирована так, чтобы демонстрировать эффективную вирусную инактивацию, и комбинация имеет рН меньше или равное приблизительно 3,8 и больше или равное приблизительно 3. Ожидаемое рН комбинации может быть заранее определено с использованием модели подтверждения рН. Кроме того, рН комбинации может быть измерено и/или зарегистрировано. Можно рассчитать разницу между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН, и на основе рассчитанной разницы между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН можно осуществить корректирующие действия.

[008] Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения могут включать способ разработки протокола кислотной инактивации. Способ может включать получение пула элюатов, где каждый элюат из пула элюатов содержит целевую молекулу, очищенную в процессе аффинного захвата белка. Способ может включать измерение рН и/или концентрации белка в каждом элюате из пула элюатов. Кроме того, каждый элюат из пула элюатов можно титровать для определения количества кислоты, необходимого для доведения элюата до рН инактивации. Затем может быть регрессирована зависимость между количеством добавленной кислоты, концентрацией белка в элюате, рН элюата и рН инактивации.

[009] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ инактивации вируса в смеси может включать измерение концентрации белка в смеси. Затем может быть рассчитано количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси до рН инактивации, на основе концентрации белка в смеси. После расчета добавляемого

количества кислоты к смеси может быть добавлено количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[010] Прилагаемые чертежи, которые включены в настоящее описание и составляют его часть, иллюстрируют различные иллюстративные варианты осуществления и вместе с описанием служат для объяснения принципов раскрытых вариантов осуществления. Любые признаки варианта осуществления или примера, описанные в настоящем документе (например, композиция, состав, способ и т. д.), могут быть объединены с любым другим вариантом осуществления или примером, и все такие комбинации охвачены настоящим описанием. Более того, описанные системы и способы не ограничиваются ни одним их аспектом или вариантом осуществления, ни какими-либо комбинациями или перестановками таких аспектов и вариантов осуществления. Для краткости определенные перестановки и комбинации не обсуждаются и/или не иллюстрируются в настоящем описании отдельно.

[011] На ФИГ. 1 изображен в виде блок-схемы типичный процесс инактивации вируса в элюате в соответствии с настоящим изобретением;

[012] На ФИГ. 2 изображен в виде блок-схемы типичный процесс инактивации вируса в элюате в соответствии с настоящим изобретением;

[013] На ФИГ. 3 изображен в виде блок-схемы типичный процесс разработки протокола кислотной инактивации в соответствии с настоящим изобретением.

[014] Используемые в настоящем описании термины «содержит», «содержащий» или любые другие их варианты предназначены для охвата неисключающего включения, так что процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, не включает только эти элементы, но может включать другие элементы, не перечисленные явно или не присущие такому процессу, способу, изделию или устройству. Термин «иллюстративный» используется в значении «примера», а не «идеала». Для терминов «например» и «такой как», а также их грамматических эквивалентов выражение «и без ограничений» понимается как следующая, если явно не указано иное.

[015] Используемый в настоящем описании термин «примерно» предназначен для учета вариаций, связанных с экспериментальной ошибкой. Применительно к числовым значениям термины «примерно» и «приблизительно» могут указывать на отклонение +/- 5% от раскрытого числового значения, если не указано иное отклонение. Применительно к значениям рН термины «примерно» и «приблизительно» могут указывать на отклонение +/- 0,05. При использовании в настоящем описании, формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

[016] Следует отметить, что все числовые значения, раскрытые в настоящем описании (включая все раскрытые значения, пределы и диапазоны), могут отличаться на +/- 5% от раскрытого числового значения, если не указано иное отклонение. Значения рН, раскрытые в настоящем документе, могут варьироваться в пределах +/- 0,05. Кроме того, все диапазоны должны включать конечные точки, например, от 1 сантиметра (см) до 5 см

будут включать длины 1 см, 5 см и все расстояния от 1 см до 5 см.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[017] Настоящее описание не ограничивается конкретными композициями, составами, производителями материалов, лекарственными препаратами, устройствами, системами, экспериментальными условиями или конкретными способами, раскрытыми в настоящем документе, так как многие вариации возможны в рамках компетенции специалиста в данной области. Терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

[018] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее описание. Хотя любые подходящие способы и материалы (например, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе) могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, теперь описаны конкретные способы. Все упомянутые публикации включены настоящим в качестве ссылки.

[019] Используемый в настоящем описании термин «полипептид» относится к любому аминокислотному полимеру, содержащему более чем примерно 20 аминокислот, ковалентно связанных через амидные связи. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей (например, полипептидов). Таким образом, полипептид может быть белком, а белок может содержать несколько полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы.

[020] Посттрансляционные модификации могут модифицировать или изменять структуру полипептида. Например, в некоторых белках посттрансляционно могут образовываться дисульфидные мостики (например, связи S-S между цистеиновыми остатками). Некоторые дисульфидные мостики необходимы для корректной структуры, функции и взаимодействия полипептидов, иммуноглобулинов, белков, кофакторов, субстратов и тому подобного. В дополнение к образованию дисульфидной связи белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям, таким как липидирование (например, миристоилирование, пальмитоилирование, фарнезоилирование, геранилгеранилирование и образование гликозилфосфатидилинозитолового (GPI) якоря), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, добавление гликозильных групп к аргинину, аспарагину, цистеину, гидроксизину, серину, треонину, тирозину и/или триптофану) и фосфорилирование (т. е. добавление фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Посттрансляционные модификации могут влиять на гидрофобность, электростатические свойства поверхности или другие свойства, которые определяют взаимодействия поверхность-поверхность, в которых участвует полипептид.

[021] Используемый в настоящем описании термин «белок» включает

биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие слитые с Fc белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, человеческие антитела, биспецифические антитела, фрагменты антител, антитело-подобные молекулы, наноантитела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т. п. Представляющий интерес белок ((Protein-Of-Interest) POI) может включать любой полипептид или белок, который желательно выделить, очистить или получить иным образом. POI могут включать полипептиды-мишени или другие полипептиды, продуцируемые клеткой, включая антитела.

[022] Термин «антитело», используемый в настоящем документе, включает иммуноглобулины, состоящие из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Обычно антитела имеют молекулярную массу более 100 кДа, например от 130 кДа до 200 кДа, например, примерно 140 кДа, 145 кДа, 150 кДа, 155 кДа или 160 кДа. Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем описании как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть далее разделены на области гипервариабельности, называемыми областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежаясь областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут сокращенно обозначаться как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут сокращенно обозначаться как LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

[023] Класс иммуноглобулинов, называемый иммуноглобулином G (IgG), например, распространен в сыворотке крови человека и состоит из четырех полипептидных цепей - двух легких цепей и двух тяжелых цепей. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью через дисульфидную связь цистеина, а две тяжелые цепи связаны друг с другом через две дисульфидные связи цистеина. Другие классы иммуноглобулинов человека включают IgA, IgM, IgD и IgE. В случае IgG существует четыре подкласса: IgG 1, IgG 2, IgG 3 и IgG 4. Каждый подкласс отличается своими константными областями и, как следствие, может иметь разные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, POI может содержать целевой полипептид, включая IgG. По меньшей мере, в одном варианте осуществления целевой полипептид включает IgG 4.

[024] Используемый в настоящем описании термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины

«антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и тому подобное, используемые в настоящем описании, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антитела, используя любые подходящие стандартные методы, такие как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующих переменные и необязательно константные домены. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать химическим манипуляциям или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот, и т. д.

[025] Целевые молекулы (например, целевые полипептиды) могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточные или многоклеточные), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т. д.), клетки микобактерий, грибные клетки, дрожжевые клетки (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolicus* и т. д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом, *Trichoplusia ni* и т. д.), клетки животных, но не человека, человеческие клетки или слитые клетки, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть клеткой человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть эукариотической и может быть выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, почечные клетки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальные), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, C127-клетки, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, клетки миеломы, опухолевые клетки и клеточные линии, полученные из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка может содержать один или более вирусных генов, например клетка сетчатки, экспрессирующая вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

[026] Термин «целевая молекула» может использоваться в настоящем описании для

обозначения целевых полипептидов (например, антител, фрагментов антител или других белков или белковых фрагментов) или других молекул, предназначенных для продуцирования, выделения, очистки и/или включения в состав лекарственного средства (например, аденоассоциированные вирусы (AAV) или другие молекулы для терапевтического применения). Хотя способы согласно настоящему изобретению могут относиться к целевым полипептидам, они могут быть применимы и к другим целевым молекулам. AAV, например, могут быть получены в соответствии с подходящими способами (например, глубинной фильтрацией, аффинной хроматографией и т. п.), а смеси, включающие AAV (например, элюаты, включающие AAV), могут быть подвергнуты способам в соответствии с настоящим изобретением. До или после применения одного или более способов по настоящему изобретению смеси, включающие AAV, могут быть подвергнуты дополнительным процедурам (например, удалению «пустых кассет» или AAV, не содержащих целевой последовательности).

[027] Термин «вирусное содержание» относится к качественному описанию смеси. Например, если смесь содержит вирусы или вирусоподобные частицы, эта смесь содержит вирусы. В некоторых вариантах осуществления вирусное содержание может быть определено количественно с точки зрения количества вирусных частиц или количества инфекционных единиц на объем смеси (т. е. концентрации). Термин «концентрация вируса» может относиться к концентрации вирусных частиц (например, активных и неактивных вирусных частиц) или концентрации инфекционных единиц.

[028] Иллюстративный способ инактивации вирусов может включать добавление кислоты к смеси для достижения pH, которое, как известно, инактивирует некоторые вирусы и вирусоподобные частицы, и выдерживание смеси при достигнутом pH в течение заданного периода времени. Например, в некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы могут инактивировать ретровирусы и ретровирусоподобные частицы. В некоторых вариантах осуществления способ получения целевой молекулы из смеси, включающей целевую молекулу, может включать приведение смеси в контакт с хроматографическим аппаратом. Такие хроматографические аппараты могут включать предварительно изготовленные аппараты (например, Cadence™ BioSMB (Pall Biosciences), BioSC® (novasep), Varicol® (novasep) или Octave (Semba® Biosciences)), аппараты, изготовленные по индивидуальному заказу, аппараты ручной сборки, или просто два или более стандартных аппарата периодической хроматографии, используемых в тандеме.

[029] В некоторых вариантах осуществления целевая молекула может быть элюирована из хроматографического аппарата путем приведения в контакт десорбирующего буфера с хроматографическим аппаратом (например, хроматографической колонкой) и/или приведения уравнивающего буфера в контакт с хроматографическим аппаратом. В некоторых вариантах осуществления десорбирующий буфер может содержать воду, щелочной раствор или раствор, содержащий спирт. Вода, такая как деионизированная вода, например, может содержать менее чем 5 процентов по

объему (об.%) растворенных ионов, менее чем 1 об.% растворенных ионов, менее чем 0,1 об.% растворенных ионов или даже менее чем 0,01 об.% растворенных ионов. Согласно некоторым вариантам осуществления щелочной раствор может содержать одно или более щелочных ионных соединений, таких как LiOH, NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH или другое щелочное соединение. Концентрация щелочного соединения в десорбирующем буфере может варьироваться, например, от примерно 0,1 Н до примерно 1,5 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 1 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 1,5 Н, от примерно 0,5 Н до примерно 1,5 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,8 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,6 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,5 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,4 Н или от примерно 0,1 Н до примерно 0,3 Н. Например, концентрация щелочного соединения в десорбирующем буфере может составлять примерно 0,1 Н, примерно 0,2 Н, примерно 0,3 Н, примерно 0,4 Н, примерно 0,5 Н, примерно 0,6 Н, примерно 0,7 Н, примерно 0,8 Н, примерно 0,9 Н, примерно 1 Н, примерно 1,1 Н, примерно 1,2 Н, примерно 1,3 Н, примерно 1,4 Н или примерно 1,5 Н. Десорбирующий буфер, содержащий спирт, может включать метанол, этанол, пропанол, бензиловый спирт или другой спирт. Концентрация спирта в десорбирующем буфере может составлять от примерно 0,1 об.% до примерно 30 об.%, Например от примерно 0,5 об.% до примерно 30 об.%, от примерно 0,5 об.% до примерно 25 об.%, от примерно 0,5 об.% до примерно 25 об.%, от примерно 1 об.% до примерно 20 об.%, от примерно 1 об.% до примерно 15 об.%, от примерно 1 об.% до примерно 10 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 50 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 40 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 30 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 25 об. об.%, от примерно 15 об.% до примерно 25 об.% или от примерно 20 об.% до примерно 25 об.% в пересчете на общую массу десорбирующего буфера. Например, концентрация спирта в десорбирующем буфере может составлять примерно 0,1 об.%, примерно 0,5 об.%, примерно 1 об.%, примерно 2 об.%, примерно 3 об.%, примерно 5 об.%, примерно 10 об.%, примерно 15 об.%, примерно 20 об.% или примерно 25 об.%.

[030] В некоторых вариантах осуществления уравнивающий буфер может быть аналогичен или идентичен по составу десорбирующему буферу. В других вариантах осуществления уравнивающий буфер может отличаться по составу от десорбирующего буфера. В некоторых вариантах осуществления уравнивающий буфер может содержать одну или более солей, таких как, например, соли натрия, калия, магния, кальция, цитрат, ацетат, фосфат, сульфат, Tris или другие соли.

[031] В одном или более вариантах осуществления способ вирусной инактивации может применяться после того, как смесь, включающая целевую молекулу, элюируется из хроматографического аппарата (например, колонки для аффинной хроматографии с насадкой, колонки для гидрофобной хроматографии, колонки для ионообменной хроматографии и/или колонки для эксклюзионной хроматографии). Загрузка целевой молекулы в хроматографический аппарат может варьироваться в зависимости от предшествующих процессов, в то время как смесь, содержащая целевую молекулу, может

элюироваться из хроматографического аппарата при постоянном объеме. В некоторых вариантах осуществления смесь, включающая целевую молекулу, загружают в хроматографическую колонку при рН больше или равном приблизительно 5 и меньше или равном приблизительно 8,5, например, больше или равном приблизительно 5,5 и меньше или равном приблизительно 8,5, больше или равно приблизительно 6,0 и меньше или равном приблизительно 8,5, или от приблизительно 5 до приблизительно 6,5. В результате вариаций загрузки концентрация белка и/или рН элюата (например, элюата, элюируемого из хроматографического аппарата), может варьироваться. Из-за этой вариации количество кислоты, которое необходимо добавить для инактивации вируса, также различается.

[032] В обычных производственных процессах инактивация вирусов при низком рН достигается методом проб и ошибок, когда к элюату добавляется заданное количество кислоты, измеряется рН смеси элюата и кислоты, а стадии добавления и измерения продолжаются итерационно, пока не будет достигнуто значение рН инактивации. Из-за потенциальных затрат и потерь, которые могут возникнуть из-за добавления слишком большого количества кислоты, такие процессы являются консервативными и включают добавление небольших количеств кислоты и длительное время процесса инактивации, часто в масштабе часов.

[033] Аспекты настоящего изобретения могут обеспечить различные преимущества для процесса получения целевого полипептида или другой целевой молекулы. Например, один или более способов и/или математических моделей, описанных в настоящем документе, могут быть реализованы для определения добавляемого количества кислоты, например, количества кислоты, необходимого для доведения смеси (содержащей целевую молекулу и, возможно, нежелательный вирус или вирусоподобные частицы) до рН инактивации. К смеси может быть добавлено количество кислоты, приблизительно эквивалентное добавляемому количеству кислоты. Как более подробно описано ниже, количество кислоты, эквивалентное добавляемому количеству кислоты, может быть добавлено в виде одного болюсного введения или в виде двух или более введений кислоты. Введение кислоты для вирусной инактивации таким образом может быть более эффективным и менее подверженным ошибкам, чем традиционные методы проб и ошибок.

[034] В некоторых аспектах настоящего изобретения, как часть процесса, может быть известно или ожидается, что содержание вируса или содержание инфекционных единиц в смеси будет минимальным или отсутствующим. В некоторых таких аспектах настоящего описания системы и способы, раскрытые в настоящем описании, могут быть успешно включены в производственный процесс как часть РАТ, например, для уменьшения потенциальных отклонений в процессе, обеспечения подтверждения соблюдения стандартов процесса в режиме реального времени, и/или повышения достоверности в целостности процесса.

[035] Дополнительная польза и преимущества аспектов настоящего описания будут очевидны для специалистов в данной области техники.

[036] Как упоминалось ранее, после получения целевой молекулы с использованием одного или более процессов хроматографии и/или разделения может быть получена смесь (например, элюат). В некоторых вариантах осуществления можно провести одно или более измерений смеси, включая, например, концентрацию белка, концентрацию целевой молекулы, рН или их комбинацию. Концентрацию белка можно измерить любым подходящим способом, включая, например, спектроскопию в ультрафиолетовом/видимом свете. В некоторых вариантах осуществления концентрацию белка измеряют с использованием длины волны, характерно поглощаемой целевой молекулой, которая может представлять собой полипептид. В таких вариантах осуществления общая концентрация белка может быть приблизительно эквивалентна концентрации целевой молекулы (например, целевого полипептида). В некоторых вариантах осуществления смесь, включающая целевую молекулу, может иметь концентрацию белка от приблизительно 7 г белка на литр элюата (г/л) до приблизительно 35 г/л, больше или равную 7 г/л, меньше или равную приблизительно 20 г/л, от приблизительно 8,5 г/л до приблизительно 18,5 г/л или от приблизительно 10 г/л до приблизительно 17 г/л.

[037] рН смеси может быть измерено любым подходящим способом. Точное и последовательное измерение рН важно для успешной инактивации вирусных белков при низком рН. На измерения рН могут влиять температура, тип используемого датчика рН, индивидуальные различия между датчиками рН одного типа и/или физические взаимодействия между измеряемой средой и датчиком рН. Даже в стандартизированных процессах измерения рН отклонение рН  $\pm 0,05$  может быть обычным. В области производства полипептидов или инактивации вирусов вариации в пределах  $\pm 0,05$  рН могут составлять примерно 20% от рабочего диапазона рН и могут неблагоприятно влиять на инактивацию вирусов и/или валидацию процесса. Такие вариации со временем могут даже усугубляться, что приводит к дрейфу нуля прибора и более экстремальным вариациям измерений рН. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления при измерении рН могут быть приняты во внимание изменения в измерении рН. В некоторых вариантах осуществления, как указано выше, рН элюата может быть измерено стандартизированным методом с целью уменьшения или устранения вариабельности измерений рН. Стандартизация метода измерения рН может включать использование зондов рН одного производителя, использование одной партии зондов рН, измерение рН при заданной температуре, стандартизацию матрицы образца для измерения и т. п. В некоторых вариантах осуществления рН элюата можно измерить с помощью рН-метра, такого как, например, потенциометрический рН-метр. В некоторых вариантах осуществления элюат, включающий целевую молекулу, может иметь рН больше или равное приблизительно 3,9 и меньше или равное приблизительно 8,5, например, от приблизительно 3,9 до приблизительно 6,5, от приблизительно 3,9 до приблизительно 5,5, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5, от приблизительно 4 до приблизительно 4,4, от приблизительно 3,9 до приблизительно 4,4 или от приблизительно 4 до

приблизительно 4,3. Используемое в настоящем описании значение рН или диапазон значений рН может иметь отклонение  $\pm 0,05$  единиц рН.

[038] Присутствие некоторых вирусов и вирусоподобных частиц (например, оболочечных вирусов, ретровирусов, ретровирусоподобных частиц, вирусов псевдобешенства, вирусов герпеса и т. д.) в смесях (например, элюатах), составах и/или лекарственных средствах может повлиять на компоненты, характеристики или пригодность таких смесей, составов и/или лекарственных средств. Например, присутствие нежелательных вирусов или вирусоподобных частиц в лекарственном средстве может повлиять на стабильность продукта, сократить срок годности продукта или привести к несоответствию продукта внутренним, фармакопейным или нормативным требованиям (например, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США). Некоторые вирусы или вирусоподобные частицы могут вызывать клинические эффекты, такие как иммуногенная реакция при введении лекарственного средства, включающего вирус. Варианты осуществления настоящего изобретения могут быть полезны для инактивации вируса или вирусоподобных частиц для уменьшения или устранения любого или всех таких нежелательных эффектов. Например, варианты осуществления настоящего изобретения могут быть применимы к смесям (например, элюатам), содержащим вирусы, после одного или более процессов очистки полипептидов (например, процесса разделения, включающего аффинную колонку с протеином А).

[039] В некоторых вариантах осуществления перед инактивацией вируса можно измерить проводимость смеси. В некоторых вариантах осуществления к смеси можно добавить одну или более солей для регуляции ее проводимости (например, повышения проводимости) до инактивации вируса. Одна или более солей могут включать соли щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов, галогениды и/или одно или более других ионоактивных соединений. Не ограничиваясь теорией, добавление одной или более солей для регуляции проводимости может уменьшить агрегацию целевых молекул, вирусов или ретровирусоподобных частиц. Агрегация целевых молекул, вирусов или ретровирусоподобных частиц может влиять на то, как поверхности этих видов взаимодействуют с кислотой. Добавление солей к смеси может увеличить ионную активность смеси, увеличить проводимость смеси и уменьшить агрегацию целевой молекулы или вируса. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления проводимость смеси может быть связана со степенью агрегации целевых молекул или вирусов.

[040] В некоторых случаях варианты осуществления настоящего изобретения могут быть применимы к смесям с чрезвычайно низким содержанием вируса (например, меньше или равным примерно 0,0001 вирусных частиц или инфекционных единиц на мл) или даже при отсутствии вирусного содержания. Хроматография и другие процессы разделения, по отдельности или в комбинации, могут надлежащим образом очистить и/или выделить целевую молекулу и удалить из смеси нежелательные вирусы или вирусоподобные частицы. В некоторых таких случаях способы в соответствии с

настоящим описанием могут быть полезными в качестве дополнительной гарантии того, что вирус или вирусоподобные частицы инактивированы, а также для обеспечения стабильности продукта, безопасности продукта, эффективности продукта и соответствия внутренним или нормативным спецификациям. Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения также могут быть применимы к смесям без какого-либо известного вирусного содержания, чтобы, например, обеспечить соблюдение нормативных требований и/или обеспечить резервный контроль качества.

[041] Протоколы и способы вирусной инаktivации, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы без неблагоприятного воздействия на определенные типы вирусов, такие как AAV (например, AAV, включающий целевую последовательность). Например, предпочтительно протоколы и способы, описанные в настоящем документе, могут выполняться без деградации AAV. Таким образом, описанные в настоящем документе способы могут быть пригодны для использования в смесях, содержащих AAV в качестве целевой молекулы.

[042] Как упоминалось ранее, вирусы в смеси можно инаktivировать, выдерживая смесь при pH инаktivации в течение периода инаktivации. pH инаktivации может представлять собой pH меньше или равное 3,8 и больше или равное 3, например, pH от 3,35 до 3,8, меньше или равное 3,75 и больше или равное 3, меньше или равное 3,7 и больше или равное 3, меньше или равное 3,65 и больше или равное 3, меньше или равное 3,6 и больше или равное 3, меньше или равное 3,55 и больше или равное 3, меньше или равное 3,5 и больше или равное 3, меньше или равное 3,45 и больше или равное 3, меньше или равное 3,4 и больше или равное 3, от 3,35 до 3,75, от 3,5 до 3,8, от 3,5 до 3,75, от 3,5 до 3,7, от 3,5 до 3,6 или от 3,5 до 3,65. Используемое в настоящем описании значение pH или диапазон значений pH может иметь отклонение  $\pm 0,05$  единиц pH. Если значение pH для инаktivации установлено слишком высоким, существует риск отклонения в процессе, что приведет к недостаточной инаktivации вируса. Если pH инаktivации установлено слишком низким, существует риск денатурации целевой молекулы или других белков или иного нежелательного изменения смеси.

[043] Интервал инаktivации описывает интервал времени, в течение которого смесь выдерживается при pH инаktivации. Интервал инаktivации может составлять от приблизительно 20 минут до приблизительно 90 минут, как например, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 60 минут, от приблизительно 30 минут до приблизительно 45 минут, от приблизительно 30 минут до приблизительно 60 минут, от приблизительно 30 минут до приблизительно 75 минут, от приблизительно 30 минут до приблизительно 90 минут, от приблизительно 45 минут до приблизительно 60 минут, от приблизительно 45 минут до приблизительно 75 минут, от приблизительно 45 минут до приблизительно 90 минут, от приблизительно 60 минут до приблизительно 75 минут или от приблизительно 60 минут до приблизительно 95 минут. Выдерживание смеси при pH инаktivации в течение периода инаktivации может уменьшить, устранить или обеспечить отсутствие вирусной активности в смеси. Среда с низким pH может денатурировать

вирусные белки, такие как, например, оболочечные вирусные белки. Денатурированные вирусные белки могут сделать ретровирусы и ретровирусоподобные частицы неактивными, снижая нежелательную вирусную активность смеси.

[044] Снижение вирусной активности в смеси можно количественно оценить с помощью фактора снижения вирусной нагрузки. Фактор снижения вирусной нагрузки можно рассчитать в соответствии с уравнением 1, показанным ниже:

$$\begin{array}{l} \text{Фактор} \\ \text{снижения} \\ \text{вирусной} \\ \text{нагрузки} \end{array} = \log \left( \frac{V_1 \times C_1}{V_2 \times C_2} \right) \quad \text{Ур. (1)}$$

где  $V_1$  представляет собой объем смеси до вирусной инактивации,  $C_1$  представляет собой концентрация вируса или инфекционных единиц на объем смеси до вирусной инактивации,  $V_2$  представляет собой объем смеси после вирусной инактивации,  $C_2$  представляет собой концентрация вируса в смеси после вирусной инактивации. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, включая способы вирусной инактивации, достигается фактор снижения вирусной нагрузки, превышающий или равный 2,5, как например, фактор снижения вирусной нагрузки, больше или равный 3, больше или равный 3,5, больше или равный 4, больше или равный 4,5 или больше или равный 5. Используемый в настоящем описании термин «эффективная вирусная инактивация» может относиться к вирусной инактивации, связанной с фактором снижения, большим или равным 2,5, большим или равным 3, большим или равным 3,5, большим или равным 4, большим или равным 4,5 или большим или равным 5.

[045] В соответствии с одним или более вариантами осуществления количество добавляемой кислоты может быть рассчитано на основе концентрации белка в смеси и рН инактивации. Например, количество добавляемой кислоты можно рассчитать в соответствии с уравнением 2, показанным ниже.  $w = Ax + By + C$  Ур. (2)

где  $x$  представляет собой концентрация белка в смеси в граммах на литр (г/л),  $y$  представляет собой рН инактивации,  $w$  представляет собой количество добавляемой кислоты в молях на килограмм смеси (моль/кг), а  $A$ ,  $B$ , и  $C$  являются константами. Константа  $A$  уравнения 2 выражена в литрах-молях кислоты на грамм-килограммы смеси (л·моль/г·кг). Константа  $A$  может быть больше или равна 0,0003 л·моль/г·кг и меньше или равна 0,0006 л·моль/г·кг, например, от приблизительно 0,0003 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0005 л·моль/г·кг, от приблизительно 0,0004 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0006 л·моль/г·кг, от приблизительно 0,00035 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0005 л·моль/г·кг, от приблизительно 0,00035 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0006 л·моль/г·кг, или от приблизительно 0,0004 л·моль/г·кг до приблизительно 0,00055 л·моль/г·кг. Константы  $B$  и  $C$  уравнения 2 выражены в молях кислоты на килограмм смеси (моль/кг). Константа  $B$  может быть больше или равна -0,1 моль/кг и меньше или равна 0 моль/кг, например, от приблизительно -0,1 моль/кг до приблизительно 0 моль/кг, от приблизительно -0,1 моль/кг до приблизительно -0,05

моль/кг, от приблизительно -0,05 моль/кг до приблизительно 0 моль/кг или от приблизительно -0,08 моль/кг до приблизительно -0,01 моль/кг. Константа С может быть больше или равна 0,02 моль/кг и меньше или равна 0,1 моль/кг, например, от приблизительно 0,02 моль/кг до приблизительно 0,1 моль/кг, от приблизительно 0,02 моль/кг до приблизительно 0,05 моль/кг, от приблизительно 0,05 моль/кг до приблизительно 0,1 моль/кг или от приблизительно 0,04 моль/кг до приблизительно 0,08 моль/кг.

[046] В некоторых вариантах осуществления количество добавляемой кислоты можно рассчитать на основе концентрации белка в смеси, рН инактивации и рН смеси. Например, количество добавляемой кислоты можно рассчитать в соответствии с уравнением 3, показанным ниже.

$$w = Ex + Fu + Gz + H \quad \text{Ур. (3)}$$

где  $x$  представляет собой концентрация белка в смеси в граммах на литр (г/л),  $y$  представляет собой рН инактивации,  $z$  представляет собой рН смеси,  $w$  представляет собой количество добавляемой кислоты в молях кислоты на килограмм смеси (моль/кг), а  $E$ ,  $F$ ,  $G$  и  $H$  представляет собой константы. Константа  $E$  уравнения 3 выражена в литрах-молях кислоты на грамм-килограмм смеси (л·моль/г·кг), а константы  $F$ ,  $G$  и  $H$  выражены в молях кислоты на килограмм смеси (моль/кг). Константа  $E$  может быть больше или равна 0,00005 л·моль/г·кг и меньше или равна 0,0005 л·моль/г·кг, например, от приблизительно 0,00005 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0005 л·моль/г·кг, от приблизительно 0,0001 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0005 л·моль/г·кг, от приблизительно 0,00005 л·моль/г·кг до приблизительно 0,00045 л·моль/г·кг, от приблизительно 0,0001 л·моль/г·кг до приблизительно 0,00035 л·моль/г·кг, или от приблизительно 0,00035 л·моль/г·кг до приблизительно 0,0005 л·моль/г·кг. Константа  $F$  может быть больше или равна -0,2 моль/кг и меньше или равна 0 моль/кг, например, от приблизительно -0,1 моль/кг до приблизительно 0 моль/кг, от приблизительно -0,1 моль/кг до приблизительно -0,05 моль/кг, от приблизительно -0,05 моль/кг до приблизительно 0 моль/кг или от приблизительно -0,08 моль/кг до приблизительно -0,01 моль/кг. Константа  $G$  может быть больше или равна 0 моль/кг и меньше или равна 0,03 моль/кг, например, от приблизительно 0 моль/кг до приблизительно 0,03 моль/кг, от приблизительно 0,001 моль/кг до приблизительно 0,03 моль/кг, от приблизительно 0,005 моль/кг до приблизительно 0,3 моль/кг или от приблизительно 0,005 моль/кг до приблизительно 0,025 моль/кг. Константа  $H$  может быть числом, большим или равным -0,1 моль/кг и меньшим или равным 0,1 моль/кг, как например, от приблизительно -0,1 моль/кг до приблизительно 0,1 моль/кг, от приблизительно -0,08 моль /кг до приблизительно 0,08 моль/кг, от приблизительно -0,05 моль/кг до приблизительно 0,1 моль/кг или от приблизительно -0,1 моль/кг до приблизительно 0,05 моль/кг.

[047] Конкретное уравнение, связывающее концентрацию белка в смеси с количеством добавляемой кислоты и рН инактивации (которое может, необязательно, зависеть от рН смеси), может варьироваться в зависимости от целевой молекулы и/или

используемой кислотной системы. Значения констант, определенных выше, применительно к данной целевой молекуле и кислотной системе могут быть определены регрессией в соответствии с общими уравнениями, определенными выше. Как описано в разделе примеров ниже, неожиданно было обнаружено, что количество добавляемой кислоты имеет сильную корреляцию с концентрацией белка в смеси в соответствии с определенными выше уравнениями. Эта неожиданно сильная корреляция может позволить включить описанные в настоящем документе общие уравнения и их производные в PAT.

[048] В одном или более вариантах осуществления количество добавляемой кислоты составляет от приблизительно 0,002 моль кислоты на килограмм смеси (моль/кг) до приблизительно 0,025 моль/кг, например, от приблизительно 0,002 моль/кг до приблизительно 0,025 моль/кг, от приблизительно 0,01 моль/кг до приблизительно 0,025 моль/кг, от приблизительно 0,002 моль/кг до приблизительно 0,020 моль/кг или от приблизительно 0,005 моль/кг до приблизительно 0,020 моль/кг.

[049] В некоторых вариантах осуществления после расчета добавляемого количества кислоты к смеси может быть добавлена кислота, чтобы довести смесь до pH инактивации. Например, по меньшей мере в одном варианте осуществления болюс кислоты, эквивалентный добавляемому количеству кислоты, может быть добавлен к смеси, чтобы довести pH смеси до уровня, меньше или равного pH инактивации. В других вариантах осуществления к смеси добавляют первую порцию кислоты, затем к смеси могут быть добавлены одна или более дополнительных порций кислоты так, чтобы pH смеси было равно или ниже pH инактивации. В таких вариантах осуществления первая порция кислоты составляет от 68% до 99% добавляемого количества кислоты, например, от приблизительно 75% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 85% до приблизительно 99%, от приблизительно 90% до приблизительно 99%, от приблизительно 85% до приблизительно 95% или от приблизительно 90% до приблизительно 99%.

[050] Первая порция кислоты может быть подобрана таким образом, чтобы целевая молекула в смеси с самым низким значением pH не денатурировала при добавлении первой порции. Дополнительные порции кислоты могут включать одно или более добавлений кислоты, которые происходят после добавления первой порции кислоты, например, 3 добавления кислоты, 4 добавления кислоты или 5 добавлений кислоты, которые происходят после добавления первой порции кислоты. Каждое введение одного или более добавлений кислоты может быть в количестве, которое составляет от 0,1% до 32% от добавляемого количества кислоты, например, от приблизительно 0,1% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 25%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 20%, от приблизительно 1% до приблизительно 25%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 1% до приблизительно 10% или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5%. Каждое

введение одного или более добавлений кислоты может соответствовать тому же количеству, что и одно или более других добавлений кислоты. В других вариантах осуществления каждое добавление кислоты представляет собой то же количество, что и каждое другое добавление кислоты.

[051] В некоторых вариантах осуществления pH может быть измерено после добавления к смеси первой порции кислоты, но до добавления дополнительных порций кислоты. В некоторых таких вариантах осуществления pH смеси, измеренное после добавления первой порции кислоты, больше или равно 3,5 и меньше или равно 3,75, например, от приблизительно 3,5 до приблизительно 3,75, от приблизительно 3,6 до приблизительно 3,7, от приблизительно 3,5 до приблизительно 3,65, от приблизительно 3,6 до приблизительно 3,75 или от приблизительно 3,5 до приблизительно 3,65. Используемое в настоящем описании значение pH или диапазон значений pH может иметь отклонение  $\pm 0,02$  единицы pH.

[052] Кислота может быть добавлена в виде одного или более кислых растворов. Кислые растворы могут включать любую подходящую кислоту, такую как, например, HCl, HBr,  $H_3PO_4$ ,  $HO_2C_2O_2H$ ,  $C_6H_8O_7$ ,  $H_2SO_3$ ,  $H_3PO_4$ ,  $HNO_2$ ,  $C_6H_5CO_2H$ ,  $CH_3CO_2H$ , HClO, HCN,  $H_3BO_3$  или их комбинацию. В дополнение или альтернативно кислые растворы могут включать одну или более солей, таких как, например, глицин, аргинин, ацетат натрия и/или хлорид натрия.

[053] После добавления количества кислоты к смеси, включающей целевую молекулу, полученная смесь имеет pH, равное или ниже pH инактивации. В некоторых вариантах осуществления может быть измерено pH образованной смеси, например, для подтверждения того, что оно находится в пределах желаемого диапазона. Как описано ранее, смесь можно выдерживать при pH инактивации в течение периода инактивации. После выдерживания смеси при pH инактивации в течение периода инактивации может произойти снижение вирусной активности, эквивалентное фактору снижения, например, больше или равному 2,5, больше или равному 3, больше или равному 3,5 или больше или равному 4. После выдерживания смеси при pH инактивации в течение периода инактивации смесь можно титровать добавлением щелочного раствора так, чтобы pH смеси стало больше или равно 4,5 и меньше или равно 8,5, например, больше или равно 4,5 и меньше или равно 8,5, больше или равно 5 и меньше или равно 8,5, больше или равно 5,8 и меньше или равно 8,5, больше или равно 5,9 и меньше или равно 8,5, больше или равно 6 и меньше или равно 8,5, больше или равно 6,1 и меньше или равно 8,5, больше или равно 6,2 и меньше или равно 8,5, больше или равно 6,3 и меньше или равно 8,5, или больше или равно 6,4 и меньше или равно 8,5. Используемое в настоящем описании значение pH или диапазон значений pH может иметь отклонение  $\pm 0,02$  единицы pH. Щелочной раствор может включать одно или несколько оснований, таких как, например, NaOH, KOH, LiOH,  $Ca(OH)_2$ ,  $NH_4OH$ ,  $NaCH_3CO_2$  и/или  $(HOCH_2)_3CNH_2$ .

[054] В некоторых вариантах осуществления смесь титруют менее чем через час после добавления первой порции кислоты, например, через менее чем приблизительно 50

минут, менее чем приблизительно 45 минут, менее чем приблизительно 40 минут, менее чем приблизительно 35 минут или через менее чем приблизительно 30 минут после добавления первой порции кислоты.

[055] Аспекты настоящего изобретения могут также включать способы определения функции, предсказывающей рН комбинации (т. е. объединенной смеси и кислоты). Например, может быть определена функция, которая предсказывает рН комбинации (например, рН инактивации) на основе измеренной концентрации белка и/или рН смеси и количества кислоты, добавленной к смеси. Такую функцию можно использовать для детектирования ошибки обработки (например, недостаточного смешивания, плохого отбора проб и т. п.) или неисправности оборудования (ошибка прибора, дрейф нуля прибора, неисправность зонда рН и т. п.).

[056] В некоторых вариантах осуществления ожидаемое рН подкисленной смеси может быть заранее определено в соответствии с моделью подтверждения. Модель подтверждения может быть представлена в виде уравнения 4, показанного ниже.

$$y = Kx + Lw + Mz + N \text{ Ур. (4)}$$

где  $y$  представляет собой рН инактивации,  $x$  представляет собой концентрацию белка в смеси в граммах на литр (г/л),  $z$  представляет собой рН смеси,  $w$  представляет собой количество добавляемой кислоты в молях на килограмм смеси (моль/кг), а  $K$ ,  $L$ ,  $M$  и  $N$  представляют собой константы. Константа  $K$  уравнения 4 выражается в литрах на грамм, константа  $L$  выражается в килограммах смеси на моль кислоты, а константы  $M$  и  $N$  не имеют единиц измерения. Константа  $K$  может быть больше или равна 0 л/г и меньше или равна 0,03 л/г, например, от приблизительно 0 л/г до приблизительно 0,03 л/г, от приблизительно 0,001 л/г до приблизительно 0,03 л/г, от приблизительно 0 л/г до приблизительно 0,025 л/г или от приблизительно 0,001 л/г до приблизительно 0,025 л/г. Константа  $L$  может быть больше или равна -80 кг/моль и меньше или равна -60 кг/моль, например, от приблизительно -75 кг/моль до приблизительно -60 кг/моль, от приблизительно -80 кг/моль до приблизительно -65 кг/моль или от приблизительно -75 кг/моль до приблизительно -65 кг/моль. Константа  $M$  может быть больше или равна 0 и меньше или равна 2, например, от приблизительно 0 до приблизительно 2, от приблизительно 0,3 до приблизительно 2, от приблизительно 0 до приблизительно 1,7 или от приблизительно 0,3 до приблизительно 1,7. Константа  $N$  может быть числом, большим или равным -1 и меньше или равным 0, таким как, например, от приблизительно -1 до приблизительно 0, от приблизительно -1 до приблизительно -0,1 или от приблизительно -0,9 до приблизительно -0,1.

[057] В некоторых вариантах осуществления рН и концентрация белка в смеси перед добавлением кислоты могут быть измерены и/или зарегистрированы. На основе рН смеси, концентрации белка в смеси и добавляемого количества кислоты ожидаемое рН подкисленной смеси может быть предварительно определено с использованием модели подтверждения. Фактическое рН подкисленной смеси можно измерить, зарегистрировать и/или сравнить с ожидаемым рН. Сравнение зарегистрированного рН с ожидаемым рН

может включать в себя вычисление разницы (например, разницы в процентах) между зарегистрированным рН и ожидаемым рН.

[058] В некоторых вариантах осуществления, если разница между зарегистрированным значением рН и ожидаемым значением рН превышает пороговое значение, могут быть предприняты корректирующие действия. Пороговое значение может составлять, например,  $\pm 0,03$  рН от ожидаемого рН,  $\pm 0,05$  рН от ожидаемого рН,  $\pm 0,07$  рН от ожидаемого рН,  $\pm 0,09$  рН от ожидаемого рН,  $\pm 0,1$  рН от ожидаемого рН,  $\pm 0,15$  рН от ожидаемого рН или  $\pm 0,2$  рН от ожидаемого рН. Корректирующее действие может включать, но не ограничивается этим, регулицию рН-метра, регулицию состава смеси, регулицию одного или более условий окружающей среды процесса или их комбинацию. Регуляция рН-метра может включать стандартизацию рН-метра, повторную калибровку рН-метра, очистку, сброс и/или замену рН-зонда, регулицию раствора эталонного электрода, замену части рН-метра, регулицию положения рН-зонда и/или другое действие, которое изменяет отношение сигнал/шум рН-метра. Корректировка состава смеси может включать изменение рецептуры любого компонента раствора смеси или предшествующей композиции, изменение условий процесса или компонентов аппаратуры одного или более процессов хроматографии или разделения и/или другие действия, которые изменяют материальный состав смеси. Регуляция одного или более условий окружающей среды процесса может включать регулицию процессов и систем смешивания и/или гомогенизации, регулицию температуры процесса, регулицию влажности процесса, регулицию давления процесса или их комбинацию. Такие корректировки, основанные на отклонении от ожидаемых параметров, могут быть включены в виде части РАТ.

[059] Уравнения и математические модели, описанные выше, могут быть созданы как часть метода разработки протокола кислотной инактивации. Способ разработки протокола кислотной инактивации может включать получение пула смесей (например, элюатов), где каждая смесь пула содержит целевую молекулу, очищенную в процессе аффинного захвата белка. Например, пул образцов может быть собран из элюата колонки для белковой аффинной хроматографии. Способ может дополнительно включать измерение рН и концентрации белка (например, концентрации целевой молекулы) в каждом образце. После определения рН и концентрации белка в каждом образце каждый образец можно титровать для определения количества кислоты, необходимого для доведения образца до рН инактивации. В некоторых вариантах осуществления рН инактивации может быть определено как достаточно широкий диапазон, позволяющий проводить две или более итераций титрования, что позволяет собирать множество экспериментальных точек из каждого образца пула. В других вариантах осуществления из каждого образца может быть собрана только одна экспериментальная точка.

[060] В некоторых вариантах осуществления зависимость (например, математическая модель) может быть регрессирована между количеством добавленной кислоты, концентрацией белка в элюате, рН смеси и/или рН инактивации. Связь может быть регрессирована в соответствии с уравнением 2 или уравнением 3, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления способ разработки протокола кислотной инактивации дополнительно включает регрессию модели подтверждения. Модель подтверждения может быть регрессирована в соответствии с уравнением 4, описанным выше.

[061] На ФИГ. 1 изображен в виде блок-схемы типичный процесс 100 вирусной инактивации в смеси в соответствии с настоящим описанием; В соответствии со стадией 101 смесь при первом рН (например, выше 3,9) может быть элюирована из хроматографической колонки. В соответствии со стадией 102 концентрация белка (например, концентрация целевых молекул) в смеси может быть измерена, например, с помощью спектроскопии ультрафиолетового/видимого света или другого метода. Необязательно проводимость и/или рН смеси можно измерить, например, с помощью потенциометрического рН-метра или другим способом. В соответствии со стадией 103 к смеси можно добавить одну или более солей в количестве, достаточном для регуляции проводимости смеси. В соответствии со стадией 104 можно рассчитать количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси до второго рН (например, рН инактивации). Этот расчет может быть выполнен на основе концентрации белка в смеси, рН смеси или их комбинации. В соответствии со стадией 105 к смеси может быть добавлена первая порция кислоты. В некоторых вариантах осуществления первая порция кислоты представляет собой болюс кислоты, эквивалентный рассчитанному добавляемому количеству кислоты. В других вариантах осуществления первая порция кислоты может составлять от 68% до 99% объема или количества кислоты в расчете на добавленное количество кислоты. В соответствии со стадией 105 к смеси необязательно может быть добавлена вторичная кислота, так что рН комбинации смеси и кислоты равно или ниже второго значения рН (например, рН инактивации). В соответствии со стадией 106 комбинацию смеси и кислоты можно поддерживать при втором рН (например, рН инактивации) в течение периода инактивации, инактивируя вирус в элюате. В некоторых вариантах осуществления

[062] На ФИГ. 2 изображен в виде блок-схемы типичный процесс 200 вирусной инактивации в смеси в соответствии с настоящим описанием. В соответствии со стадией 201 смесь, включающая целевую молекулу, может быть загружена в хроматографическую колонку при первом значении рН (например, больше или равном приблизительно 5 и меньше или равном приблизительно 8,5). В соответствии со стадией 202 элюированную смесь при втором значении рН (например, больше приблизительно 3,9 и меньше или равном приблизительно 5) можно элюировать из хроматографической колонки. В соответствии со стадией 203 концентрация белка (например, концентрация целевой молекулы) в элюированной смеси может быть измерена, например, с помощью спектроскопии в ультрафиолетовом/видимом свете и/или зарегистрирована. В соответствии со стадией 204, необязательно, могут быть измерены рН и/или проводимость элюированной смеси. рН может быть измерено, например, с помощью потенциометрического рН-метра и/или зарегистрировано. В соответствии со стадией 205 к

смеси можно добавить одну или более солей в количестве, достаточном для регуляции проводимости смеси. В соответствии со стадией 206 к элюированной смеси может быть добавлена кислота, образуя комбинацию элюированной смеси и кислоты, так что комбинация сконфигурирована для демонстрации эффективной вирусной инактивации. Кроме того, комбинация может иметь рН меньше или равное второму рН (например, меньше или равное приблизительно 3,8 и больше или равное приблизительно 3). В соответствии со стадией 207 ожидаемое рН комбинации может быть предварительно определено с использованием модели подтверждения рН. В соответствии со стадией 208 может быть измерено и/или зарегистрировано рН комбинации. В соответствии со стадией 209 может быть рассчитана разница между ожидаемым рН и измеренным/зарегистрированным рН комбинации. В соответствии со стадией 210 корректирующее действие может быть предпринято на основе вычисленной разницы между ожидаемым рН и измеренным и/или зарегистрированным рН комбинации.

[063] На ФИГ. 3 изображен в виде блок-схемы типичный процесс 300 разработки протокола кислотной инактивации в соответствии с настоящим описанием. В соответствии со стадией 301 может быть получен пул образцов элюата, где каждый образец элюата из пула образцов элюата содержит целевую молекулу, очищенную в процессе аффинного захвата. В соответствии со стадией 302 концентрация белка (например, концентрация целевой молекулы) в каждом образце элюата из пула образцов элюата может быть измерена, например, с помощью спектроскопии в ультрафиолетовом/видимом свете. Необязательно рН каждого образца элюата из пула образцов элюата можно измерить, например, с помощью потенциометрического рН-метра. В соответствии со стадией 303 количество кислоты, необходимое для снижения рН каждого образца элюата до рН инактивации, может быть определено путем титрования каждого образца элюата из пула образцов элюата. В соответствии со стадией 304 можно регрессировать взаимосвязь между количеством добавленной кислоты, концентрацией белка в элюате, рН элюата и/или рН инактивации. В соответствии со стадией 305, необязательно, модель подтверждения также может быть регрессирована.

[064] Хотя на каждой из ФИГ. 1-3 показан конкретный порядок стадий, следует понимать, что выполняемые стадии и порядок их выполнения могут быть изменены. Кроме того, стадии (например, одна или более стадий измерения и/или регистрации) могут быть добавлены или удалены из любого из способов, раскрытых в настоящем документе. Кроме того, хотя на каждой из ФИГ. 1-3 показаны стадии в отношении элюата, следует понимать, что стадии могут быть применимы к любой смеси, содержащей целевую молекулу.

#### ПРИМЕРЫ

[065] Следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации настоящего описания без ограничения по сути. Понятно, что настоящее описание охватывает дополнительные аспекты и варианты осуществления, согласующиеся с предшествующим описанием и следующими примерами.

[066] В следующих примерах целевой полипептид получали из смеси, включающей целевой полипептид, белок клетки-хозяина, вирусы и другие загрязнители, примеси и компоненты. Целевой полипептид получали из клеток яичника китайского хомячка, выращенных в суспензионной культуре.

#### ПРИМЕР 1

[067] Целевой полипептид элюировали из аффинной колонки с протеином А и получали несколько образцов смеси. Концентрацию белка в каждом образце смеси получали с помощью спектроскопии в ультрафиолетовой/видимой областях, как показано в Таблице 1 ниже в единицах граммов белка на литр смеси. Кроме того, измеряли рН каждого образца смеси, как показано в Таблице 1.

[068] Пул элюатов включал сорок образцов элюата (т. е. сорок образцов смеси), и каждый образец титровали до рН инактивации от 3,35 до 3,86 0,25М раствором фосфорной кислоты ( $H_3PO_4$ ) для определения добавляемого количества кислоты (например, количество кислоты, которое необходимо добавить, чтобы довести смесь до рН инактивации). Для шести из сорока образцов (образцы 1-6, показанные в Таблице 1) титрование проводили в несколько итераций для получения нескольких экспериментальных точек. Например, 30,89 грамма кислоты на килограмм смеси, доводящие образец № 1 до рН инактивации 3,7, являются одной экспериментальной точкой, а при добавлении 5,35 дополнительных граммов кислоты на килограмм смеси 36,24 грамма кислоты на килограмм смеси, доводящие Образец № 1 до рН инактивации 3,59, является еще одной экспериментальной точкой. Данные для этих титрований представлены в Таблице 1 ниже, при этом количество добавляемой кислоты указано в граммах кислоты на килограмм смеси и в молях кислоты на килограмм смеси.

Образец №,	Концентрация белка в смеси (г/л)	рН смеси	рН инактивации	Добавляемое количество кислоты (г/кг)	Добавляемое количество кислоты (моль/кг)
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

Таблица 1 представляет собой Данные титрования смеси

#### ПРИМЕР 2

[069] Данные титрования, представленные в Таблице 1, использовали для регрессии зависимости между концентрацией белка в смеси, рН инактивации и количеством добавляемой кислоты в соответствии с уравнением 2. Было определено, что регрессионное уравнение (уравнение 5), показанное ниже, имеет коэффициент детерминации ( $R^2$ ), равный 0,84.

$$w = 0.0004532x - 0.01135y + 0.04213z \quad \text{Ур. (5)}$$

#### ПРИМЕР 3

[070] По-прежнему ссылаясь на данные титрования, представленные в Таблице 1, соотношение между концентрацией белка в смеси, рН смеси, рН инактивации и количеством добавляемой кислоты было регрессировано в соответствии с уравнением 3. Было определено, что регрессионное уравнение (уравнение 6), показанное ниже, имеет коэффициент детерминации ( $R^2$ ), равный 0,97. Неожиданно было обнаружено, что количество добавленной кислоты сильно коррелировало с соотношением между концентрацией белка, рН смеси и рН инактивации, показанным в общих Уравнениях 2 и 3.

$$w = 0.0001986x - 0.01162y + 0.01510z - 0.01692 \quad \text{Ур. (6)}$$

#### ПРИМЕР 4

[071] Данные титрования, представленные в Таблице 1, также использовали для регрессии модели подтверждения в соответствии с общим Уравнением 4. Было определено, что регрессионное уравнение (уравнение 6), представленное ниже, имеет коэффициент детерминации ( $R^2$ ), равный 0,97. Также неожиданно было обнаружено, что рН инактивации сильно коррелировало с соотношением между концентрацией белка, рН смеси и рН инактивации.

$$y = 0.01488x - 71.65w + 1.094z - 0.6727 \quad \text{Ур. (7)}$$

[072] Специалисты в данной области поймут, что концепция, на которой основано настоящее описание, может быть легко использована в качестве основы для разработки других способов и систем для выполнения нескольких целей настоящего описания. Кроме того, хотя аспекты настоящего описания представлены в отношении конкретных стадий конкретных процессов (например, вирусной инактивации в смеси), специалисту в данной области техники будет понятно, что системы и способы, раскрытые в настоящем документе, могут быть применимы в других контекстах (например, вирусная инактивация

в других смесях, включающих полипептид, например, перед процессом хроматографии или после объединения элюата с дополнительными ингредиентами в процессе приготовления лекарственного вещества). Соответственно, формула изобретения не должна рассматриваться как ограниченная приведенным выше описанием.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ инаktivации вируса в смеси, включающий:
  - элюирование смеси из хроматографической колонки при рН больше 3,9 и меньше 8,5;
  - измерение концентрации белка в смеси;
  - расчет количества кислоты, необходимого для снижения рН смеси до рН инаktivации, на основе концентрации белка в смеси;
  - добавление первой порции кислоты к смеси, где первая порция кислоты составляет от 68% до 99% от количества кислоты, необходимого для снижения рН смеси до рН инаktivации; и
  - добавление дополнительной порции кислоты к смеси таким образом, чтобы рН комбинации смеси и кислоты было равно или ниже рН инаktivации.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий:
  - поддержание комбинации при рН инаktivации в течение периода инаktivации; и
  - после периода инаktivации титрование комбинации до рН больше или равного 4,5 и меньше или равного 8,5, где комбинацию титруют меньше чем через час после добавления к смеси первой порции кислоты.
3. Способ по п. 1, дополнительно включающий измерение рН смеси перед добавлением к смеси первой порции кислоты.
4. Способ по п. 3, где количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси до рН инаktivации, рассчитывают по следующему уравнению:
 
$$w = Ax + By + C$$
 где  $w$  представляет собой количество кислоты в молях кислоты на килограмм смеси,  $x$  представляет собой концентрацию белка в смеси в граммах на литр,  $y$  представляет собой рН инаktivации, и  $A$ ,  $B$  и  $C$  представляют собой константы.
5. Способ по п. 4, где:
  - $A$  больше или равно приблизительно 0,0003 л·моль/г·кг и меньше или равно приблизительно 0,0006 л·моль/г·кг;
  - $B$  больше или равно приблизительно -0,1 моль/кг и меньше или равно приблизительно 0 моль/кг; и
  - $C$  больше или равно приблизительно 0,02 и меньше или равно приблизительно 0,1.
6. Способ по п. 3, где количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси до рН инаktivации, рассчитывают на основе концентрации белка в смеси и рН смеси.
7. Способ по п. 1, где количество кислоты, необходимое для снижения рН смеси до рН инаktivации, составляет от примерно 0,002 моль до примерно 0,025 моль кислоты на килограмм смеси.
8. Способ по п. 1, где рН инаktivации меньше или равно приблизительно 3,8 и больше или равно приблизительно 3.
9. Способ по п. 1, дополнительно включающий:
  - измерение проводимости смеси; и

добавление к смеси одной или более солей в количестве, достаточном для регуляции проводимости смеси.

10. Способ по п. 1, где хроматографическая колонка сконфигурирована для выполнения процесса аффинного захвата белка.

11. Способ по п. 1, где после добавления первой порции кислоты и перед добавлением дополнительной порции кислоты рН смеси находится в диапазоне от приблизительно 3,5 до приблизительно 3,75.

12. Способ инактивации вируса в смеси, включающий:

загрузку смеси, включающей целевую молекулу, в хроматографическую колонку, причем смесь имеет рН больше или равное приблизительно 5 и меньше или равное приблизительно 8,5;

элюирование из хроматографической колонки элюированной смеси, включающей целевую молекулу, причем элюированная смесь имеет рН больше приблизительно 3,9 и меньше или равное приблизительно 5;

добавление количества кислоты к элюированной смеси с образованием комбинации элюированной смеси и кислоты, где комбинация сконфигурирована так, чтобы демонстрировать эффективную вирусную инактивацию, и комбинация имеет рН меньше или равное приблизительно 3,8 и больше или равное приблизительно 3;

предварительное определение ожидаемого рН комбинации с использованием модели подтверждения рН;

регистрацию рН комбинации;

расчет разницы между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН; и

осуществление корректирующего действия на основе рассчитанной разницы между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН.

13. Способ по п. 12, где корректирующее действие осуществляют, если разница между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН больше или равна приблизительно 0,15.

14. Способ по п. 12, где корректирующее действие включает регуляцию рН-метра, регуляцию композиции смеси, регуляцию одного или более условий окружающей среды или их комбинацию.

15. Способ по п. 12, где комбинацию выдерживают при рН меньше или равном приблизительно 3,8 и больше или равном примерно 3 в течение приблизительно 30 минут.

16. Способ по п. 12, дополнительно включающий:

титрование комбинации до рН, больше или равного приблизительно 4,5 и меньше или равного приблизительно 8,5, меньше чем через час после добавления количества кислоты к смеси.

17. Способ по п. 12, дополнительно включающий:

измерение проводимости смеси; и

добавление к смеси одной или более солей в количестве, достаточном для

регуляции проводимости смеси.

18. Способ по п. 12, дополнительно включающий:

измерение рН смеси перед добавлением количества кислоты к смеси; и

измерение концентрации белка в смеси.

19. Способ по п. 18, где модель подтверждения рН включает следующее уравнение:

$$y = Kx + Lw + Mz + N$$

где  $y$  представляет собой рН комбинации,  $x$  представляет собой концентрацию белка в смеси в граммах на литр,  $z$  представляет собой рН смеси перед добавлением количества кислоты к смеси,  $w$  представляет собой количество кислоты, добавляемое в смесь, в молях кислоты на килограмм элюата, и  $K$ ,  $L$ ,  $M$  и  $N$  представляют собой константы.

20. Способ разработки протокола кислотной инактивации смеси, включающий:

получение пула образцов элюата смеси, где каждый образец элюата из пула образцов элюата содержит целевую молекулу, очищенную в процессе аффинного захвата белка;

измерение рН и концентрации белка в каждом образце элюата;

титрование каждого образца элюата из пула образцов элюата для определения количества кислоты, необходимого для доведения каждого образца элюата до рН инактивации;

использование каждого образца элюата из пула элюатов для определения экспериментальной точки; и

использование экспериментальных точек с регрессией зависимости между количеством кислоты, необходимым для доведения смеси до рН инактивации, концентрацией белка в смеси, рН смеси и рН инактивации.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий регрессию модели подтверждения.

22. Способ по п. 20, дополнительно включающий использование по меньшей мере одного элюата из пула элюатов для определения более чем одной экспериментальной точки.

23. Способ инактивации вируса в смеси, включающий:

измерение концентрации белка в смеси;

расчет количества кислоты, необходимого для снижения рН смеси до рН инактивации, на основе концентрации белка в смеси; и

добавление к смеси количества кислоты, необходимого для доведения рН смеси до рН инактивации.

24. Способ по п. 23, дополнительно включающий предварительное определение ожидаемого рН смеси после добавления к смеси кислоты с использованием модели подтверждения рН.

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий:

регистрацию рН комбинации кислоты и смеси;

расчет разницы между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН; и

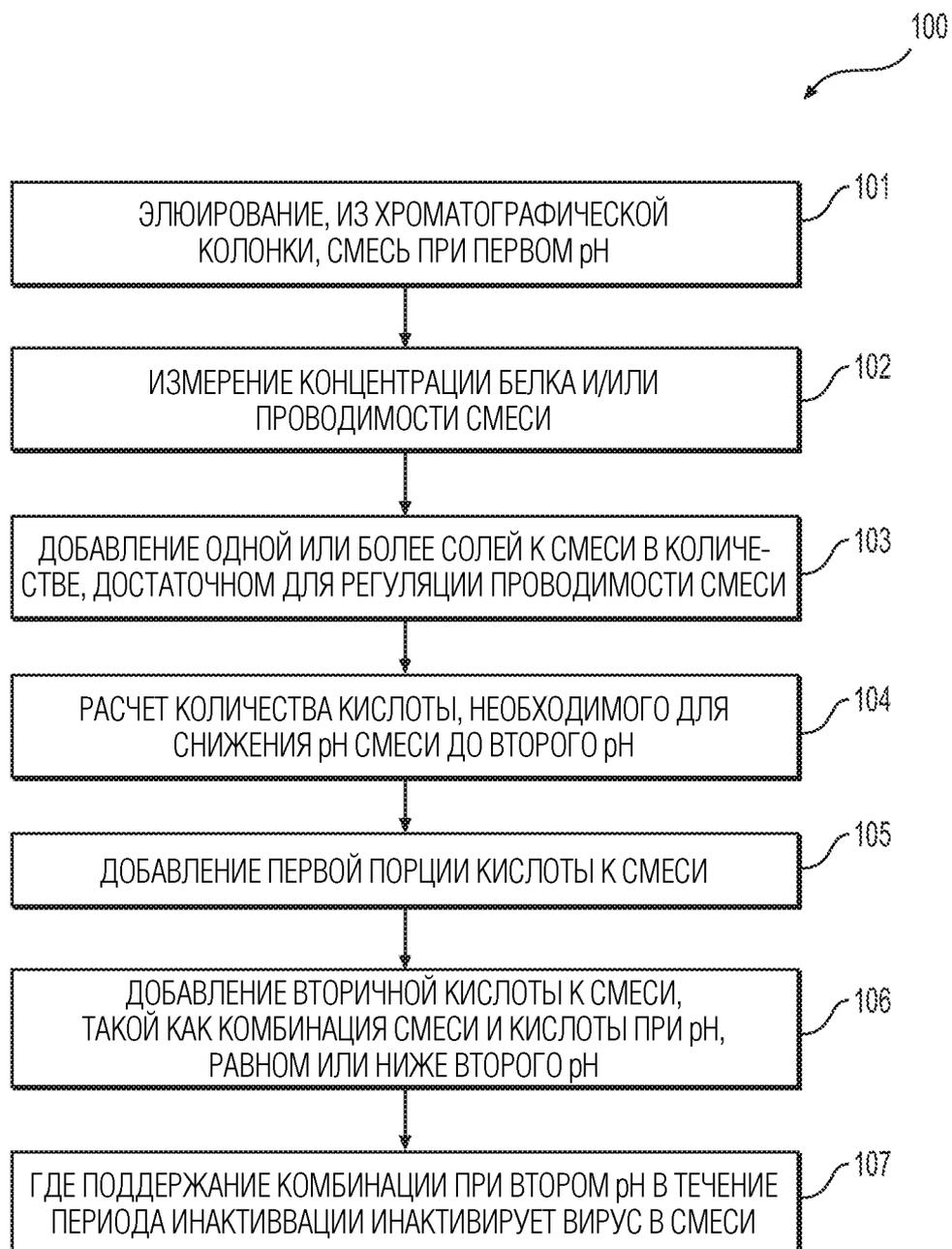
осуществление корректирующего действия на основе рассчитанной разницы между ожидаемым значением рН и зарегистрированным значением рН.

26. Способ по п. 23, дополнительно включающий перед добавлением количества кислоты:

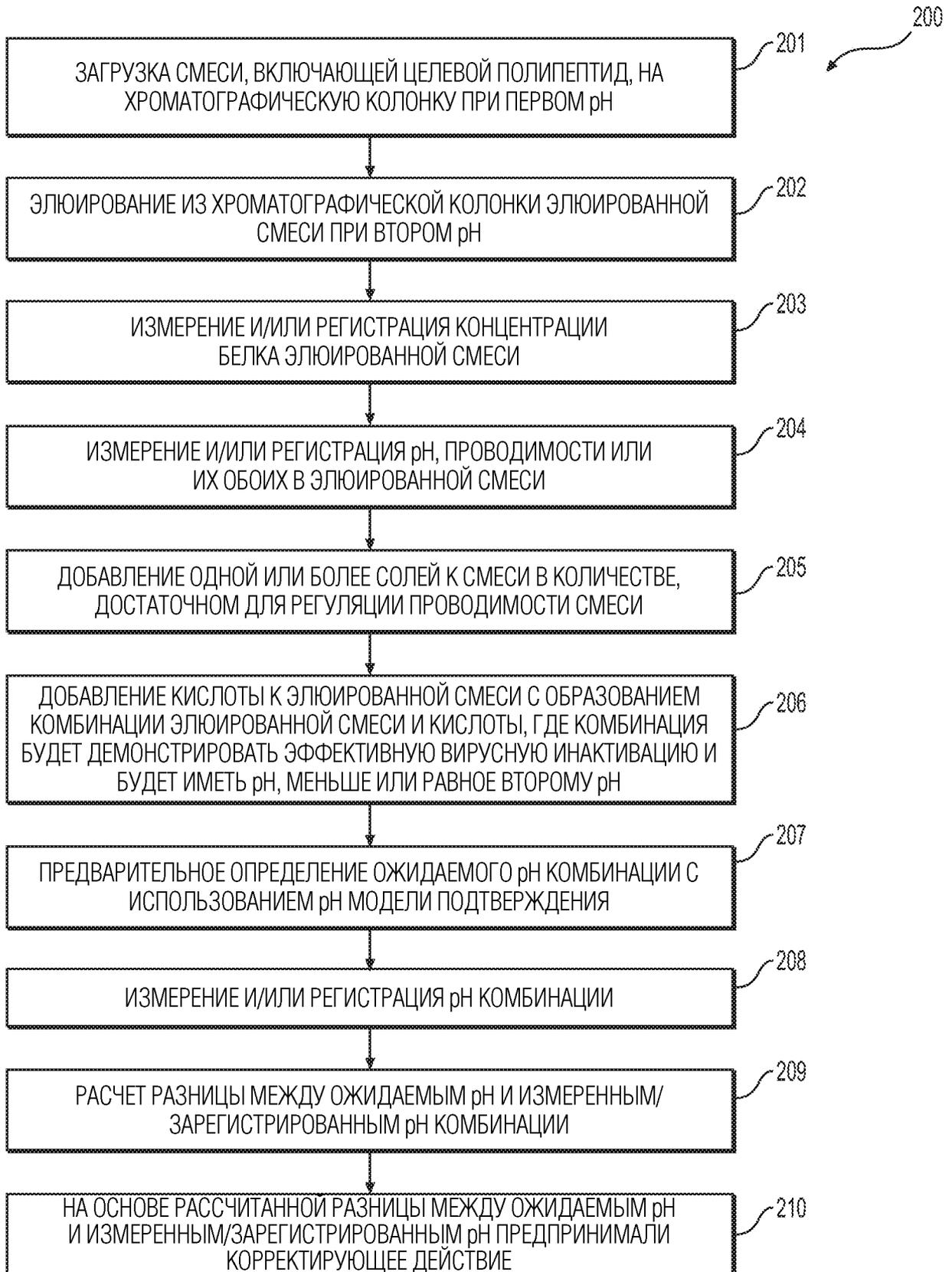
измерение проводимости смеси; и

добавление к смеси одной или более солей в количестве, достаточном для регуляции проводимости смеси.

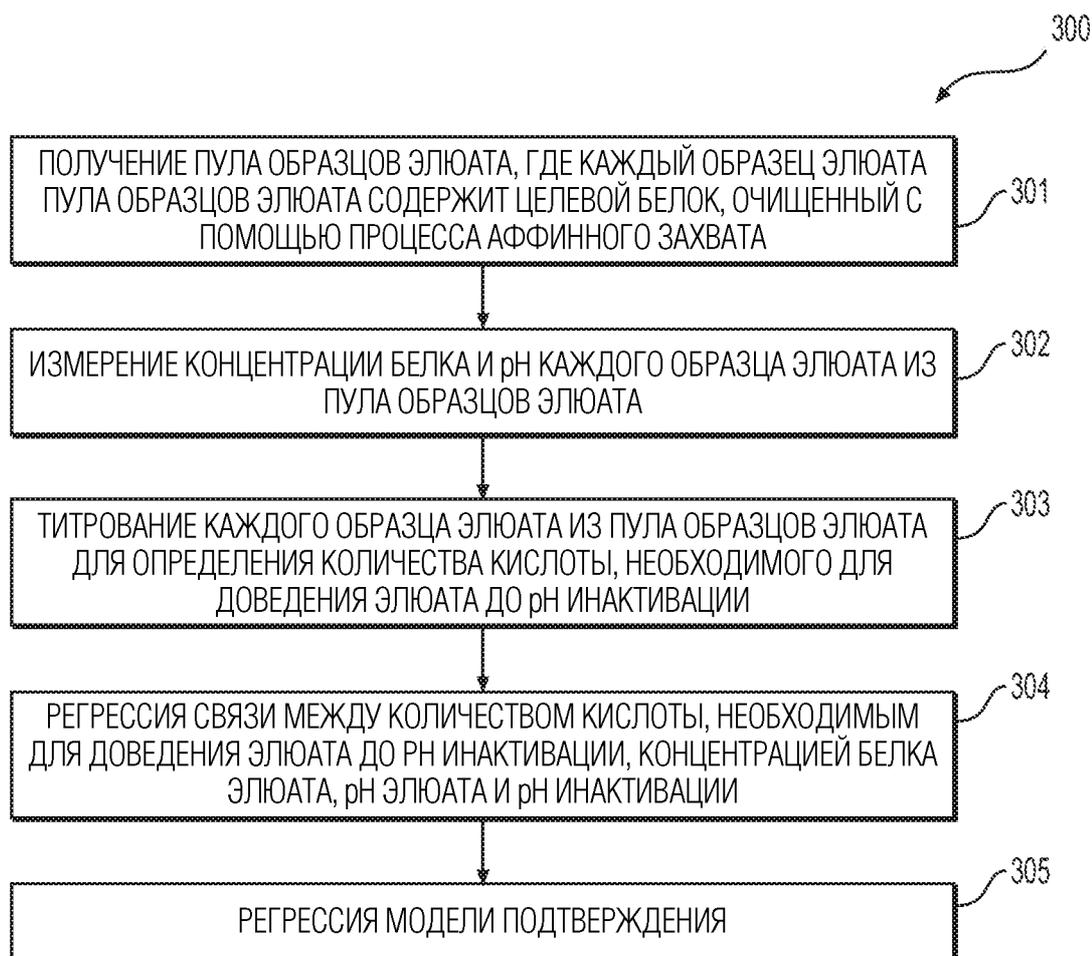
По доверенности



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3