



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 990**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08770870 .7**

96 Fecha de presentación : **12.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2173861**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Métodos de tratamiento de medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor.**

30 Prioridad: **15.06.2007 US 944468 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.07.2011**

73 Titular/es: **AMGEN Inc.**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es: **Zhou, Joe y**  
**Solamo, Felix, M.**

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 362 990 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos de tratamiento de medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****1. Campo de la invención**

5 La invención se refiere a métodos para tratar medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor usando luz ultravioleta C (UVC) y filtración.

**2. Antecedentes de la invención**

10 La contaminación viral de sobrenadantes y medios celulares plantea un gran desafío para los fabricantes biofarmacéuticos en todo el mundo. Se han empleado varios métodos para inactivar y/o eliminar partículas virales de ADN o ARN, con envuelta o sin envuelta (o "desnudas") grandes o pequeñas, de sobrenadantes celulares. Los ejemplos de estos enfoques incluyen la tecnología de filtración de 20 nm, cromatografía sobre membrana Q y tecnología del filtro de profundidad. Sin embargo, estos métodos se han usado principalmente como medios para la inactivación viral (es decir, aclaramiento viral) de medios y sobrenadantes recogidos de líneas celulares o tejidos (es decir, aguas abajo de la producción de proteínas).

15 No se han usado tales métodos de aclaramiento viral para tratar medios de cultivo celular antes de su exposición a líneas celulares o tejidos (es decir, aguas arriba de la producción de proteínas) por varias razones. En primer lugar, el empleo de tales técnicas para el tratamiento de medios celulares a gran escala, en los que se procesan hasta 20.000 l de medios celulares al día, puede ser prohibitivo en cuanto a tiempo y costes. En segundo lugar, tales métodos se han empleado históricamente para eliminar contaminantes de sobrenadantes celulares a gran escala como etapa preliminar en la purificación de productos proteicos terapéuticos de sobrenadantes celulares a gran escala antes de la administración de los productos proteicos terapéuticos a los pacientes. En tercer lugar, no se ha requerido ni documentado la necesidad en la técnica de la inactivación o eliminación de partículas virales en el procedimiento aguas arriba de la producción de proteínas. Finalmente, los biorreactores y fermentadores no están equipados frecuentemente con la maquinaria requerida para llevar a cabo estas técnicas, y el coste de adecuación del equipo existente para añadir tal maquinaria puede ser exorbitadamente alto.

25 Además de las técnicas anteriores, se ha usado la luz ultravioleta para tratar preparaciones de proteínas a gran escala antes de la purificación de estas proteínas procedentes de sobrenadantes celulares. Sin embargo, como con otros métodos de tratamiento de sobrenadantes celulares a gran escala antes de la purificación y el aislamiento de productos proteicos terapéuticos a partir de los sobrenadantes celulares, se ha usado principalmente la exposición a luz ultravioleta aguas abajo de la producción de proteínas. En otras palabras, no existe ningún método de la técnica anterior en el que se haya usado luz ultravioleta (solo o en combinación con otros métodos de purificación o tratamiento) para tratar medios de cultivo celular antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos para tratar medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor. Tales métodos serían particularmente útiles para proteger líneas celulares valiosas frente a la contaminación viral, ahorrar costes perdidos como resultado de medios contaminados e inservibles, y aumentar la eficiencia de la producción de proteínas mediante tales líneas celulares. Por tanto, el desarrollo de tales métodos tendría amplia aplicación en la fabricación de productos biofarmacéuticos.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

40 La presente invención proporciona métodos para tratar medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor que comprende exponer los medios de cultivo celular a luz ultravioleta C (UVC); hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro estéril; e introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor.

45 La presente invención también proporciona métodos de tratamiento de medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor que comprende exponer los medios de cultivo celular a luz UVC; hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro de profundidad; hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro estéril; e introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor.

Realizaciones específicas preferidas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 muestra la relación entre la longitud de onda de la luz y el daño al ADN/ARN viral.

50 La figura 2 muestra la eficiencia de la eliminación de virus de la leucemia murina (VLMu) o virus diminuto del ratón (VDR) de medios de cultivo celular usando dos tipos de filtros de profundidad.

La figura 3 muestra la eficiencia de la eliminación de parvovirus porcino (PVP) y reovirus 3 (Reo-3) de medios de cultivo celular usando dos tipos de filtros de profundidad.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La invención proporciona métodos para tratar medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor que comprende exponer los medios de cultivo celular a luz ultravioleta C (UVC); hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro estéril; e introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. La invención también proporciona métodos de tratamiento de medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor que comprende exponer los medios de cultivo celular a luz UVC; hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro de profundidad; hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro estéril; e introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor.

10 En los métodos de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. La expresión "luz ultravioleta" se refiere a una sección del espectro electromagnético de la luz que se extiende desde la región de los rayos X (100 nm) hasta la región visible (400 nm). En particular, la luz ultravioleta generalmente se divide en cuatro fracciones: (1) luz ultravioleta de vacío, que tiene una longitud de onda de 100 a 200 nm, (2) ultravioleta C (UVC), que tiene una longitud de onda de 200 a 280 nm, (3) ultravioleta B (UVB), que tiene una longitud de onda de 280 a 315 nm, y (4) ultravioleta A (UVA), que tiene una longitud de onda de 315 a 400 nm (véase la figura 1).

15 En una realización de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC que tiene una longitud de onda de entre 200 y 280 nm antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En otra realización de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC que tiene una longitud de onda de 254 nm antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En otras realizaciones de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC que tiene una longitud de onda de 254 nm +/- 1 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 2 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 3 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 4 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 5 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 6 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 7 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 8 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 9 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 10 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 15 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 20 nm, o una longitud de onda de 254 nm +/- 25 nm.

25 En los métodos de la invención, se usa luz UVC para inactivar partículas virales sin envuelta dañando el ADN o ARN viral. El daño del ácido nucleico inactiva los virus e impide su posterior replicación. Un dispositivo típico, o reactor de UVC, para exponer disoluciones a luz UVC utiliza flujo espiral hidráulico junto con una fuente de irradiación que genera vórtices de Dean en una corriente de fluido que permite que se administren dosis de irradiación UVC de manera uniforme en toda la disolución. Cuando se usa luz UVC para inactivar partículas virales sin envuelta, la inactivación viral generalmente se produce tras aproximadamente cinco minutos de exposición.

30 Tal como se describe en el presente documento, se han usado métodos de aclaramiento viral conocidos en la técnica casi exclusivamente aguas abajo de la producción de proteínas. Además de consideraciones de costes y tiempo, se han usado tales métodos casi exclusivamente aguas abajo de la producción de proteínas porque el objetivo de tales métodos ha sido inactivar y/o eliminar partículas virales en sobrenadantes celulares a gran escala antes de la purificación y el aislamiento de productos proteicos terapéuticos de los sobrenadantes celulares. Con respecto al uso de la luz UVC para inactivar partículas virales en bioprocesos a gran escala, una razón de la falta de procedimientos de la técnica anterior que emplean exposición a luz UVC aguas arriba de la producción de proteínas ha sido la alta absorción de luz UVC por los medios de cultivo celular a 254 nm, y los efectos de esta alta absorción sobre la capacidad de tales medios para sostener un crecimiento celular eficaz. Los métodos de la invención evitan este problema aumentando la energía de la luz UVC que va usarse.

35 El término "energía" se refiere a la cantidad de radiación ultravioleta en Julios/metros<sup>2</sup> a la que se exponen los medios de cultivo celular tratados. En una realización de la invención, se exponen los medios de cultivo celular a luz UVC a una densidad de energía de 120-320 J/m<sup>2</sup> antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En otra realización, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En otras realizaciones de la invención, se exponen los medios de cultivo celular a luz UVC a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 1 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 2 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 3 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 4 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 5 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 10 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 15 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 20 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 25 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 30 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 40 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 50 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 60 J/m<sup>2</sup>, o a una densidad de energía de 238 J/m<sup>2</sup> +/- 70 J/m<sup>2</sup>.

40 Los métodos de la invención pueden usarse para procedimientos de inactivación a escala de laboratorio, pero más significativamente para el tratamiento a gran escala de medios de cultivo celular antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En una realización de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC a una velocidad de flujo de 1-12 litros por hora antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En otra realización de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC a una velocidad de flujo de 6 litros por hora antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. En otras realizaciones de la invención, se exponen medios de cultivo celular a luz UVC a una velocidad de flujo de 6 litros por hora +/- 1 litro por hora, o a una velocidad de flujo de 6 litros por hora +/- 2 litros por hora, o a una velocidad de flujo de 6 litros por hora +/- 3 litros por hora, o a una

velocidad de flujo de 6 litros por hora +/- 4 litros por hora, o a una velocidad de flujo de 6 litros por hora +/- 5 litros por hora.

5 “Valor de reducción logarítmica” (VRL) es una medición de la eficiencia de retención de filtración que es equivalente a la razón del logaritmo de la concentración de exposición dividida entre la concentración del filtrado ( $VRL = \text{Log}_{10}$  exposición/filtrado). En la presente invención, la concentración de exposición se refiere a la concentración de materiales virales en los medios de cultivo celular. Para los fines de la invención, se considera que un filtrado (es decir, medios de cultivo celular) es estéril si tiene un VRL de al menos 4,85, y se prefieren filtrados que tienen VRL de entre 6 y 7. En una realización de la invención, se obtiene un valor de reducción logarítmica mayor que o igual a 4,85 tras el tratamiento de los medios de cultivo celular. En otra realización, se obtiene un valor de reducción logarítmica de entre 6 y 7 tras el tratamiento de los medios de cultivo celular.

10 En los métodos de la invención, se someten los medios de cultivo celular a una etapa de filtración tras exponerse a luz UVC. La expresión “filtración estéril” o “filtro estéril” se refiere a la eliminación de microplasma y otros posibles contaminantes de los medios de cultivo celular mediante el uso de un filtro estéril biológico convencional. En una realización de la invención, se hacen pasar medios de cultivo celular a través de un filtro estéril que tiene poros con un tamaño máximo de 200 nm antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor.

15 En otra realización de la invención, se hacen pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro de profundidad. La expresión “filtro de profundidad” se refiere a un filtro que tiene múltiples capas de filtración, siendo cada capa responsable de la filtración de materia particulada de diferentes tamaños y densidades. Este tipo de procedimiento de filtración es similar a la exclusión por tamaños. El material ligero se aísla en la parte superior del lecho del filtro. Los medios se vuelven progresivamente más finos y más densos en las capas inferiores. Se eliminan partículas suspendidas más grandes en las capas superiores, mientras que se eliminan partículas más pequeñas en las capas inferiores.

20 La capacidad de los filtros de profundidad para eliminar determinados tipos de partículas virales depende del pH de la disolución que va filtrarse. Por ejemplo, cuando se hacen pasar medios de cultivo celular que tienen un pH inferior a través de un filtro de profundidad, pueden aclararse más eficientemente las partículas virales sin envuelta de los medios. Los medios de cultivo celular normalmente tienen una alta conductividad de aproximadamente 15 a 20 mS/cm y pH 7,4, que ayuda en la captura de partículas virales con envuelta. La realización de la filtración en condiciones de pH neutro aseguraría por tanto mayores VRL para los virus con envuelta, que tienen pl de 6,0-7,8. En una realización de la invención, se hacen pasar los medios de cultivo celular a través del filtro de profundidad a un pH ácido. En otra realización de la invención, se hacen pasar los medios de cultivo celular a través del filtro de profundidad a pH 5,0. En otras realizaciones de la invención, se hacen pasar los medios de cultivo celular a través del filtro de profundidad a un pH de entre 4,0-5,0, o a un pH de entre 5,0-6,0, o a un pH de entre 6,0-7,0.

25 Pueden usarse los métodos de la invención para inactivar partículas virales que pueden estar presentes en medios de cultivo celular antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. Pueden usarse otros métodos de la invención para eliminar también partículas virales (que incluyen partículas virales que pueden no haberse inactivado por la exposición a luz UVC). En un método de la invención, se exponen medios de cultivo celular a UVC que tiene una longitud de onda o energía, o a una velocidad de flujo, suficiente para dañar los ácidos nucleicos de cualquier virus sin envuelta en los medios de cultivo celular. En otro método de la invención, se hacen pasar medios de cultivo celular a través de un filtro de profundidad que tiene un tamaño de poro, o a una velocidad de flujo, suficiente para eliminar cualquier virus con envuelta de los medios de cultivo celular.

30 En los métodos de la invención, se tratan medios de cultivo celular antes de introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor. El término “biorreactor” se refiere a un dispositivo o sistema para su uso en el crecimiento a gran escala de líneas celulares o tejidos para la preparación de productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, puede usarse un biorreactor típico para generar de 200 a 20.000 l de sobrenadante celular (que contiene el subproducto pretendido del bioproceso, una proteína biofarmacéutica). En los métodos de la invención, puede usarse el biorreactor para sostener el crecimiento de células para la producción a gran escala de, por ejemplo, anticuerpos.

35 La presente invención proporciona un método para inactivar y/o eliminar partículas virales de medios de cultivo celular aguas arriba de la introducción de los medios de cultivo celular en un biorreactor. Uno de los beneficios de la presente invención es que tratando los medios de cultivo celular aguas arriba de su introducción en el biorreactor, puede reducirse el riesgo de contaminación en el punto de inoculación, creando de ese modo un mejor entorno para un máximo crecimiento celular y una máxima producción de proteínas (por ejemplo, título de anticuerpos). Además, puede usarse la presente invención para disminuir el riesgo de costes de producción perdidos (por ejemplo, asociado con una parada de mantenimiento de un procedimiento de fabricación biofarmacéutico tras la contaminación viral).

40 Pueden usarse los medios de cultivo celular tratados para sostener el crecimiento de varios tipos diferentes de células. En una realización de la invención, se usan los medios de cultivo celular tratados para sostener el crecimiento de células de mamíferos. En otra realización de la invención, las células de mamíferos pueden producir anticuerpos. En aún otra realización de la invención, se usan los medios de cultivo celular tratados para sostener el crecimiento de células de insectos.

Los ejemplos que siguen son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, y diversos usos de las mismas. Se exponen sólo con fines explicativos, y no deben tomarse como limitativos de la invención.

### EJEMPLO 1

#### Características de los medios de cultivo celular

- 5 Pueden usarse los métodos de la invención para tratar medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor. Se analizaron tres tipos de medios de cultivo celular para determinar su osmolalidad, conductividad a 25°C y absorbancia a 254 nm (véase la tabla I).

Tabla I

Tipo de medios	Osmolalidad (mOsm/kg)	Conductividad (mS/cm)25°C	Absorbancia D.O. 254 nm
A	296,33	12,19	4,8
B	296,67	11,05	11,7
C	854,67	12,11	64

10

### EJEMPLO 2

#### Inactivación viral con luz UVC

Se han llevado a cabo estudios para determinar la inactivación de varios virus mediante luz UVC. La tabla II muestra los virus modelo que se eligieron: virus xenotrópico de la leucemia murina (x-VLMu), virus diminuto del ratón (VDR), parvovirus porcino (PVP), y reovirus 3 (Reo 3).

15

Tabla II

Modelo	Familia	Propiedades	pl
x-VLMu	<i>Retroviridae</i>	Con envuelta, ARN mc, 80-120 nm, baja resistencia	6,0-6,7
VDR	<i>Paroviridae</i>	Sin envuelta, ADN mc y, 18-26 nm, alta resistencia	5,0
PVP	<i>Herpesviridae</i>	Con envuelta, ADN bc y, 120-200 nm, resistencia baja-media	7,4-7,8
Reo 3	<i>Reoviridae</i>	Sin envuelta, ARN bc, 50-70 nm, resistencia media	3,9

Se realizó la inactivación de VDR(i) y VDR(p) en medios de producción a diversas velocidades de flujo. La inactivación se logró con un VRL superior a 4,85 para VDR(p) (véase la tabla III) y un VRL superior a 3,35 para VDR(i) (véase la tabla IV).

20

Tabla III

Perfil de inactivación de VDRp usando luz UVC							
A254nm	Unidad a escala de laboratorio de velocidad de flujo (l/h)	Lámpara de UVC cubierta (%)	Fluidez esperada (J/m <sup>2</sup> )	Inactivación de VDRp [VRL]	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo para recogida de medios (min/250 ml)	Escala de tratamiento (l/h)
12	10	0	143,1	3,93, 4,09, 4,09	166,7	1,5	1000-2000
12	8	0	178,9	4,76, 4,76, 4,76	133,3	1,9	1000-2000
12	6	0	238,5	≥4,85, ≥4,85, ≥4,85	100	2,5	1000-2000

Tabla IV

Perfil de inactivación de VDRi usando luz UVC							
A254nm	Unidad a escala de laboratorio de velocidad de flujo (l/h)	Lámpara de UVC cubierta (%)	Fluidez esperada (J/m <sup>2</sup> )	Inactivación de VDRi [VRL]	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo para recogida de medios (min/250 ml)	Escala de tratamiento (l/h)
12	10	0	143,1	≥3,35, ≥3,35, ≥3,35	166,7	1,5	1000-2000
12	8	0	178,9	≥3,35, ≥3,35, ≥3,35	133,3	1,9	1000-2000
12	6	0	238,5	≥3,35, ≥3,35, ≥3,35	100	2,5	1000-2000

Estos ensayos se repitieron para la inactivación de VLMu a partir de ambos medios de producción y medios de alimentación. Los resultados de estos ensayos (es decir, VRL inferior a 1) sugieren que una etapa de inactivación o eliminación adicional puede potenciar adicionalmente los métodos de la invención (véanse las tablas V y VI).

Tabla V

Perfil de inactivación de VLMu usando luz UVC (medios de producción)							
A254nm	Unidad a escala de laboratorio de velocidad de flujo (l/h)	Lámpara UVC cubierta (%)	Fluidez esperada (J/m <sup>2</sup> )	Inactivación de VDRp [VRL]	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo para la recogida de medios (min/250 ml)	Escala de tratamiento (l/h)
12	10	0	143,1	0, 0, 0	166,7	1,5	1000-2000
12	8	0	178,9	0, 0, 0	133,3	1,9	1000-2000
12	6	0	238,5	0, 0, 0	100	2,5	1000-2000

Tabla VI

Perfil de inactivación de VLMu usando luz UVC (medios de alimentación)							
A254 nm	Unidad a escala de laboratorio de velocidad de flujo (l/h)	Lámpara UVC cubierta (%)	Fluidez esperada (J/m <sup>2</sup> )	Inactivación de VLMu [VRL]	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo para la recogida de medios (min/250 ml)	Escala de tratamiento (l/h)
64	2	0	62	0, 0, 0	33,3	7,5	1000-2000
64	2	0	62	0, 0, 0	33,3	7,5	1000-2000
64	2	0	62	0, 0, 0	33,3	7,5	1000-2000

## EJEMPLO 3

Eliminación viral usando filtración de profundidad

Se han llevado a cabo estudios sobre la eliminación de partículas virales con envuelta así como otros materiales celulares no deseados de los medios de cultivo celular usando un filtro de profundidad. La tabla VII muestra la inactivación viral de tres virus con envuelta así como un virus sin envuelta. Los VRL determinados a partir de estos estudios muestran que el filtro de profundidad puede eliminar eficazmente partículas virales con envuelta de medios de cultivo celular.

Tabla VII

<b>Método de eliminación</b>	<b>PVP</b>	<b>x-VLMu</b>	<b>VDR</b>	<b>Reo3</b>
Filtro de profundidad	3,17	>4,23	4,13	>5,01
Filtro de 20 nm	>5,04	>4,87	4,47	5,35
Membrana Q	3,89	>4,24	4,47	5,35

Se sometieron a prueba dos tipos de filtro de profundidad para determinar su eficacia en la eliminación de partículas virales (véanse las figuras 2 y 3).

- 5 Los títulos de las secciones usados en el presente documento son con fines de organización solamente y no han de interpretarse como limitativos del contenido descrito. Toda la bibliografía citada en esta solicitud se incorpora expresamente como referencia al presente documento.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de tratamiento de medios de cultivo celular para su uso en un biorreactor que comprende:
  - (a) exponer los medios de cultivo celular a luz ultravioleta C (UVC);
  - (b) hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro estéril; e
- 5 (c) introducir los medios de cultivo celular en un biorreactor.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de
  - (a2) hacer pasar los medios de cultivo a través de un filtro de profundidad; antes de la etapa (b).
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la luz UVC tiene una longitud de onda de 254 nm.
- 10 4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se exponen los medios de cultivo celular a luz UVC a una velocidad de flujo de 1-12 litros por hora, preferiblemente 6 litros por hora.
5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el valor de reducción logarítmica es mayor que o igual a 4,85, preferiblemente, el valor de reducción logarítmica es de 6-7.
6. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se exponen los medios de cultivo celular a luz UVC a una densidad de energía de 120-320 J/m<sup>2</sup>, preferiblemente 238 J/m<sup>2</sup>.
- 15 7. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el filtro estéril tiene poros con un tamaño máximo de 200 nm.
8. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa de exponer los medios de cultivo celular a luz UVC es suficiente para dañar los ácidos nucleicos de cualquier virus sin envuelta en los medios de cultivo celular.
9. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se usan los medios de cultivo celular tratados para sostener el crecimiento de células de mamíferos o células de insectos.
- 20 10. Método según la reivindicación 9, en el que las células de mamíferos son capaces de producir anticuerpos.
11. Método según la reivindicación 2, en el que se hacen pasar los medios de cultivo celular a través del filtro de profundidad a un pH ácido, preferiblemente pH 5,0.
12. Método según la reivindicación 2, en el que la etapa de hacer pasar los medios de cultivo celular a través de un filtro de profundidad es suficiente para eliminar cualquier virus con envuelta de los medios de cultivo celular.

FIG. 1

Tecnología de Inactivación con UVC

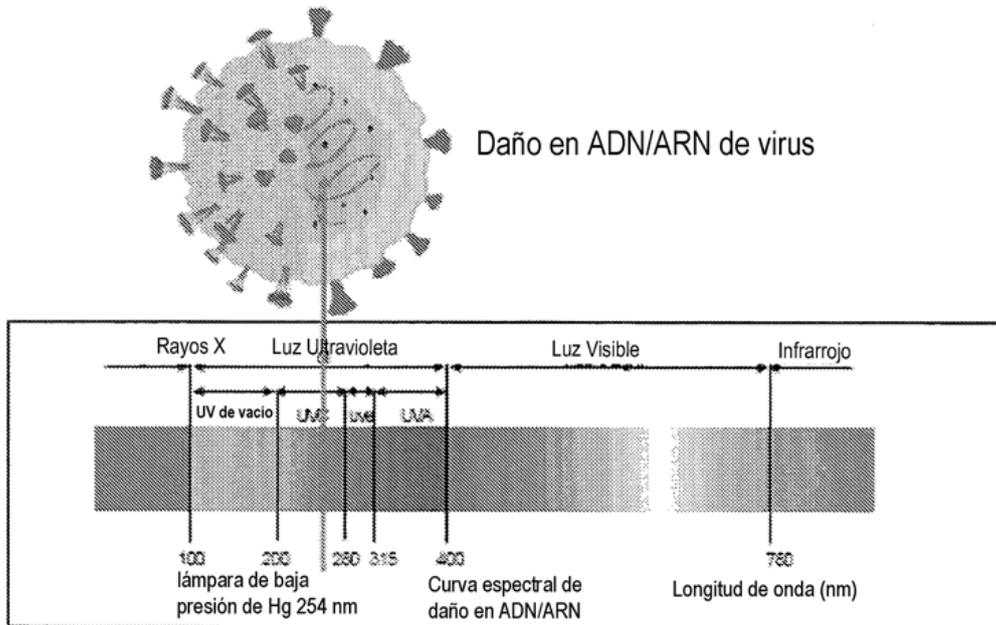


FIG. 2

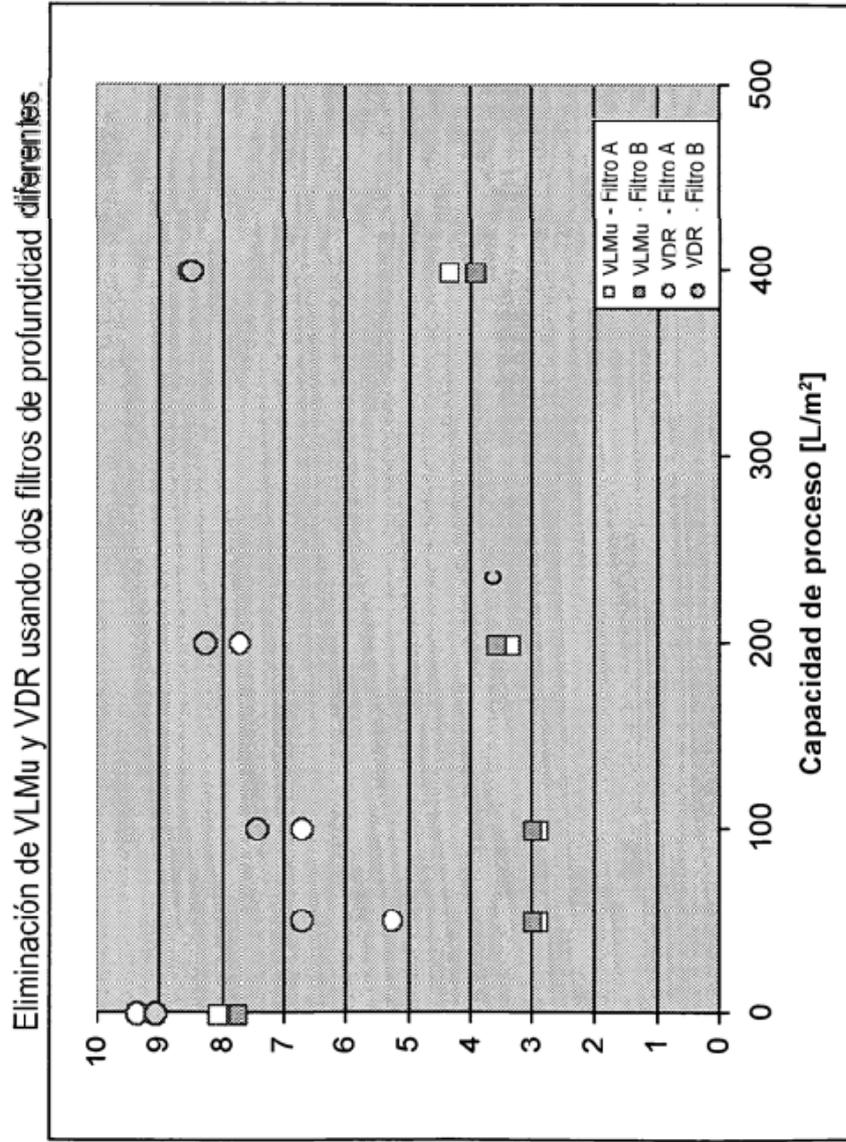


FIG. 3  
 Eliminación viral de VPR y Reo-3 usando dos filtros de profundidad diferentes

