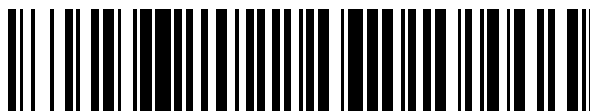


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 429**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013** **PCT/US2013/045663**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013** **WO13192009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013** **E 13731015 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2732020**

54 Título: **Filtración de virus de medios de cultivo celular**

30 Prioridad:

21.06.2012 US 201261662814 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2017

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

MUNDT, WOLFGANG;
MITTERER, ARTUR;
REITER, MANFRED;
HASSLACHER, MEINHARD;
GRILLBERGER, LEOPOLD y
KREIL, THOMAS

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 601 429 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

FILTRACIÓN DE VIRUS DE MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.

- 5 La seguridad virológica es una preocupación importante en la industria biofarmacéutica. A pesar de los esfuerzos para mitigar el riesgo, los incidentes relacionados con la contaminación vírica a gran escala de productos biológicos han generado preocupación en la industria. Algunos sucesos altamente descritos incluyen, por ejemplo, la detección por parte de Genzyme en 2009 de una contaminación por Vesivirus 2117 de su cultivo de células CHO (ovario de hámster chino) que detuvo la producción de Cerezyme® y Fabrazyme®, y la contaminación en 2010 de vacuna
- 10 Rotarix® de Merck por circovirus porcino 1. Una fuente probable de contaminación se produce en la etapa de cultivo celular. Además del coste económico de la empresa de fabricación (un informe pone la estimación en más de cien millones de pérdidas por cada contaminación de biorreactor de 10.000 l, más multas de los organismos), este tipo de sucesos representan un riesgo para los pacientes e interrumpen el acceso a los productos biofarmacéuticos (Liu y otros, Biotechnol. Prog. 2000, 16, 425-434). Como resultado, existe un mayor escrutinio reglamentario y una
- 15 demanda de nuevas técnicas para detectar, prevenir y remediar las contaminaciones víricas.

En general, los contaminantes víricos pueden diferenciarse en contaminaciones víricas aguas arriba y aguas abajo. Las contaminaciones de aguas abajo pueden controlarse mediante la aplicación de sistemas cerrados; sin embargo, especialmente las contaminaciones de aguas arriba son difíciles de controlar y detectar, incluso mediante pruebas

20 exhaustivas. Los contaminantes víricos también pueden proceder del uso de materiales derivados de animales en la producción biofarmacéutica. Cuando la línea celular de producción está libre de contaminantes víricos extraños y la producción no implica el uso de materiales derivados de animales, los contaminantes víricos podrían seguir entrando mediante los medios de cultivo celular. Por ejemplo, los medios sintéticos pueden suplementarse con factores de crecimiento recombinantes producidos en un sistema suplementado con suero y el medio libre de proteínas puede

25 contener, sin embargo, hidrolizados de proteínas filtradas. Sin embargo, la contaminación vírica puede ocurrir incluso en un medio definido químicamente por completo, ya que grandes cantidades de los componentes del medio pueden envasarse en recipientes no estériles. Los filtros convencionales de grado esterilizante ni están diseñados para proteger contra los contaminantes víricos ni son capaces de hacerlo, por lo que deben emplearse otras medidas para garantizar la seguridad virológica.

30 La detección de virus adventicios en uno o más puntos de control del proceso de producción es una práctica estándar. Sin embargo, la detección por sí sola es una medida insuficiente contra la contaminación vírica de productos biofarmacéuticos, especialmente cuando el contaminante vírico presente es insospechado, desconocido o un agente vírico emergente. Tales agentes víricos pueden no ser detectados incluso por micromatrices de ADN bien

35 diseñadas representativas de una gran colección de virus secuenciados. El reto se complica aún más por los bajos niveles de contaminantes víricos necesarios para infectar un cultivo celular y la sensibilidad actualmente limitada de los ensayos de detección.

Los títulos elevados del contaminante vírico pueden no manifestarse en forma de parámetros de cultivo celular

40 alterados, por ejemplo, densidad de cultivo, títulos de proteínas, más allá de su rango normal. Por otro lado, los ensayos de infectividad son muy específicos y requieren condiciones diferentes para cada virus. Como resultado de la contaminación vírica, el equipo aguas abajo, los líquidos y los productos pueden estar contaminados, incurriendo en millones de dólares entre configuración por lotes, eliminación de residuos, pérdida de ventas y descontaminación. El examen exhaustivo de las materias primas para detectar virus es difícil debido a la heterogeneidad de la muestra

45 y los grandes volúmenes implicados en los procesos de producción biofarmacéutica.

Las técnicas de eliminación de virus se pueden clasificar en dos grupos: inactivación y filtración. Los métodos de inactivación buscan la pérdida irreversible de la infectividad vírica, mientras que los métodos de filtración buscan reducir mecánicamente el contaminante vírico. Los métodos de inactivación convencionales emplean irradiación

50 ultravioleta (UV), irradiación gamma, calor, pH bajo o alto o exposición a disolventes/detergentes. En casos en los que la irradiación UV puede eliminar con eficacia y de forma irreversible la actividad vírica, esta puede ser poco práctica a gran escala o no apta para medios preparados. La esterilización en autoclave, aunque posible para líquidos estables al calor, puede alterar los medios sensibles. Un método alternativo conocido como tratamiento térmico de alta temperatura y corta duración (HTST) no es tan duro, pero requiere de equipos, automatización y

55 procedimientos de validación costosos para preservar las características de los medios. La exposición a pH bajo o alto es ineficaz en todo el espectro de posibles contaminantes víricos y puede afectar negativamente a la calidad o la osmolaridad de los medios. La exposición a disolventes/detergentes tampoco es una solución de amplio espectro y es efectiva solo para los virus con una envoltura lipídica. Como tal, el método ideal debe equilibrar las consideraciones de costo y las necesidades para efectuar la eliminación vírica en las materias primas y proporcionar

60 una solución de amplio espectro sin comprometer la tasa de crecimiento o la producción.

EP 1 457 497 A1 se refiere a un procedimiento para la eliminación de virus en soluciones de fibrinógeno para aplicación terapéutica, partiendo de una solución de fibrinógeno procedente de plasma humano previamente purificado con una pureza igual o mayor que 80 % de fibrinógeno con respecto a las proteínas totales, caracterizado

65 por la estabilización y congelación de la solución y posterior descongelación de la misma a una temperatura de entre 5 y 20 °C, en la separación de los materiales no disueltos y la dilución de la proteína y nanofiltración de la solución

resultante usando filtros de tamaño de poro de menos de 35 nm. El tiempo de procesamiento es por lo general inferior a 12 horas.

La filtración retentiva de virus ofrece el equilibrio adecuado. No altera químicamente los componentes de los medios y es adecuado para su uso con alimentación/medios sensibles al calor. Además, la filtración retentiva de virus es una solución de amplio espectro, ya que funciona según un principio de exclusión de tamaño. Sin embargo, las membranas retentivas de virus son costosas (aproximadamente de 2000 a 5000 EUR por m²). Los bajos caudales específicos característicos de la filtración de volúmenes de medios han hecho que el método sea económicamente difícil a una escala adecuada para el suministro de biorreactores a gran escala, debido al coste del área de membrana necesaria. Por ejemplo, cuando la filtración de virus se conecta en serie a la filtración de medios de grado esterilizante, la filtración de virus necesita ocurrir preferentemente dentro de un día de trabajo, es decir, en un máximo de 2 a 10 horas después de la preparación medio a granel con el fin de evitar la contaminación del medio a granel. Por lo tanto, se necesita una gran área de filtración para permanecer dentro de este intervalo de tiempo crítico, que a su vez eleva los costes.

Sorprendentemente, se ha encontrado que los inconvenientes de dicha filtración de virus de la técnica anterior se pueden superar mediante la filtración de la preparación respectiva, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, durante al menos aproximadamente 24 horas a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m². Si el volumen requerido de las respectivas preparaciones se filtra durante un período de tiempo más largo, es decir, durante al menos 24 horas, la capacidad volumétrica de los filtros de virus aumenta enormemente. Sorprendentemente, se ha encontrado, además, que se puede conseguir una importante reducción global de los títulos de virus durante este período de tiempo prolongado. Esto es especialmente beneficioso en la eliminación de virus aguas arriba en sistemas de cultivos celulares.

Por lo tanto, el método de la invención mejora la eficiencia económica de la filtración de virus mediante la mejora de rendimiento y capacidad volumétrica respectivamente. El método de acuerdo con la presente invención funciona a una capacidad volumétrica de al menos 2000 l/m², lo que ayuda a maximizar el uso de filtros de virus de gran capacidad, disminuye los costes efectivos asociados con la misma, y presenta una solución viable a gran escala y fácilmente integrable en los procesos de producción existentes.

El enorme impacto del método de acuerdo con la invención y el uso inventivo de los respectivos filtros de virus en procesos de fabricación estériles, en particular, en procesos en los que se usan preparaciones estériles, por ejemplo, medios de cultivo celular y tampones, puede entenderse por medio del siguiente ejemplo. Suponiendo que un metro cuadrado de una membrana del filtro de virus cuesta en promedio alrededor de 3000 EUR y que un medio de cultivo celular se usa con un coste aproximado de 10 EUR por litro de medio, entonces, los costes para los medios filtrados de virus de 1000 l son 13 EUR por litro de medio, lo que aumenta los costes de los productos para la preparación de medios en aproximadamente un 30 %. Si se pueden filtrar 2000 l con una membrana del filtro de virus, entonces los costes disminuyen a 11,50 EUR. Otro aumento de las capacidades volumétricas, por ejemplo, más allá de 5000 l reduce los costes a menos de 0,6 EUR por litro de medio, lo que hace que los costes adicionales para proporcionar un medio de filtrado de virus sean considerablemente bajos. Como resultado, los elevados costes del uso de filtros de virus, en particular en la descontaminación aguas arriba de una contaminación vírica o potencialmente vírica, disminuye significativamente mediante el aumento de la capacidad volumétrica del método de filtración de virus.

La presente invención aborda completamente este problema de altos costes y baja capacidad volumétrica de filtros de virus respectivamente. La capacidad volumétrica del filtro de virus se puede aumentar mediante la realización de la filtración de virus durante al menos aproximadamente 24 horas a través de un filtro de virus que tenga un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m². Sorprendentemente, se ha encontrado que la capacidad volumétrica de los costosos filtros de virus usados se puede aprovechar mejor llegando a un aumento de 2 a 100 veces de la capacidad volumétrica, al tiempo que se mantiene de la integridad del filtro. Aunque un aumento de 2 a 3 veces de la capacidad volumétrica ya tiene un gran impacto en el proceso de producción y los costes de producción relacionados, con el método de acuerdo con la invención puede conseguirse un aumento de la capacidad volumétrica de hasta 100 veces o más. Esto ofrece grandes oportunidades y hace que la eliminación vírica sea económicamente rentable incluso con costosos filtros de virus que ahora pueden usarse para mejorar aún más la seguridad vírica en los procesos de cultivo celular, en particular, en la eliminación vírica aguas arriba de los procesos de cultivo celular, procesos farmacéuticos, de diagnóstico y/o cosméticos y alimentarios.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para eliminar un contaminante vírico de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular. El método comprende someter dicha preparación a filtración durante al menos aproximadamente 24 horas a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m².

Además, la invención se refiere al uso de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m² en una filtración durante al menos aproximadamente 24 horas para la eliminación de contaminante vírico de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular.

5 Además, la invención se refiere al uso de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular que se puede obtener de acuerdo con cualquier método de la presente invención para el cultivo celular; preparaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o cosméticas, así como en preparaciones alimenticias.

10 Todos los métodos y usos de acuerdo con la invención pueden funcionar a una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m², preferiblemente al menos aproximadamente 3000 l/m², más preferiblemente al menos aproximadamente 5000 l/m². Además, la preparación se somete a filtración y la filtración se realiza, respectivamente, durante al menos 24 horas o durante al menos aproximadamente 48 horas hasta aproximadamente 7 meses o
15 durante aproximadamente 72 horas hasta aproximadamente 3 meses. La filtración se realiza a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 37 °C.

En todas las realizaciones de la invención, la filtración se realiza a una presión que varía de aproximadamente
20 100 mbar a aproximadamente 4000 mbar, preferiblemente de aproximadamente 200 mbar a aproximadamente 3500 mbar, más preferiblemente de aproximadamente 1000 mbar a aproximadamente 3000 mbar.

En todas las realizaciones de la invención, el filtro de virus usado alcanza por lo menos un valor de reducción de 1 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico.

25 Sorprendentemente, se ha encontrado que la capacidad volumétrica de los filtros de virus se puede aumentar enormemente cuando se realiza el proceso de filtración durante al menos aproximadamente 24 horas. Normalmente, las preparaciones para cultivos celulares, por ejemplo, medios de cultivo celular o tampones a granel se filtran por lotes dentro de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 horas después de la preparación de las preparaciones a
30 granel con el fin de evitar la contaminación de las preparaciones por el crecimiento bacteriano o vírico. Ha resultado que, en la práctica, la capacidad máxima de los filtros de virus usados casi no se aprovecha en los procesos de filtración que filtran las respectivas preparaciones dentro de un plazo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 horas. Por lo tanto, tiene que usarse una superficie excesiva de filtro. En contraste con esto, se ha encontrado que debido al uso del método de la presente invención, la capacidad volumétrica de los costosos filtros de virus usados
35 puede aprovecharse mejor llegando a un aumento de 2 a 100 veces de la capacidad volumétrica, al tiempo que se mantiene la integridad del filtro. Aunque un aumento de 2 a 3 veces de la capacidad volumétrica ya tiene un gran impacto en el proceso de producción y los costes de producción relacionados, con el procedimiento según la invención puede conseguirse un aumento de hasta 100 veces o más. Esto ofrece grandes oportunidades y hace que la eliminación vírica sea económicamente rentable incluso con costosos filtros de virus que ahora pueden usarse
40 para mejorar aún más la seguridad vírica en los procesos de cultivo celular, en particular, en la eliminación vírica aguas arriba de los procesos de cultivo celular, procesos farmacéuticos, de diagnóstico y/o cosméticos y alimentarios.

Las realizaciones específicas preferidas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente
45 descripción más detallada de ciertas formas de realización y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Descripciones más particulares de la invención se hacen con referencia a ciertas realizaciones modelos de la misma
50 que se ilustran en las figuras adjuntas. Estas figuras forman una parte de la especificación. Cabe destacar, sin embargo, que las figuras adjuntas ilustran realizaciones modelos de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse limitantes en su alcance.

La figura 1 muestra la cinética de filtración de virus realizada aplicando una filtración de virus de flujo controlado (fig.
55 1C) usando diferentes filtros, todo ello combinado con medios de cultivo celular suplementado con 3 lotes diferentes de hidrolizado de soja (Kerry HyPep1510 n.º 1, DOMO SE50 MAF UF n.º 1 y n.º 2).

Filtro y condiciones experimentales aplicadas (véanse también los ejemplos 1 a 4):

Filtro A: Sartorius Virosart CPV, 180 cm²; a 30 °C con caudales de aproximadamente 30 l/(m² x h)

Filtro B: Millipore Viresolve NFP 3,1 cm²; a 30 °C con caudales de aproximadamente 40 a 60 l/(m² x h). Las
60 filtraciones se llevaron a cabo durante hasta un máximo de 9 días o hasta que se superó una presión máxima de 2000 mbar. La figura 1A muestra la capacidad volumétrica como volumen filtrado por área de superficie de membrana en un intervalo de tiempo, que varía de aproximadamente un mínimo de 4000 l/m² a aproximadamente 12.000 l/m². La presión máxima al final de la filtración fue de entre 600 mbar y 2400 mbar dependiendo del tipo de filtro (fig. 1B). En general, la diferencia entre los hidrolizados de soja es considerablemente baja para la capacidad
65 volumétrica y la presión máxima.

La figura 2 muestra la cinética de filtración de virus realizada aplicando una filtración de virus de flujo controlado (fig. 2C) usando diferentes filtros y medios de cultivo celular suplementados con 3 lotes diferentes de hidrolizado de soja (Kerry HyPep 1510 n.º 1, DOMO SE50 MAF UF n.º 1 y n.º 2).

Filtro y condiciones experimentales aplicadas (véanse también los ejemplos 1 a 4):

- 5 Filtro A: Sartorius Virosart CPV, 180 cm²; a 30 °C con caudales de aproximadamente 30 l/(m² x h)

Filtro D: Asahi BIOEX 10 cm²; a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) con caudales de aproximadamente 20 l/(m² x h). En contraste con los experimentos descritos en la figura 1, las filtraciones se llevaron a cabo por un periodo de tiempo más largo de hasta 81 días o hasta que se alcanzó una presión de 2000 mbar. La figura 2A muestra la capacidad volumétrica como volumen filtrado por área de superficie de membrana en un intervalo de tiempo, que varía de aproximadamente un mínimo de 16.000 l/m² (para el filtro A con DOMO SE50 MAF n.º 2) a aproximadamente 35.000 l/m² (para el filtro D con los 3 lotes de hidrolizados diferentes). La presión máxima al final de la filtración fue de entre 1200 mbar y 2000 mbar dependiendo del tipo de filtro (fig. 2B). En general, la diferencia entre los hidrolizados de soja es considerablemente baja para la capacidad volumétrica y la presión máxima.

- 15 La figura 3 es un gráfico que muestra la relación entre el flujo y la presión diferencial como se observa a aproximadamente 22 °C usando el filtro A (Sartorius Virosart CPV 180 cm²) y medios que contienen hidrolizado de soja DOMO SE50 MAF UF, Lote n.º 2 (véase el ejemplo 5).

Se requiere una presión diferencial mínima de aproximadamente 100 mbar para conseguir un caudal específico mínimo detectable, que luego se aumenta gradualmente con una correlación proporcional obviamente lineal entre el

- 20 caudal específico y la presión diferencial.

La figura 4 muestra la diferencia entre una filtración con control de presión y una filtración con control de caudal usando un filtro A (Sartorius CPV, 180 cm²) y medio con hidrolizado de soja Kerry HyPep 1510 n.º 2 (véanse los ejemplos 1 a 4).

- 25 Las filtraciones se llevaron a cabo durante 19 días y alcanzaron en este tiempo una capacidad volumétrica de aproximadamente 6000-7000 l/m². La presión final de la filtración con control de caudal era comparable a la presión de la filtración con control de presión (véase la fig. 4B), y el caudal específico final de la filtración con control de presión era comparable al caudal de la filtración con control de caudal (véase la fig. 4C). Esto demuestra que ambas estrategias de control para la filtración de virus pueden dar como resultado una capacidad volumétrica comparable.

30

La figura 5 muestra los resultados de un experimento de biorreactor de 10 l usando un medio filtrado de virus en comparación con el medio no filtrado de virus descrito en el ejemplo 6. Los medios de cultivo celular se filtraron de virus por lotes con el filtro A antes de iniciar el experimento. Los experimentos se llevaron a cabo en paralelo, usando cada uno medios de cultivo celular suplementados con 3 hidrolizados de soja diferentes (Kerry HyPep 1510, Lote n.º 1; DOMO SE50 MAF UF, Lote n.º 1 y DOMO SE50 MAF UF, Lote n.º 2). Los datos se calcularon a partir de las últimas 3 semanas de un cultivo celular continuo de 4 semanas. No pudieron detectarse diferencias entre los respectivos medios filtrados de virus (soja 1 NF, Soja 3 NF y soja 2 NF) frente a su referencia sin filtrar (soja 1, soja 3 y soja 2) para la productividad específica (fig. 5A), la productividad volumétrica (fig. 5B) y la tasa de crecimiento específico (fig. 5C).

40

La figura 6 muestra los resultados de un experimento de biorreactor de 120 l usando un medio filtrado de virus en comparación con el medio no filtrado de virus descrito en el ejemplo 7. Los medios de cultivo celular se filtraron de virus en línea de la línea de alimentación de medio de los biorreactores usando alternativamente filtro E (Sartorius Virosart CPV, 2000 cm²) y filtro F (Millipore Viresolve NFP 850 cm²) durante aproximadamente 58 días en modo continuo. Los intervalos de tiempo y la capacidad volumétrica de la alimentación de medio filtrado de virus se muestran en la fig. 6A. Se calcularon los datos para los intervalos utilizando los diferentes filtros. No pudieron detectarse diferencias entre los respectivos medios filtrados de virus frente a la referencia sin filtrar para la tasa de crecimiento específico (fig. 6B) y la productividad volumétrica (fig. 6C).

45

- 50 La figura 7 muestra el cambio de título de infectividad de MMV [TCID₅₀/ml] encontrado en muestras de filtrados secuenciales tomadas en el curso de la filtración de medios enriquecidos con MMV que contenían hidrolizado de soja DOMO SE50 MAF n.º 5 UF con filtro G (ASAHI Planova 15N) como filtros de virus (véase el ejemplo 8). Se observó un nivel bajo de entrada de virus dentro de 2 a 3 días. No obstante, la eliminación de virus se consideró eficaz.

55

La figura 8 muestra el cambio de título de infectividad de MMV [TCID₅₀/ml] encontrado en muestras de filtrados secuenciales tomadas en el curso de la filtración de medios enriquecidos con MMV que contenían hidrolizado de soja (serie n.º 1 con hidrolizado de soja DMV SE50 MAF UF n.º 5; serie n.º 2 con hidrolizado de soja DMV SE50 MAF UF n.º 4) con filtro D (Asahi BIOEX) como filtros de virus (véase el ejemplo 9). No se observó entrada de virus y la eliminación de virus se consideró eficaz y completa.

60

La figura 9 muestra el cambio de título de infectividad de MMV [TCID₅₀/ml] encontrado en muestras de filtrados secuenciales tomadas en el curso de la filtración de medios enriquecidos con MMV como se describe en el ejemplo 10. No se observó entrada de virus para las series n.º 1 y n.º 2 (filtro D), lo que resulta en la eliminación eficaz y completa de virus de los medios que contienen hidrolizado de soja. Se observó un nivel bajo de entrada de virus para las series n.º 3 y n.º 4 (filtro I) y las series n.º 5 y n.º 6 (filtro G), lo que resulta en una eliminación eficaz pero no

65

completa de virus de los medios que contienen hidrolizado de soja. Se observó una entrada más significativa de virus para la serie n.º 7 (filtro B) y la serie n.º 8 (filtro H), lo que resulta en factores reducidos de eliminación de virus en el límite de la significación. Sin embargo, con todos los filtros podría lograrse, al menos en un experimento, una reducción global mínima de título de más de aproximadamente 1 Log TCID₅₀/ml.

5

Tabla 1: Combinación de filtros de virus e hidrolizados de soja usados en experimentos de adición

Experimento n.º	Filtro	Lote de hidrolizado de soja	Factor de reducción global [log ₁₀ (TCID ₅₀ /ml)]
1	D	7	>5,1
2	D	6	>4,6
3	I	3	4,5
4	I	5	>5,4
5	G	7	4,4
6	G	7	4,1
7	B	6	1,5
8	H	3	1,2

La figura 10 muestra la cinética de una filtración vírica realizada como se describe en el ejemplo 11. La presión se mantuvo entre 0,8 y 1,2 bar (1,1 bar promedio) a excepción de las interrupciones de presión y flujo intencionales, que simulan el peor caso de las condiciones de funcionamiento. Se lograron caudales iniciales de aproximadamente 38 l/(m² x h), que disminuyeron gradualmente hasta el final del experimento, sin embargo, pudo mantenerse un caudal mínimo de 4 l/(m² x h). La duración global, incluyendo las interrupciones de presión, fue de 30 días. Se pasaron aproximadamente 6500 l/m² por el filtro.

15

La figura 11 muestra el cambio de título de infectividad de MMV [Log₁₀(TCID₅₀/ml)] encontrado en muestras de filtrado secuenciales tomadas en el curso de la filtración de medios enriquecidos con MMV como se describe en el ejemplo 11. No se observó entrada de virus en ninguna de las 20 fracciones ensayadas. Las cargas de virus variaron de < 0,9 [Log₁₀(TCID₅₀)] a < 2,8 [Log₁₀(TCID₅₀)] dependiendo del volumen de fracción. La carga total de virus en los filtrados fue < 3,0 [Log₁₀(TCID₅₀)], que, cuando se resta de la carga de virus inicial del material añadido (es decir, 8,5 [Log₁₀(TCID₅₀)]), resulta en un factor de reducción global de virus > 5,5 Log₁₀. Esto se consideró eficaz y completo.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25

La presente invención proporciona un método para eliminar un contaminante vírico de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular. El método comprende someter dicha preparación a filtración durante al menos aproximadamente 24 horas a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m².

30

Además, la invención se refiere al uso de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m² en una filtración durante al menos 24 horas para la eliminación de contaminante vírico partir de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular.

35

Además, la invención se refiere al uso de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular que se puede obtener de acuerdo con cualquier método de la presente preparaciones alimenticias.

40

En todas las realizaciones de la invención, la preparación se somete a filtración de virus, la filtración de virus o el uso del filtro de virus se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses o aproximadamente 7 meses. Además, en una realización, la preparación se somete a filtración de virus o la filtración de virus se lleva a cabo durante aproximadamente 1 semana a aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 7 meses, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 meses, aproximadamente 2 meses a aproximadamente 5 meses, aproximadamente 2 meses a aproximadamente 4 meses, aproximadamente 2 meses a aproximadamente 3 meses o al menos aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 7 meses o aproximadamente 48 horas hasta aproximadamente 5 meses o aproximadamente 72 horas hasta aproximadamente 3 meses. Además, en una

55

aproximadamente 48 horas hasta aproximadamente 7 meses, preferiblemente aproximadamente una semana a aproximadamente 5 meses o aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 3 meses o aproximadamente 2 meses a aproximadamente 3 meses.

- 5 El método de acuerdo con la invención puede funcionar a una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m², o al menos aproximadamente 3000 l/m², o al menos aproximadamente 4000 l/m² o al menos aproximadamente 5000 l/m², al menos aproximadamente 7500 l/m², al menos aproximadamente 10.000 l/m², o al menos aproximadamente 20.000 l/m². A este respecto, la «capacidad volumétrica» se refiere al volumen de solución que se puede filtrar a través de un área especificada de la membrana del filtro de virus antes de que el flujo del
10 filtrado se reduzca o la contrapresión aumente a condiciones de funcionamiento no deseadas debido a la obstrucción de la membrana del filtro.

- Se contempla que la presente invención, incluidas todas las realizaciones, se pueda emplear sola o en combinación con otros enfoques conocidos en la técnica para minimizar la contaminación vírica, por ejemplo, cribado,
15 abastecimiento, detección, inactivación vírica, retención por adsorción, etc. Los presentes métodos se enfocan en la entrada de agentes víricos no deseados a través de la preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, al principio del proceso de producción y en proporcionar un mecanismo de reducción vírica. Las ventajas de la presente invención incluyen la facilidad de implementación a gran escala, la necesidad de un área de la membrana del filtro reducida para procesar un volumen dado de una preparación, que es
20 un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, con la subsiguiente reducción del coste para ello. En particular, la filtración de virus de preparaciones de acuerdo con la invención es fácil de integrar en procesos de fabricación continuos, por ejemplo, en procesos de cultivo celular continuo como la perfusión o quimiostato como los sistemas de biorreactores.

- 25 El término «temperatura», tal y como se usa en este documento, se refiere a la temperatura de las preparaciones filtradas de acuerdo con la invención, por ejemplo, un medio de cultivo celular o tampón, en el momento en que pasa a través del filtro de virus. En una realización de acuerdo con la invención, la temperatura varía de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C. En una realización, el límite inferior del intervalo de temperatura es de aproximadamente 2 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente
30 15 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 37 °C o aproximadamente 40 °C. El límite superior del intervalo de temperatura de acuerdo con la invención es de aproximadamente 10 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 50 °C o aproximadamente 60 °C. En una realización, la temperatura está en un intervalo de aproximadamente 4 °C a
35 aproximadamente 45 °C, o en un intervalo de temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C. Asimismo, en una realización, la temperatura es la temperatura ambiente que es un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. Por supuesto, también se prefieren realizaciones en las que las preparaciones se someten a filtración sin ningún calentamiento o enfriamiento adicional de las preparaciones. Por lo tanto, en una
40 realización adicional se usa una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C dependiendo de la temperatura del lugar respectivo en el que se realiza la filtración. En otra realización, se utilizan temperaturas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C, por ejemplo, precalentando la preparación líquida antes de la filtración. El filtrado resultante de esta filtración de una preparación puede ser alimentado continuamente a un biorreactor.

- 45 En una realización de la invención, la filtración se realiza a una presión que varía de aproximadamente 100 mbar a aproximadamente 4000 mbar, o de aproximadamente 200 mbar a aproximadamente 3500 mbar. En una realización, la filtración de virus se realiza en un intervalo de presión, en el que el límite inferior es de aproximadamente 100 mbar, aproximadamente 200 mbar, aproximadamente 500 mbar, aproximadamente 1000 mbar,
50 aproximadamente 1200 mbar, aproximadamente 1500 mbar, aproximadamente 2000 mbar, aproximadamente 2500 mbar o aproximadamente 2800 mbar. El límite superior es de aproximadamente 1200 mbar, aproximadamente 1500 mbar, aproximadamente 2000 mbar, aproximadamente 2500 mbar, aproximadamente 2800 mbar o aproximadamente 3000 mbar. En una realización, la filtración se realiza a una presión que varía de aproximadamente 1000 a aproximadamente 4000 mbar, aproximadamente 1500 a aproximadamente 3500 mbar, de
55 1700 mbar a aproximadamente 3300 mbar o de aproximadamente 1000 mbar a aproximadamente 2000 mbar.

- Los ajustes de temperatura y de presión se pueden usar en otras realizaciones de la invención para regular el caudal específico y la capacidad volumétrica. Mejoras adicionales en la capacidad volumétrica y el periodo de tiempo de uso del filtro de virus se pueden obtener mediante la regulación de otros parámetros del proceso, tales como la
60 presión y temperatura de filtración. Por ejemplo, se ha comprobado que en algunas realizaciones se prefiere someter la preparación a filtración a una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C a una presión de aproximadamente 1000 mbar a aproximadamente 2000 mbar.

- En experimentos de filtración preliminares se ha demostrado la influencia de la temperatura de las preparaciones a
65 filtrar en el caudal específico. Se observó un aumento del caudal del 50 al 100 % al aumentar la temperatura de filtración de una preparación de acuerdo con la invención que tiene una temperatura de almacenamiento de

aproximadamente 4 °C a temperaturas de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 37 °C. Sin embargo, todas estas realizaciones están dentro del alcance que el uso de la filtración durante al menos aproximadamente 24 horas efectúa, de manera que la capacidad de los costosos filtros de virus usados puede aprovecharse mejor, llegando a un aumento de 2 a 100 veces de la capacidad volumétrica, al tiempo que se mantiene la integridad del filtro.

5

En una realización preferida, el método para eliminar un contaminante vírico partir de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, comprende el paso de someter dicha preparación a filtración durante al menos aproximadamente 10 días a aproximadamente 2 meses a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm a una presión de aproximadamente
10 1000 mbar a 2000 mbar y a una temperatura de 10 °C a 40 °C, y que tiene una capacidad volumétrica de al menos 2000 l/m². Por supuesto, todos los demás parámetros pueden combinarse también con esta realización. Además, como una realización más preferida, dicho método se realiza en un modo continuo de filtración, en el que la preparación que se prefiere es un medio de cultivo celular, por ejemplo, un medio de cultivo celular que comprende un hidrolizado de soja o un medio de cultivo celular que comprende componentes derivados de animales, en el que
15 el filtrado se alimenta continuamente a un biorreactor, en particular, un reactor quimiostato. En otra realización, esta realización puede además realizarse usando al menos 2 filtros de virus dispuestos en paralelo o en serie.

Se contempla que los métodos de filtración de virus como se describe en este documento pueden usarse para reducir la contaminación vírica de cualquier preparación que sea un medio de cultivo celular o un componente de un
20 medio de cultivo celular, es decir, un medio y tampones adecuados para el crecimiento de células animales, y preferiblemente células de mamíferos, en cultivo celular *in vitro*. Normalmente, el medio de cultivo contiene un tampón, sales, una fuente de energía, aminoácidos, vitaminas y oligoelementos esenciales.

El término «preparación» también incluye cualquier componente que es una posible parte de un medio de cultivo celular en el sentido de la presente invención y capaz de soportar el crecimiento de la célula adecuada en cultivo.
25 Dichas preparaciones incluyen, por ejemplo, un tampón o soluciones de al menos un aminoácido o proteína; soluciones de al menos una vitamina; soluciones de al menos una sal orgánica o inorgánica; o soluciones que comprenden al menos una fuente de hidratos de carbono o azúcares.

En el contexto de la presente invención, «valor de reducción logarítmica» (LRV) es una medida de la eficacia de una membrana para retener una partícula tal como bacterias o virus, que se define como el logaritmo (en base 10) de la relación entre dicho recuento de partículas en la corriente de alimentación y el recuento de partículas en el permeado de la membrana del filtro de virus. El valor LRV es específico para un tipo de partículas dado. En una realización de acuerdo con la invención, el filtro de virus alcanza al menos un valor de reducción de 1 Log₁₀ (LRV)
30 para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 2 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 3 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 5 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 6 Log₁₀ para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 7 Log₁₀ para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 8 Log₁₀ para un contaminante vírico,
40 preferiblemente al menos un valor de reducción de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico. Por supuesto, es evidente para una persona experta en la técnica, que cualquier valor de reducción de Log₁₀ (LRV) de un contaminante vírico o potencialmente vírico de la preparación a ser filtrada es beneficiosa con el fin de mejorar la seguridad de un proceso de producción. Por lo tanto, especialmente este parámetro puede combinarse con todos los demás parámetros que se usan en el método de la presente invención.

45

«Flujo», tal y como se usa en este documento, intercambiable con «caudal específico» o «caudal», es una medida utilizada para caracterizar las membranas, se refiere a la tasa de flujo del filtrado (expresada en el volumen o el peso de la solución que permea a través de la membrana de filtración de virus por área de filtro y el tiempo, por ejemplo, l/(m² x h). En el contexto de la invención, el término «específico» significa dentro de un tiempo definido, sin embargo,
50 cuando se utiliza solo «caudal», es evidente, a partir de las unidades de este parámetro, que se refiere también al «caudal específico». Como abreviatura de la cantidad «volumen» dada en la unidad «litro», "l" o "L" se usan indistintamente. El caudal específico dentro del método de la presente invención puede variar dentro de un rango o permanecer considerablemente fijo a lo largo de toda la duración del proceso de filtración que usa un filtro de virus dado. En una realización de la presente invención, el caudal específico puede variar de aproximadamente 5 l/(m² x h) a aproximadamente 500 l/(m² x h) durante al menos 24 horas hasta aproximadamente 7 meses. El límite inferior para el flujo puede ser de aproximadamente 5 l/(m² x h) o aproximadamente 10 l/(m² x h). El límite superior puede ser de aproximadamente 25 l/(m² x h), aproximadamente 75 l/(m² x h), aproximadamente 100 l/(m² x h), aproximadamente 200 l/(m² x h), aproximadamente 250 l/(m² x h), aproximadamente 300 l/(m² x h) o aproximadamente 500 l/(m² x h). El flujo puede, además, variar de aproximadamente 5 l/(m² x h) a aproximadamente
60 100 l/(m² x h), aproximadamente 10 l/(m² x h) a aproximadamente 100 l/(m² x h) o aproximadamente 10 l/(m² x h) a aproximadamente 25 l/(m² x h).

«Filtración por lotes» o filtración hecha en modo por lotes, se refiere en este documento a un proceso en el que se filtra una cantidad o volumen totales específicos de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos
65 un componente de un cultivo celular medio, a través de un filtro de virus en un lote que depende de la capacidad del

filtro de virus, y en el que el proceso de filtración se finaliza antes de que el filtrado se dirija o alimente al proceso en el que se usa o se consume.

El término «filtración continua» o «filtración en línea» se refiere a un proceso de filtración en el que se filtra la cantidad o el volumen totales específicos de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, a través del filtro de virus que depende continuamente de la capacidad del filtro de virus, y en el que el proceso de filtración está todavía en curso cuando el filtrado ya se dirige o alimenta al proceso en el que se utiliza o se consume.

10 Todas las realizaciones de la presente invención pueden realizarse usando filtración por lotes o filtración continua. El efecto beneficioso de la invención ya se consigue sometiendo una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, a filtración durante al menos 24 horas a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m² con el fin de eliminar un contaminante vírico de dicha preparación.

15 En una realización preferida de acuerdo con la invención, el método para eliminar un contaminante vírico de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, en el que dicha preparación se somete a filtración durante al menos aproximadamente 24 horas a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m², se realiza como filtración continua. Este modo de funcionamiento tiene la ventaja de que el filtrado producido de la preparación puede ser directa y continuamente alimentado al proceso en el que se utiliza o se consume. En una realización más preferida, la preparación filtrada de virus, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, puede alimentar directa y continuamente un biorreactor, más preferiblemente un biorreactor de gran escala usado en un proceso de cultivo celular alimentado de forma continua, por ejemplo, un proceso de quimiostato, un proceso de perfusión o un proceso de lote alimentado. Esta realización se lleva a cabo en una realización que usa una presión de aproximadamente 1000 mbar a 2000 mbar y una temperatura de 10 °C a 40 °C, en la que la capacidad volumétrica es de al menos 2000 l/m² o al menos 5000 l/m². Además, es más preferible que la filtración de virus de la preparación se lleve a cabo durante al menos aproximadamente 24 horas o aproximadamente 48 horas hasta aproximadamente 7 meses, más preferiblemente durante al menos aproximadamente una semana hasta aproximadamente 5 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente una a aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 3 meses e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 2 a aproximadamente 3 meses. Por supuesto, todos los demás parámetros pueden combinarse con esta realización. Además, se prefiere que la preparación a filtrar sea un medio de cultivo celular y el modo de filtración sea una filtración de modo continuo.

35 Por supuesto, una persona experta en la técnica sabe que las preparaciones de filtrados de virus que se pueden obtener de acuerdo con cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención también pueden dirigirse o alimentar a otros procesos de producción relacionados con el cultivo celular; preparaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o cosméticas, así como preparaciones alimenticias. También en esas realizaciones se prefiere una filtración continua de las preparaciones.

Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular que puede obtenerse de acuerdo con cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención para el cultivo celular; preparaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o cosméticas, así como preparaciones alimenticias.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular a filtrar de virus es estéril, o se ha pretratado de otra manera. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende proteínas o suero animales u otros componentes derivados de animales, o no contiene proteínas animales, o suero, o componentes derivados de animales, o posee cualquier combinación de las características anteriores. En otras realizaciones, el medio de cultivo celular comprende hidrolizados variables en las concentraciones y en las especies de plantas o microorganismos de los que se derivan, especialmente hidrolizados de soja. En una realización preferida, el medio de cultivo celular es un medio libre de proteínas animales que comprende concentraciones variables de al menos un hidrolizado de soja. Sin embargo, se ha de destacar que el método de acuerdo con la invención es especialmente adecuado para la filtración de virus de preparaciones que comprenden proteínas o suero de origen animal u otros componentes derivados de animales a fin de mejorar aún más la seguridad virológica de las preparaciones, en particular, cuando se usa en procesos de cultivo celular, en preparaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o cosméticas, así como en preparaciones alimenticias.

60 «Medio de cultivo celular» se define, para los fines de la invención, como un medio adecuado para el crecimiento de células, y preferiblemente células animales, más preferiblemente células de mamíferos, en cultivo celular *in vitro*. Se puede usar cualquier medio capaz de soportar el crecimiento de las células adecuadas en cultivo celular. El medio de cultivo celular de acuerdo con la invención puede estar basado en cualquier medio basal tal como DMEM, F12 de Ham, Medio 199, McCoy o RPMI, generalmente conocidos por el experto. El medio basal puede comprender varios ingredientes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de hidratos de carbono, estando cada ingrediente presente en una cantidad que permite el cultivo de una célula que es generalmente

conocida para la persona experta en la técnica. El medio puede contener sustancias auxiliares, tales como sustancias tampón como bicarbonato de sodio, antioxidantes, estabilizantes para contrarrestar la tensión mecánica, o inhibidores de la proteasa. Si es necesario, puede añadirse un agente tensioactivo no iónico, tal como mezclas de polietilenglicoles y polipropilenglicoles (por ejemplo, plurónico F68.RTM, SERVA) como agente antiespumante.

5

Tal y como se usa en este documento, un «medio que comprende proteínas animales» es un medio de cultivo celular que comprende cualquier proteína que se ha derivado de un origen humano o un origen animal.

10 Tal y como se usa en este documento, un «medio libre de proteínas» es un medio de cultivo celular libre de cualquier proteína que se ha derivado de un origen humano o un origen animal.

El término «medio de cultivo celular libre de proteínas animales», de acuerdo con la invención, se refiere a un medio que no contiene proteínas y/o componentes de proteínas de eucariotas superiores pluricelulares no vegetales. Las proteínas típicas que se evitan son aquellas que se encuentran en el suero y en sustancias derivadas del suero, tales como albúmina, transferrina, insulina y otros factores de crecimiento. El medio de cultivo celular libre de 15 proteínas de origen animal tampoco contiene ningún producto purificado de derivado de animales ni productos recombinantes derivados de animales, así como digeridos de proteínas y extractos de los mismos o extractos de lípidos o componentes purificados de los mismos. Las proteínas animales y los componentes proteicos animales deben distinguirse de las proteínas no animales, pequeños péptidos y oligopéptidos que se pueden obtener a partir 20 de plantas (generalmente de 10-30 aminoácidos de longitud), tales como el haba de soja, y los eucariotas inferiores, tales como la levadura, que pueden incluirse en el medio de cultivo celular libre de proteínas de origen animal de acuerdo con la invención.

El término «hidrolizado» incluye cualquier digerido de un material derivado de origen animal o vegetal o extractos 25 derivados de levaduras o bacterias. En el medio de cultivo celular de acuerdo con la invención, «hidrolizado de soja» puede ser compuesto, pudiendo ser un hidrolizado de soja altamente purificado, un hidrolizado de soja purificado o hidrolizado de soja crudo.

El término «compuesto de suero», como se aplica al medio, incluye cualquier medio de cultivo celular que contiene 30 suero.

El término «libre de suero», como se aplica al medio, incluye cualquier medio de cultivo celular que no contiene suero. Por «libre de suero», se entiende que el medio tiene preferiblemente menos de 0,1 % de suero, y más preferiblemente menos de 0,01 % de suero. El término «suero» se refiere a la porción líquida de la sangre obtenida 35 después de la eliminación del coágulo de fibrina y células sanguíneas.

En algunas realizaciones, el filtrado o el flujo del filtrado obtenido a partir del proceso de filtración se alimenta a un cultivo celular a gran escala y a un biorreactor a gran escala respectivamente. Un cultivo celular «a gran escala», tal y como se usa en este documento, se refiere a un cultivo celular a una escala de al menos aproximadamente 100 l, 40 al menos aproximadamente 200 l, al menos aproximadamente 300 l, al menos aproximadamente 400 l, al menos aproximadamente 500 l, al menos aproximadamente 1000 l, al menos aproximadamente 1500 l, al menos aproximadamente 2000 l, al menos aproximadamente 2500 l, al menos aproximadamente 3000 l, al menos 4000 l, al menos aproximadamente 5000 l, al menos aproximadamente 7500 l, al menos aproximadamente 10.000 l o al menos aproximadamente 20.000 l. En una realización preferida, el flujo del filtrado obtenido en cualquier método de 45 acuerdo con la invención se alimenta a un biorreactor usado en un proceso de quimiostato, un proceso de perfusión o un proceso de lote alimentado, preferiblemente por filtración continua.

El cultivo celular contemplado en este documento puede ser cualquier cultivo celular, independientemente del tipo y la naturaleza de las células cultivadas y la fase de crecimiento de las células cultivadas, por ejemplo, células 50 adherentes y no adherentes; células en crecimiento o células de crecimiento detenido.

El término «estéril», tal y como se usa de acuerdo con la invención, se refiere a una sustancia libre, o esencialmente libre, de contaminación microbiana y/o vírica. A este respecto, el «contaminante» significa un material que es diferente de los componentes deseados en una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un 55 componente de un medio de cultivo celular. En el contexto de «filtración estéril», el término filtración estéril es una descripción funcional en la que una preparación se filtra a través de un filtro estéril para eliminar los contaminantes bacterianos y/o por micoplasmas.

El término «filtración de virus» se usa en este documento de manera intercambiable con el término «nanofiltración» y 60 significa que para el proceso de filtración se usa un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo definido. En general, estos filtros se dedican a eliminar virus.

El contaminante vírico que es el objetivo de la eliminación por filtración de acuerdo con todos los métodos de la invención puede ser cualquier virus conocido actualmente en la técnica o que se descubrirá en un futuro. Esta 65 definición también incluye un contaminante potencialmente vírico a eliminar por filtración e incluye también que se elimine más de un virus por los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el contaminante vírico o

contaminante potencialmente vírico puede ser un miembro de las familias víricas Orthomyxoviridae, Arenaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Arteriviridae, RetParvoviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Retroviridae, Reoviridae, Circoviridae, Adenoviridae, Poxviridae, Herpesviridae, Iridoviridae o Reoviridae. Más específicamente, el contaminante vírico puede ser cualquiera del grupo

5 que compuesto por parvoviridae canino (PVC), virus diminuto del ratón (VDR), virus del Valle de Cache, virus Bunyamwera, virus Northway de la encefalitis, virus de la gripe A y B, virus Junín, virus parainfluenza 1/2/3, virus de simio 5, virus de las paperas, virus respiratorio sincitial bovino, virus Sendai, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la neumonía murina, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, coronavirus bovino, virus de la hepatitis murina, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus del dengue, virus de la encefalitis por

10 garrapatas, virus de la Encefalitis de San Luis, Vesivirus 2117, virus de la encefalomiocarditis, del virus Coxsackie B-3, virus de la encefalomiелitis murina de Theiler, virus de la fiebre aftosa, enterovirus bovino, enterovirus porcino, virus del bosque de Semliki, virus Sindbis, virus de la rubeola, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis equina del Este, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus espumoso, reovirus 1/2/3, reovirus aviar, rotavirus, circovirus porcino 1, adenovirus, virus de la pseudorabia, gammaherpesvirus murino 68, virus del herpes simple tipo 1, virus de la rana tipo 3, virus diminuto del ratón-Cutter (MVMc), virus de la lengua azul (VLA),

15 virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE), virus diarrea viral bovina (VDVB), parvovirus porcino (PVP), virus de la encefalomiocarditis (VEMC), reovirus tipo 3, y virus de la leucemia murina (VLMu), hepatitis A, polio o parvovirus B19.

20 El término «filtro de virus», se usa de manera intercambiable en este documento con los términos «filtros de retención de virus», «filtro vírico» y «nanofiltro», y se refiere en general a un filtro cuyas características en conjunto hacen que sea adecuado para la retención de virus y que tiene un tamaño de poro efectivo para cumplir esta función. Estas características incluyen, a modo de ejemplo, atributos de membrana tales como morfología, forma de poros, densidad y uniformidad de poros, tamaño de poro efectivo, espesor de la membrana, etc. Las membranas de

25 filtro de virus útiles en la presente invención abarcan las membranas que funcionan por exclusión de tamaño y carga, posiblemente en combinación con la retención por adsorción. La exclusión de tamaño y los mecanismos de retención por adsorción no son necesariamente exclusivos entre sí y un filtro bien puede emplear uno o más mecanismos.

30 El filtro de virus, tal como se define en la presente invención y se usa en una realización de la presente invención, se caracteriza por tener una membrana con un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm. En una realización de acuerdo con la invención, el límite inferior del tamaño de poro efectivo es de aproximadamente 5 nm, aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 30 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 50 nm o aproximadamente 60 nm. En dicha

35 realización de acuerdo con la invención, el límite superior del tamaño de poro efectivo es de aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm o aproximadamente 75 nm. En algunas realizaciones de la invención, el filtro de virus tiene un tamaño de poro efectivo de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nm o de

40 aproximadamente 20 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nm.

El tamaño de poro efectivo, tal y como se usa en este documento, es una característica de una membrana y se refiere al tamaño de una partícula que puede ser retenida eficazmente por la membrana, considerando que el nivel

45 de eficacia se describe por un factor de reducción logarítmica de una partícula de tal tamaño.

El filtro de virus usado en los métodos de la presente invención puede ser cualquier filtro que tenga una construcción suficiente para resistir una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m², o al menos aproximadamente 3000 l/m², o al menos aproximadamente 4000 l/m² o al menos aproximadamente 5000 l/m², o al

50 menos aproximadamente 7500 l/m², o al menos aproximadamente 10.000 l/m² o al menos aproximadamente 20.000 l/m², o que puede ser operado durante un periodo de tiempo de más de aproximadamente 24 horas hasta cerca de 7 meses o preferiblemente durante al menos aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4

55 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses o aproximadamente 7 meses.

Por supuesto, si se usa más de un filtro en un método de acuerdo con la invención, también pueden usarse y combinarse diferentes tipos de filtros de virus en el proceso de filtración, preferiblemente en paralelo o en serie.

60

Los filtros modelos de virus comprenden una membrana de una o múltiples capas y están contruidos de un material tal como fluoruro de polivinilideno (PVDF), celulosa, celulosa modificada, por ejemplo, fibras huecas de celulosa regenerada cuproamoniaca o polietersulfona. Las membranas de los filtros de virus pueden tener una carga neutra, negativa o positiva. Las membranas pueden ser membranas iónicas, es decir, pueden contener grupos catiónicos o

65 aniónicos, pero las membranas neutras pueden preferirse en función de las condiciones de pH. Las membranas de filtro de virus pueden seleccionarse entre las membranas hidrófobas e hidrófilas. En una realización preferida, la

membrana del filtro de virus usada en el método de acuerdo con la invención está hecha de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o de polietersulfona.

Entre los fabricantes de filtros modelos que han demostrado capacidad para eliminar virus se incluyen, sin exclusión, 5 Asahi/Planova, Pall, Millipore, Sartorius, Gambro y Amersham/AG Technology. Los filtros adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, el filtro Asahi Planova 15 N (Asahi Kasei Corporation, Planova Division), el filtro Planova 20 N (Asahi Kasei Corporation, Planova Division), el filtro Planova 35 N (Asahi Kasei Corporation, Planova División) y el filtro BIOEX (Asahi Kasei Corporation, Planova Division).

- 10 Por supuesto, es deseable que el filtro que se use en uno de los métodos de la presente invención sea esterilizable en autoclave y/o esterilizado en autoclave y/o esterilizado de otra manera antes de su uso. Sin embargo, todas las otras posibilidades para asegurar la esterilidad del filtro de virus usado son adecuadas para llevar a cabo la invención. Además, es deseable que se pueda probar la integridad del filtro antes de usarlo y/o después de usarlo. En una realización preferida, en el método de acuerdo con la invención se usa un filtro de virus esterilizado en autoclave y de integridad probada, que tiene una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o de polietersulfona.

«Filtrado», usado en este documento de manera intercambiable con el término «permeado», se refiere a la solución que atraviesa un filtro o membrana, así como a la solución que ha atravesado un filtro o membrana.

- 20 «Retenido», tal y como se usa en este documento, se refiere al componente de la solución que se retiene y no cruza un filtro o membrana, así como al que no ha cruzado un filtro o membrana.

- El equipo de filtración de virus útil en la presente invención comprende al menos un elemento de membrana de filtración de virus que divide la alimentación en una sección de prefiltro y posfiltro. El equipo de filtración también incluye normalmente medios para controlar la presión y el flujo, tales como bombas y válvulas y medidores de flujo y de presión y medidores de densidad. El equipo también puede incluir varios elementos de membrana de filtración en diferentes combinaciones, dispuestos en paralelo o en serie o de las dos maneras.

- 30 El flujo de filtración varía de acuerdo con la presión. En general, en un intervalo de funcionamiento normal, a mayor presión, mayor será el flujo. El flujo también varía con la temperatura. Un aumento de la temperatura de funcionamiento aumenta el flujo. Sin embargo, con temperaturas más altas y con presiones más altas hay una mayor tendencia a una rotura de la membrana. Para las membranas inorgánicas, pueden usarse temperaturas y presiones mayores e intervalos de pH más altos que para las membranas poliméricas.

- 35 Para una persona experta en la técnica es inequívocamente evidente que, en lugar de un filtro de virus de acuerdo con la invención, se puede usar un filtro que tenga un peso molecular de corte de menos de aproximadamente 5000 Daltons o de menos de aproximadamente 1000 Daltons con el fin de eliminar también virus. En este contexto, el «peso molecular de corte» (MWCO) es una característica de la membrana de un filtro que especifica el peso molecular medio de solutos, sin embargo, las partículas o virus tampoco permearán la membrana de este filtro.

- El valor de pH en el proceso de filtración de virus de la presente invención se puede ajustar en cualquier intervalo necesario para preservar la estabilidad y la funcionalidad de la preparación que se filtra, preferiblemente un medio de cultivo celular o tampón. Por ejemplo, el valor de pH puede ajustarse de aproximadamente 1 a aproximadamente 45 10, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, preferiblemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 8 o más preferiblemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,45 (valor de pH fisiológico).

- También se contempla que el método de acuerdo con la invención puede integrarse en un sistema aguas abajo de 50 un filtro de grado esterilizante que elimina contaminante bacteriano y por lo tanto producen una corriente de alimentación de una preparación estéril que puede ser la «preparación de partida», es decir, la preparación que se usa en cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención.

- En una realización, el método de la invención puede realizarse usando dos o más filtros dispuestos en serie. Esto 55 tiene la ventaja de aumentar la capacidad de eliminación de virus y la salvaguardia contra un fallo o ruptura potenciales del filtro de virus. En realizaciones alternativas, la filtración se realiza usando dos o más filtros de virus dispuestos en paralelo, lo que permite la sustitución del filtro de virus sin interrumpir un proceso continuo y evita retenciones imprevistas del medio, por ejemplo, debido a una obstrucción.

- 60 En otras realizaciones, la filtración se realiza usando al menos dos filtros dispuestos en paralelo en un sistema de tuberías que comprende una unión en forma de Y, en el que cada filtro está en comunicación de fluido con una rama de la unión en forma de Y y una fuente de suministro de preparación. En algunas realizaciones, la unión en forma de Y comprende un conector. En otras realizaciones, la filtración se realiza usando una configuración que contiene una pluralidad de filtros dispuestos tanto en serie como en paralelo. Especialmente útil en el contexto de la presente 65 invención es una disposición en la que al menos un segundo filtro está dispuesto en paralelo en conexión con otros

filtros paralelos o filtros dispuestos en serie con el fin de tener la posibilidad de reemplazar uno de los filtros sin detener el proceso de filtración por razones de mantenimiento.

En algunas realizaciones, el filtro se somete a una prueba de integridad antes de usarlo. La prueba de integridad puede ser en forma de una prueba basada en la difusión de aire-agua, en la que el aire se dirige al filtro y el filtro se sumerge luego en agua estéril y se examina para detectar burbujas, lo que indicaría una fuga en el filtro.

En una realización, el filtro de virus o la membrana del filtro de virus pueden pretratarse antes del procedimiento de filtración de virus, por ejemplo, lavándolos con un agente de lavado, en particular, con un agente de lavado ácido, un agente de lavado alcalino y/o etanol.

En una realización de la invención, también se puede realizar en el método de acuerdo con la invención una filtración de flujo tangencial. En el contexto de la presente invención, «filtración de flujo tangencial», se usa en este documento de manera intercambiable con el término «filtración de flujo cruzado». En el modo de flujo tangencial, la trayectoria de flujo del líquido en el lado aguas arriba del filtro se dirige más o menos en paralelo o tangencialmente o a través de la superficie del filtro. El paso del permeado se facilita mediante la restricción del flujo de retenido con respecto a la alimentación, lo que resulta en una contrapresión en el sistema y permitiendo la migración del permeado a través de la membrana del filtro. La corriente de barrido constante a través de la superficie de la membrana tiene el efecto de minimizar la obstrucción por contaminantes en el producto que se filtra. Es adecuado cualquier filtro de virus que alcance al menos un valor de reducción de 1 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 2 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 3 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 5 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 6 Log₁₀ para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 7 Log₁₀ para un contaminante vírico, o por lo menos un valor de reducción del 8 Log₁₀ para un contaminante vírico, preferentemente al menos un valor de reducción de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico. Todos los factores de reducción logarítmica pueden servir para cualquiera de los tamaños de poro efectivos de máximo 75 nm del filtro de virus. En una realización de acuerdo con la invención, el límite inferior del tamaño de poro efectivo del filtro de virus es de aproximadamente 5 nm, aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 30 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 50 nm o aproximadamente 60 nm. En dicha realización de acuerdo con la invención, el límite superior del tamaño de poro efectivo del filtro de virus es de aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm o aproximadamente 75 nm. En algunas realizaciones de la invención, el filtro de virus tiene un tamaño de poro efectivo de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 20 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nm.

En algunas realizaciones de la presente invención se usa filtración de flujo normal. «Filtración de flujo normal», utilizada en este documento de manera intercambiable con los términos «sin salida», «paso único» y «filtración de flujo directo», se refiere a un proceso de filtración con filtro de virus en el que la trayectoria de flujo del líquido se dirige por lo general perpendicularmente a la superficie del filtro, dependiendo de la construcción del módulo de filtro la corriente de fluido también podría dirigirse tangencialmente a la membrana del filtro, sin embargo, en contraste con la filtración de flujo cruzado, no se aplica recirculación del retenido, lo que significa que el caudal específico antes y después del filtro es idéntico. Es adecuado cualquier filtro de virus que alcance al menos un valor de reducción de 1 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 2 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 3 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 5 v (LRV) para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 6 Log₁₀ para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 7 Log₁₀ para un contaminante vírico, o al menos un valor de reducción de 8 Log₁₀ para un contaminante vírico, preferentemente al menos un valor de reducción de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico. Todos los factores de reducción logarítmica pueden servir para cualquiera de los tamaños de poro efectivos de máximo 75 nm del filtro de virus. En una realización de acuerdo con la invención, el límite inferior del tamaño de poro efectivo del filtro de virus es de aproximadamente 5 nm, aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 30 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 50 nm o aproximadamente 60 nm. En dicha realización de acuerdo con la invención, el límite superior del tamaño de poro efectivo del filtro de virus es de aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm o aproximadamente 75 nm. En algunas realizaciones de la invención, el filtro de virus tiene un tamaño de poro efectivo de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 20 a aproximadamente 75 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nm o de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nm.

Como los expertos ordinarios en la técnica apreciarán, todas las realizaciones de la invención se pueden implementar con la ayuda de cualquier sistema disponible técnicamente útil para el propósito, por ejemplo, una

bomba peristáltica de velocidad variable o de velocidad fija, una bomba centrífuga, etc. Se puede usar cualquier tipo de recipiente o contenedor a presión para generar flujo a través del filtro de virus con una presión constante o variable durante el proceso de filtración.

- 5 Los expertos ordinarios en la técnica apreciarán que la elección del tipo y el modo de filtro (filtración sin salida o filtración de flujo tangencial) dependerá de factores tales como la composición, el contenido de proteínas, la distribución del peso molecular, la carga de impureza/carga o cualquier otra propiedad bioquímica o física en la alimentación a procesar, los requisitos del proceso y las limitaciones (presión permisible, tiempo de proceso, volúmenes a filtrar) o las características del contaminante vírico potencial, por ejemplo, el tamaño de los virus. La
- 10 disponibilidad de una prueba de integridad durante el proceso y la logística de estudios de limpieza vírica también deben tenerse en consideración. La filtración sin salida, normalmente, se debe emplear para que las corrientes de alimentación de alta pureza produzcan un flujo de proceso razonable, mientras que, en algunas realizaciones, la filtración de flujo tangencial puede acomodar las corrientes de alimentación con carga de partículas alta. En algunas realizaciones preferidas, se prefiere la filtración de flujo normal en combinación con un modo continuo de filtración
- 15 usando al menos un filtro de virus que tenga un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm. Por supuesto, también esta realización se puede combinar con todos los demás parámetros de la presente invención.

- Por supuesto, ha de entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, pues tales pueden, por supuesto, variar. Ha de entenderse también que la terminología usada en este documento tiene el
- 20 propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

- Quando se indica un intervalo de valores, se entiende que está incluido dentro de la invención cada valor comprendido en el intervalo, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique
- 25 claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o comprendido en ese intervalo. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden, de manera independiente, estar incluidos en los intervalos más pequeños, y la invención también los incluye, sujeto a cualquier límite específicamente excluido del intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyan cualquiera o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la
- 30 invención.

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos
- 35 en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales ilustrativos representativos.

- Todas las publicaciones y patentes citadas en esta especificación se incorporan en este documento por referencia como si cada publicación o patente estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada por
- 40 referencia, y se incorporan en este documento por referencia para revelar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales las publicaciones se citan. La citación de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una aceptación de que la presente invención no está en su derecho de antedatar tal publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales, que pueden exigir una confirmación
- 45 independiente.

- Cabe destacar que, tal y como se usan en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cabe destacar, asimismo, que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional.
- 50 Como tal, esta declaración pretende servir como base de antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como «únicamente», «solamente» y similares en relación con la recitación de elementos de la reclamación, o el uso de una limitación «negativo».

- Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones
- 55 individuales descritas e ilustradas en este documento tiene componentes y características discretos que pueden separarse fácilmente a partir de o en combinación con las características de cualquiera de las otras realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método recitado puede llevarse a cabo en el orden de los acontecimientos recitados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

60 EJEMPLOS

A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no están destinados a limitar la presente invención a cualquier aplicación particular o teoría de operación particular.

- 65 Ejemplo 1: Reducir la filtración de virus con diferentes filtros de virus y medios de cultivo celular

Se evaluó la cinética de filtración de las membranas de filtración de virus de fabricantes diferentes (véase la tabla 2) para diferentes tamaños de filtro con medios de cultivo celular que contenían hidrolizados de soja de diferentes lotes y proveedores (véase la tabla 3) a una concentración de 4 g/l. La composición y preparación de los medios de cultivo celular se describen en el ejemplo 2. Se llevaron a cabo experimentos de filtración ya fuera mediante el control de la presión con un recipiente a presión (fig. 3, fig. 4, fig. 5 y experimentos de adición en la fig. 7, fig. 8 y fig. 9) o mediante el control de caudal, por ejemplo, mediante una bomba peristáltica (fig. 1, fig. 2, fig. 3 y fig. 6). En la tabla 4 se describen otros equipos usados para el control de la temperatura y la presión de los experimentos.

Tabla 2: Lista de filtros de virus

10

Código interno de filtros en figuras/ejemplos	Fabricante/Nombre del producto/tamaño
Filtro A	Sartorius Viosart CPV 180 cm ²
Filtro B	Millipore Viresolve NFP 3,1 cm ²
Filtro C	Pall Ultipor VF grade DV20 700 cm ²
Filtro D	Asahi BioEX 10 cm ²
Filtro E	Sartorius Viosart CPV 2000 cm ²
Filtro F	Millipore Viresolve NFP 850 cm ²
Filtro G	Asahi 15 N 10 cm ²
Filtro H	Pall Ultipor VF grade DV20 9,6 cm ²
Filtro I	Sartorius Viosart CPV 5 cm ²

Tabla 3: Lista de hidrolizados de soja

Código interno de hidrolizados de soja en figuras/ejemplos	Fabricante/Nombre del producto/número de lote interno
Hidrolizado de soja 1	Kerry HyPep 1510 n.º 1
Hidrolizado de soja 2	DOMO SE50 MAF UF n.º 1
Hidrolizado de soja 3	DOMO SE50 MAF UF n.º 2
Hidrolizado de soja 4	DOMO SE50 MAF UF n.º 3
Hidrolizado de soja 5	Kerry HyPep 1510 n.º 2
Hidrolizado de soja 6	DOMO SE50 MAF UF n.º 4
Hidrolizado de soja 7	DOMO SE50 MAF UF n.º 5

15

Tabla 4: Lista de equipos

WM de marpreno calibre mm x pared mm 3,2 x 1,6 y 1,6 x 1,6 (Watson Marlow)
Bombas peristálticas Watson Marlow 101 U/R (Watson Marlow)
Recipientes de presión Sartorius Modelo 17532 (Sartorius-Stedim)
Transductores de presión: Pascal Ci CL1010 (Labom) y KrosFlo ACPM-499-03N (Spectrum Labs)
Balanza Sartorius FBG64EDE-SOCE (Sartorius Stedim)
Baño de agua Haake DC10 (Thermo Scientific)
Sensor de temperatura CEM IR-68 Termómetro infrarrojo flexible

Ejemplo 2: Preparación del medio de cultivo celular

20

En la tabla 5 más abajo se proporciona una descripción general de la composición del medio de cultivo celular, con la composición de los diferentes hidrolizados de soja listados en la tabla 3 más arriba. Los diferentes lotes de medios de cultivo celular se filtraron de forma estéril con un filtro de grado esterilizante, por ejemplo, un cartucho de filtro de membrana de 0,1 µm Pall Fluorodyne® II DJL antes de las diferentes filtraciones de virus descritas en los ejemplos.

25 Las preparaciones de medios descritas aquí se usaron para todos los experimentos descritos y mostrados en las fig. 1 a fig. 11.

Tabla 5: Composición de medios

Componente	Concentración [g/kg]
DMEM/Hams F12	11,76
Etanolamina	0,00153
Lutrol F68	0,25
Hidrolizado de soja	4,0
Oligoelemento - solución madre	Máx. 4 µg/l
L-glutamina	0,6
NaHCO ₃	2,0

Agua purificada	Ad 1 kg
-----------------	---------

Ejemplo 3: Preparación del filtro:

- 5 Los filtros de virus se prepararon de acuerdo con los manuales de los productos de los fabricantes de filtros de virus. Los filtros se esterilizaron en autoclave a $>121^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, a menos que los filtros se entregaran y montaran de forma estéril.

Ejemplo 4: Prueba de integridad

- 10 Después de usarlos, los filtros de tamaño apropiado (filtros A, C, E y F de la tabla 2) se lavaron de acuerdo con las recomendaciones del respectivo fabricante. Se realizó una prueba de flujo de avance con Palltronic Flowstar XC (Pall, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Todas las pruebas de integridad realizadas después de los experimentos de filtración descritos en este documento cumplen los límites especificados.

- 15 Ejemplo 5: Relación proporcional entre la presión diferencial y el flujo

Para investigar la relación entre la diferencia de presión y el caudal volumétrico, el medio de cultivo celular se sometió a filtración a temperatura ambiente usando filtros de virus esterilizados en autoclave. Se introdujo el medio en un recipiente de presión y se conectaron los filtros de virus al recipiente de presión, que luego se presurizó a diferentes niveles. Los caudales específicos y las presiones diferenciales se midieron con una balanza y un transductor de presión y se registraron en el tiempo (fig. 3).

Ejemplo 6: Modelo de sistema de fermentación de escalamiento descendente de 10 l

- 25 Se realizó una comparación de los medios de cultivo celular con y sin filtración de virus usando un sistema de fermentación de células CHO para la expresión de proteínas recombinantes (fig. 6). Se investigó el rendimiento con respecto a la tasa de crecimiento y las producciones. Se preparó medio de cultivo celular como se describe en el ejemplo 2. Una parte del experimento se llevó a cabo solamente con medio de filtrado y estéril, mientras que la otra parte se llevó a cabo con el mismo medio y una filtración de virus adicional utilizando un Sartorius Virosart CPV 180 cm^2 . La filtración se llevó a cabo a $2-8^{\circ}\text{C}$. El experimento de fermentación se llevó a cabo en biorreactores de mesa tipo Rushton de 10 l de tanque agitado con pH, pO_2 y temperatura controlados en línea. Los puntos de ajuste de parámetros y los rangos para la fermentación fueron los siguientes:

- 35 pH: 7,05 (6,8-7,3)
T: $37,0^{\circ}\text{C}$ ($35-39^{\circ}\text{C}$)
OD: 20 % (saturación de aire) (10-60 %)

Las células se cultivaron en modo por lotes seguido de un cultivo en quimiostato usando los medios con y sin filtración de virus adicional. Los datos del modo del quimiostato (tasas de crecimiento y productividad) se generaron a partir de un cultivo celular continuo de 4 semanas. Los recuentos de células se determinaron por medición CASY. En el cultivo en quimiostato, la tasa de crecimiento específico (μ) se calculó por:

$$\mu = D + \ln(X_{t1}/X_{t0}) / (t_1 - t_0)$$

- 45 donde D es la tasa de dilución, calculada como la relación entre tasa de alimentación de medio por día y el volumen de trabajo [1/d]. Las tasas de crecimiento se calcularon a partir de recuentos de células homogeneizados CASY.

Para el análisis bioquímico, la suspensión homogénea se centrifugó a 400 g en una multifuga Heraeus 1 S-R durante 10 minutos y se prepararon alícuotas de 1,0 ml en tubos Eppendorf y se almacenó a $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Se analizaron los sobrenadantes libres de células para la actividad de una proteína recombinante expresada mediante un ensayo cromogénico de acuerdo con los procedimientos de operación estándar.

La productividad volumétrica P en este experimento se calculó por:

$$P [\text{U} / (\text{L} \times \text{d})] = \text{Actividad} [\text{mU/ml}] \times \text{tasa de dilución} [\text{d}^{-1}]$$

- 55 La productividad específica celular qP se calculó por:

$$qP [\text{mU} / (\text{células } 10\text{E}06 \times \text{d})] = P [\text{U} / (\text{L} \times \text{D})] / \text{recuento celular} [\text{células } 10\text{E}06/\text{ml}]$$

- 60 Ejemplo 7: Modelo de sistema de fermentación de escalamiento descendente de 120 l

Se investigó una técnica de filtración de virus continua realizada en un volumen de trabajo de 120 l de los medios antes de su adición a un sistema de fermentación de células CHO para la expresión de proteínas recombinantes con respecto a su efecto sobre la tasa de crecimiento y las producciones (fig. 6A, fig. 6B y fig. 6C). El estudio comparó los procesos de producción que utilizan tres variaciones de los mismos medios de cultivo celular: a) medios estándar; b)

medios estándar filtrados usando filtros de virus Virosart CPV; y c) medios estándar filtrados utilizando filtros de virus Millipore Viresolve NFP.

Durante el proceso de producción continua, se usaron alternativamente para diferentes intervalos de tiempo los dos filtros de virus diferentes (Virosart CPV Midicap de 2000 cm² de tamaño y Millipore Viresolve NFP de 850 cm² de tamaño). El filtro Sartorius CPV se usó desde el día de cultivo K00-K14, K23-K30 y K39-K63 y el filtro Millipore NFP se utilizó desde el día de cultivo K14-K23 y K30-K39.

Los puntos de ajuste de parámetros y los rangos para la fermentación fueron los siguientes:

10 pH: 7,05 (6,8-7,3)
 T: 37,0 °C (35-39 °C)
 OD: 20 % (saturación de aire) (10-60 %)

Muestreo y análisis

15 Los recuentos celulares se determinaron mediante el contador de células y sistema analizador CASY®. Para el análisis bioquímico de la suspensión homogénea se centrifugó a 400 g en una multífuga Heraeus 1 S-R (Thermo Scientific, EE. UU.) durante 10 minutos. Se analizaron los sobrenadantes libres de células para la actividad de una proteína recombinante expresada mediante un ensayo cromogénico.

En el cultivo en quimiostato, la tasa de crecimiento específico (μ) se calculó por:

$$20 \quad \mu = D + \ln (X_{t1}/X_{t0}) / (t_1 - t_0)$$

donde D es la tasa de dilución, calculada como la relación entre tasa de alimentación de medio por día y el volumen de trabajo [1/d]. Las tasas de crecimiento se calculan a partir de recuentos de células homogeneizadas CASY.

25 La productividad volumétrica P en este experimento se calculó por:

$$P [U / (L \times d)] = \text{Actividad [mU/ml]} \times \text{tasa de dilución [d}^{-1}]$$

30 La productividad específica celular qP se calculó por:

$$qP [mU / (\text{células } 10E06 \times d)] = P [U / (L \times D)] / \text{recuento celular [células } 10E06/\text{ml}]$$

Ejemplo 8: Filtración de virus con filtros de virus ASAHI Planova 15N

35 Los medios que contienen hidrolizado de soja (DOMO SE50 MAF N.º 5) se enriquecieron con MMV y se colocaron en un depósito conectado a un suministro de gas nitrógeno a presión. El material enriquecido con MMV se pasó a través de un filtro de virus de 10 cm² ASAHI Planova 15N instalado en línea en un modo sin salida a una presión constante de 1100 mbar (punto de ajuste). Los valores mínimos y máximos de los parámetros siguientes se midieron y registraron de forma continua: presión de alimentación; temperatura de alimentación, del filtrado y ambiente y peso del filtrado (el cambio de este se utilizó para calcular el caudal de filtrado). Se tomaron muestras diariamente durante hasta 7 días y se analizaron para determinar el título de virus MMV (fig. 7).

Ejemplo 9: Filtración de virus con filtros de virus ASAHI Planova BIOEX

45 Los medios que contienen hidrolizado de soja (serie n.º 1 con hidrolizado de soja DMV SE50 MAF UF n.º 5); serie n.º 2 con hidrolizado de soja SDMV SE50 MAF UF n.º 4) se enriquecieron con MMV y se colocaron en un depósito conectado a un suministro de gas nitrógeno a presión. El material enriquecido con MMV se pasó a través de un filtro de virus de 10 cm² ASAHI Planova BIOEX instalado en línea en un modo sin salida a una presión constante de 2000 mbar (punto de ajuste). Los valores mínimos y máximos de los parámetros siguientes se midieron y registraron de forma continua: presión de alimentación; temperatura de alimentación, del filtrado y ambiente y peso del filtrado (el cambio de este se utilizó para calcular el caudal de filtrado). Se tomaron muestras diariamente durante 5 días y se analizaron para determinar el título de virus MMV (fig. 8).

55 Ejemplo 10: Resumen de la filtración de virus

Los medios de cultivo celular que contienen diferentes hidrolizados de soja se enriquecieron con MMV y se colocaron en un depósito conectado a un suministro de gas nitrógeno a presión. Los diferentes filtros de virus se usaron en combinación con los diferentes hidrolizados de soja como se indica en la tabla 6:

60 Tabla 6: Combinación de filtros de virus e hidrolizados de soja usados en experimentos de adición

Experimento n.º	Filtro	Lote de hidrolizado de soja	Tiempo de ejecución [días]
1	D	7	5
2	D	6	5
3	I	3	19

4	I	5	17
5	G	7	7
6	G	7	6
7	B	6	14
8	H	3	11

Las filtraciones se configuraron en un modo sin salida a una presión constante de 2 bar (punto de ajuste) para todas las series excepto para las series de los experimentos 5 y 6 que se realizaron a una presión constante de 1,1 bar (punto de ajuste). Los valores mínimos y máximos de los parámetros siguientes se midieron y registraron de forma continua: presión de alimentación; temperatura de alimentación, del filtrado y ambiente y peso del filtrado (el cambio de este se utilizó para calcular el caudal de filtrado). Se tomaron muestras durante el tiempo de ejecución del experimento y se analizaron para determinar el título de virus MMV. Las reducciones logarítmicas globales se calcularon a partir de la diferencia entre la carga total de infectividad del virus en el filtrado y la carga total de infectividad del virus antes de la filtración (fig. 9).

Ejemplo 11: Filtración de larga duración con adición de virus MMV

El medio de cultivo celular como se describe en el ejemplo 2 se enriqueció con MMV a un título de 5,0 [$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$] y se sometió a una filtración de larga duración de 30 días a través de un filtro vírico con un tamaño de poro de 20 nm (Sartorius Visrosart CPV 5 cm^2). La filtración se llevó a cabo con una configuración comparable a la del ejemplo 9 y el ejemplo 10, pero con una presión constante de 1,1 bar (intervalo especificado: de 0,8 bar a 1,2 bar) y con interrupciones regulares de presión y de flujo para poner a prueba al filtro vírico. Se registraron los caudales en el curso del experimento y se mantuvieron por encima de 4 $\text{l}/(\text{m}^2 \times \text{h})$ (figura 10).

Se tomaron 20 muestras de filtrado (hasta 5 veces por semana) y se determinó el título y la carga de virus MMV. No se observó entrada de virus en ninguna de las 20 fracciones ensayadas. Las cargas de virus variaron de $< 0,9$ [$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50})$] a $< 2,8$ [$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50})$] dependiendo del volumen de fracción. La carga total de virus en los filtrados fue $< 3,0$ [$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50})$], que, cuando se resta de la carga de virus inicial del material añadido (es decir, 8,5 [$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50})$]), resulta en un factor de reducción global de virus $> 5,5 \text{ Log}_{10}$. Esto se consideró eficaz y completo (figura 11).

REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar un contaminante vírico de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular, que comprende el paso de:
5 a) someter dicha preparación a filtración durante al menos aproximadamente 24 horas a través de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m².
- 10 2. Uso de un filtro de virus que tiene un tamaño de poro efectivo de máximo 75 nm y una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 2000 l/m² en una filtración durante al menos 24 horas para la eliminación de contaminante vírico de una preparación, que es un medio de cultivo celular o al menos un componente de un medio de cultivo celular.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la filtración funciona a una capacidad volumétrica de al menos aproximadamente 3000 l/m², preferiblemente al menos aproximadamente 5000 l/m².
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha preparación se somete a filtración durante al menos aproximadamente 48 horas hasta aproximadamente 7 meses y preferiblemente
20 aproximadamente 72 horas hasta aproximadamente 3 meses.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, que comprende además el paso de:
b) alimentar el filtrado a un cultivo celular o a otros componentes que también son componentes de un medio de
25 cultivo celular.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la filtración es una filtración continua.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la filtración se realiza a una
30 temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C, preferiblemente aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, más preferiblemente aproximadamente 15 °C a aproximadamente 37 °C.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho filtro de virus alcanza al menos un valor de reducción de 1 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico, preferiblemente al menos un valor de reducción
35 de 4 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico y más preferiblemente al menos un valor de reducción de 6 Log₁₀ (LRV) para un contaminante vírico.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cuando la filtración se realiza usando dos o más filtros dispuestos en serie, en paralelo o una mezcla de ambos.
- 40 10. El método de la reivindicación 8, en el que la filtración se realiza usando dos filtros dispuestos en paralelo en un sistema de tubos que comprenden una unión en forma de Y y en el que cada filtro está en comunicación de fluido con una rama de la unión en forma de Y y una fuente de suministro de preparación.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la filtración se realiza a una presión que varía de aproximadamente 100 mbar a aproximadamente 4000 mbar, preferiblemente de aproximadamente 100 mbar a aproximadamente 3500 mbar, más preferiblemente de aproximadamente 1000 mbar a aproximadamente 3000 mbar.
- 50 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho filtro de virus es esterilizable en autoclave.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el medio de cultivo celular comprende hidrolizado de soja.
55

Figura 1A

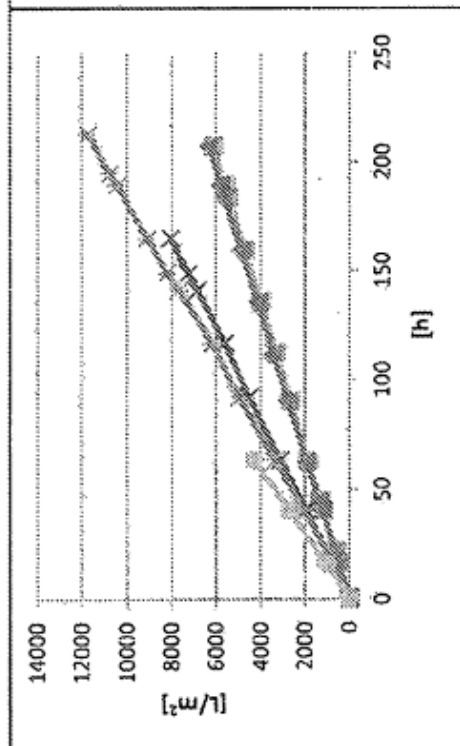


Figura 1B

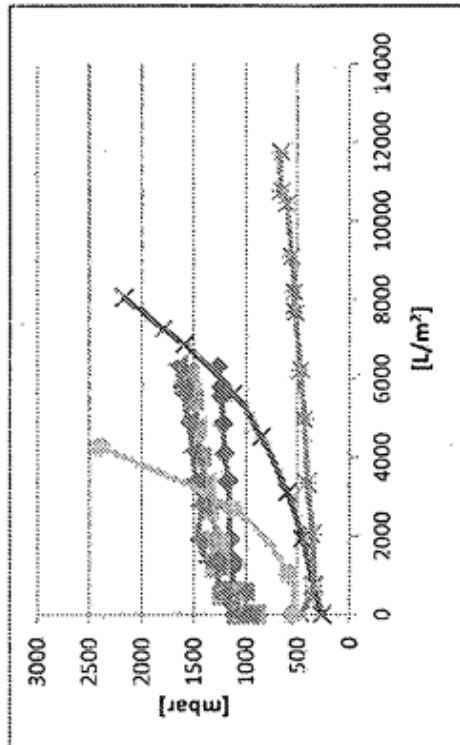
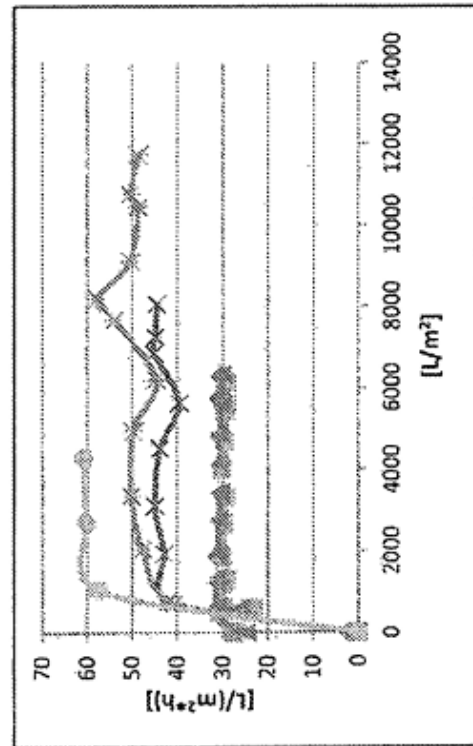


Figura 1C



- Filtro A Hidrolizado de soja
- Filtro A Hidrolizado de soja
- ▲ Filtro A Hidrolizado de soja
- ✕ Filtro A Hidrolizado de soja
- ▼ Filtro A Hidrolizado de soja
- ✕ Filtro A Hidrolizado de soja

Figura 2A

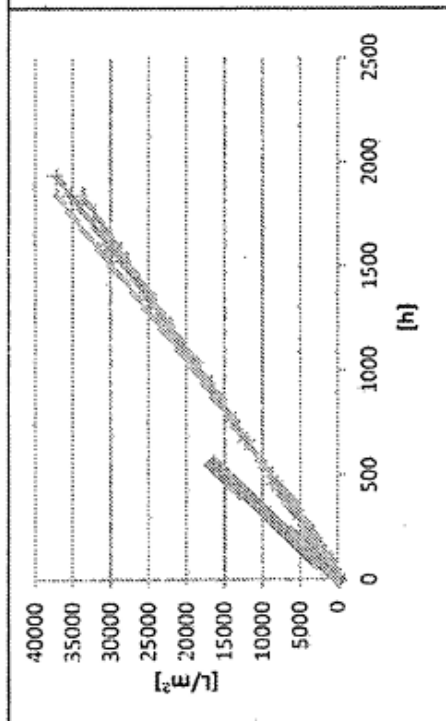


Figura 2B

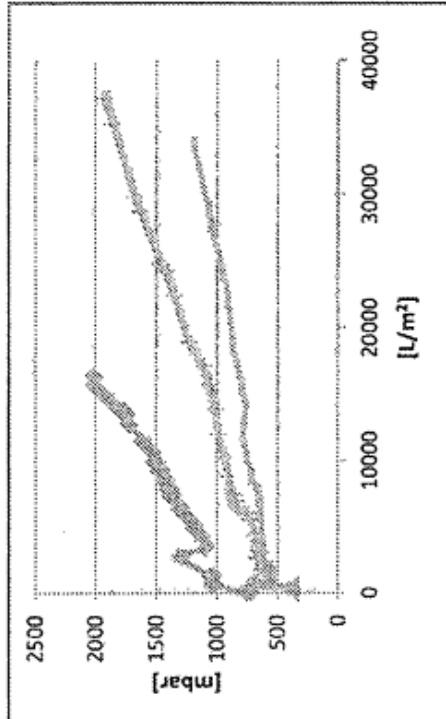
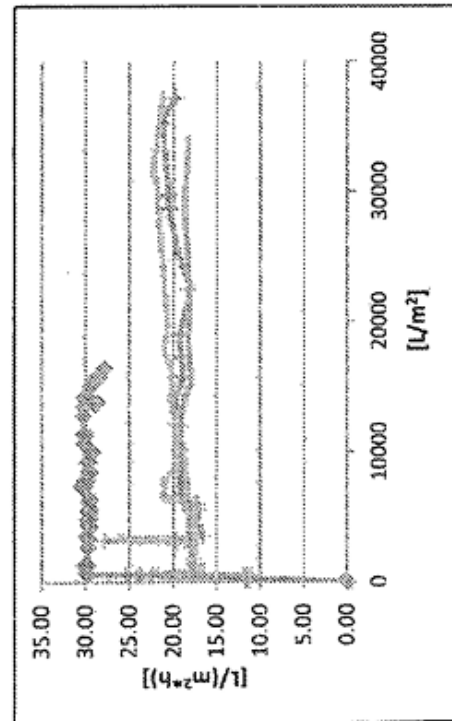
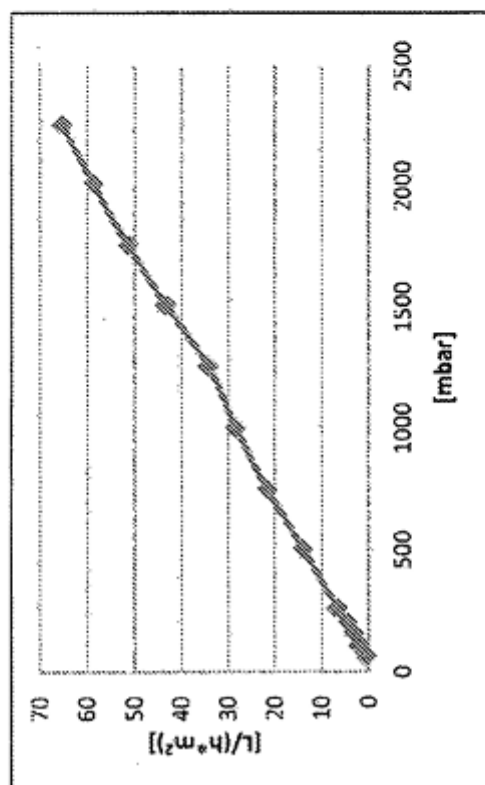


Figura 2C



- Filtro D Peptona 1
- Filtro D Peptona 2
- Filtro D Peptona 3
- Filtro A Peptona 3

Figura 3



Filtro A Hidrolizado de soja 3

Figura 4A

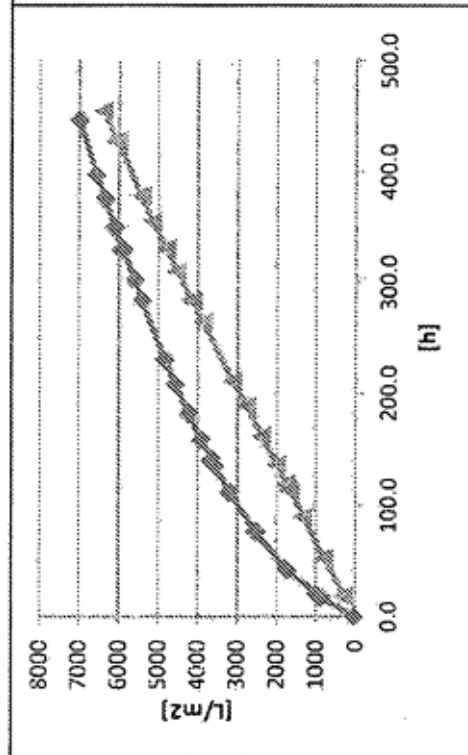


Figura 4B

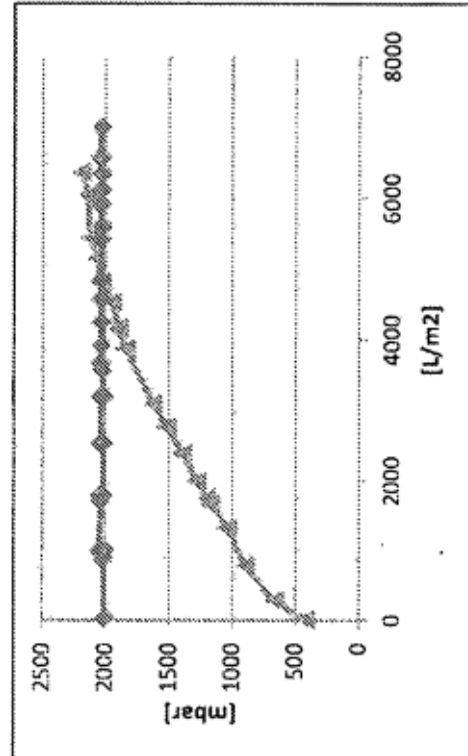
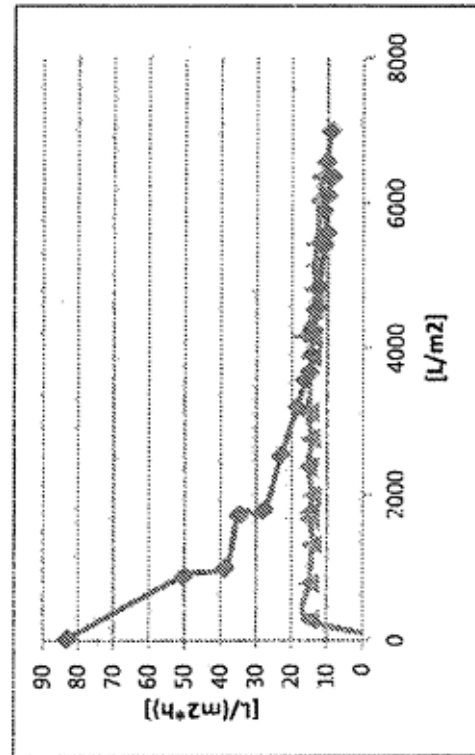


Figura 4C



 Filtro A Hidrolizado de soja
5 presión controlada

 Filtro A Hidrolizado de soja
5 caudal controlado

Figura 5A

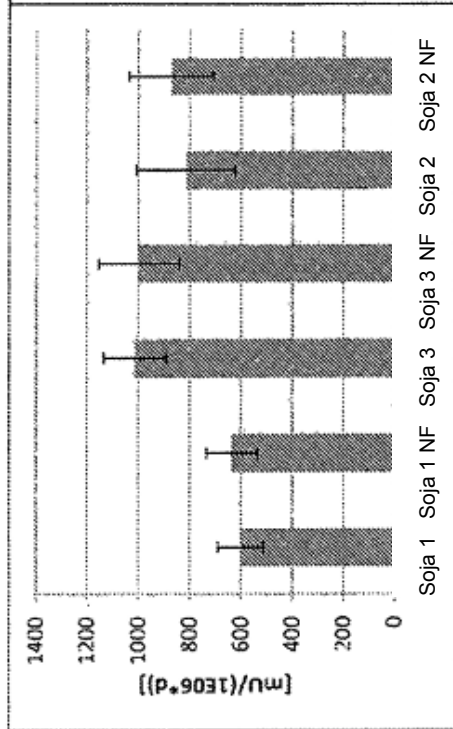


Figura 5B

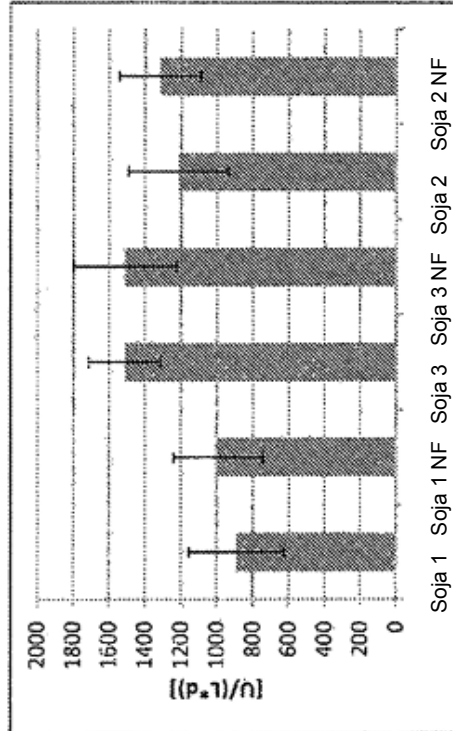


Figura 5C

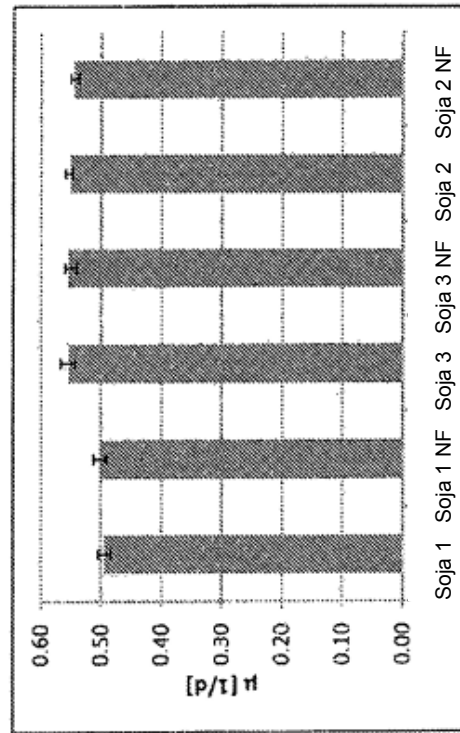


Figura 6A

	Tiempo de	Volumen de filtrado de virus	Capacidad volumétrica	Filtro
	(d)	Suma [L]	[L/m ²]	Tipo
Int 1	7	457	2284	E
Int 2	9	605	7117	F
Int 3	7	443	2213	E
Int 4	9	636	7482	F
Int 5	24	1492	7459	E

Figura 6B

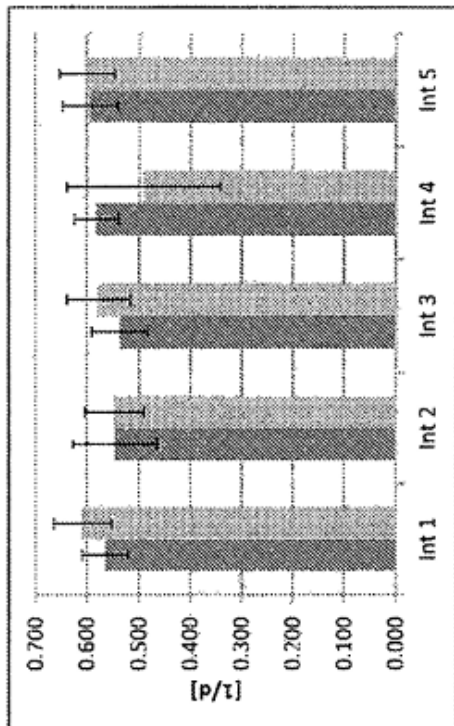
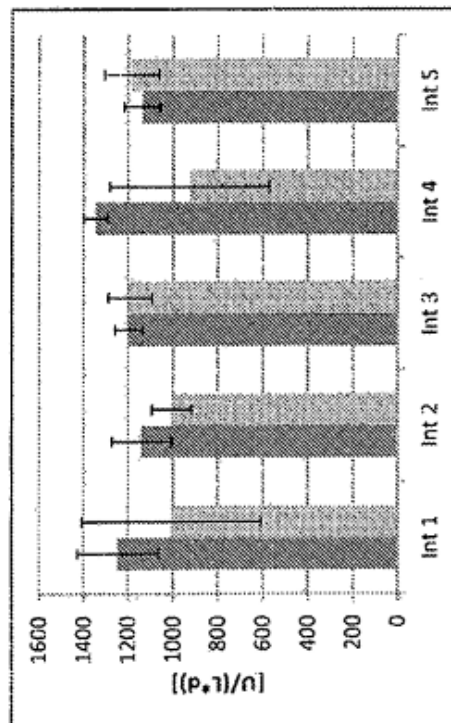


Figura 6C



Medio nanofiltrado
Referencia

Figura 7

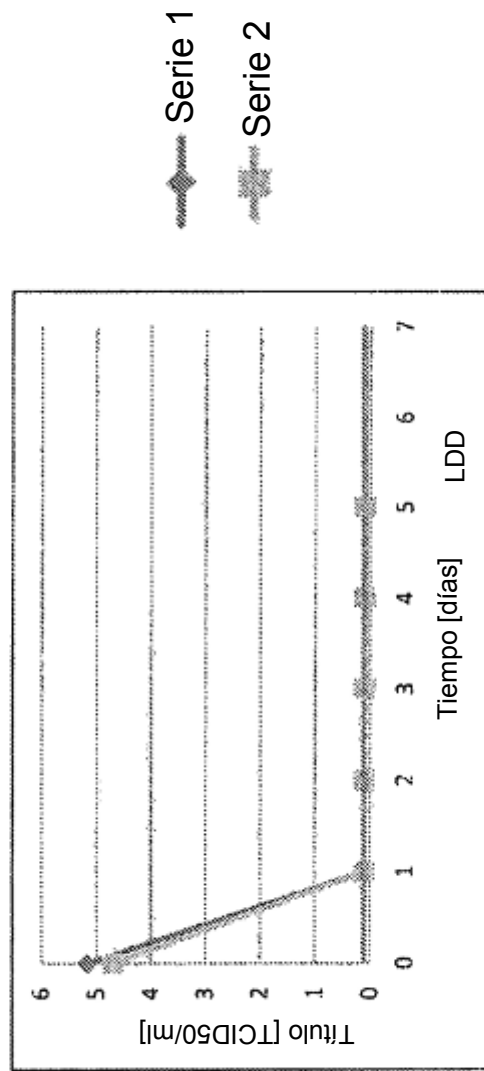


Figura 8

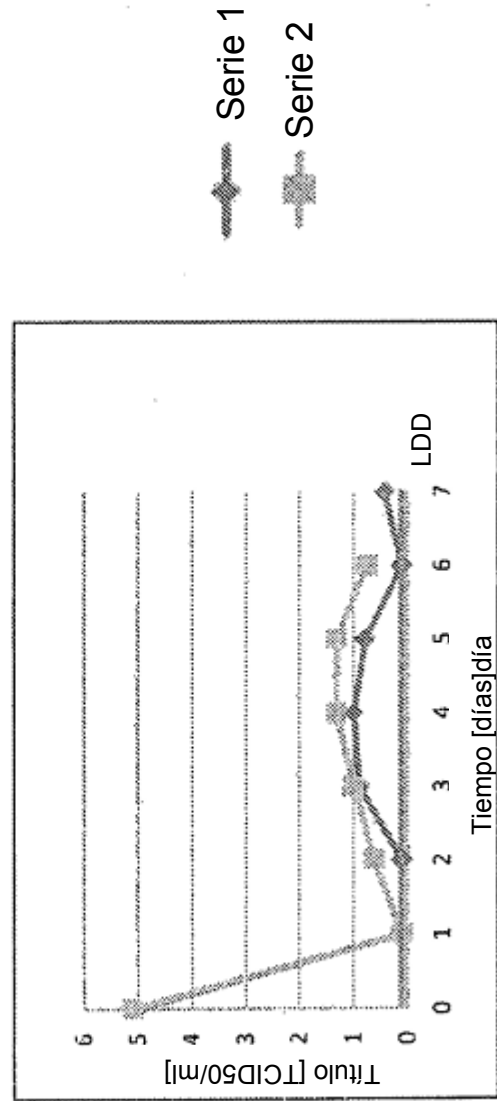


Figura 9

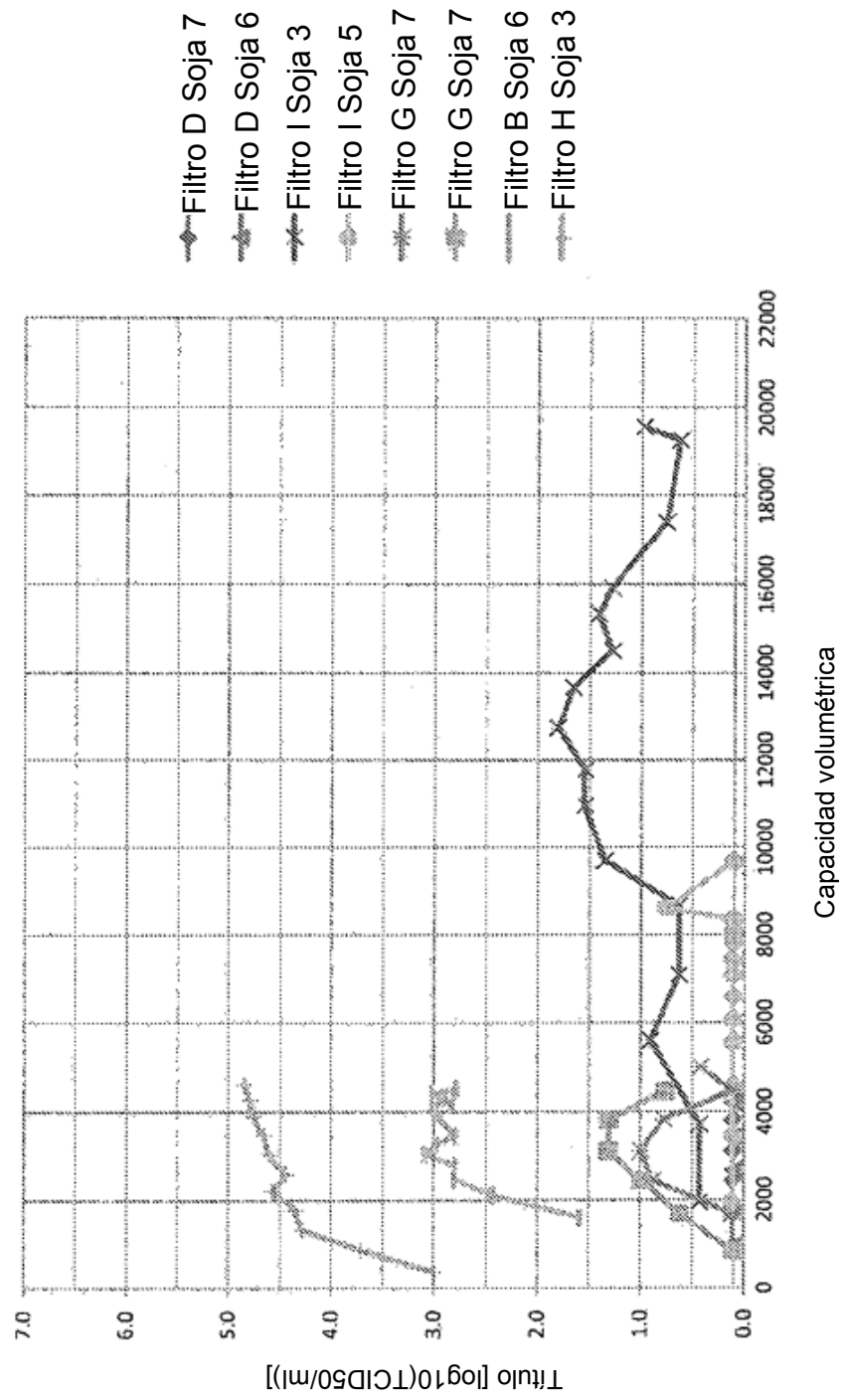


Figura 10

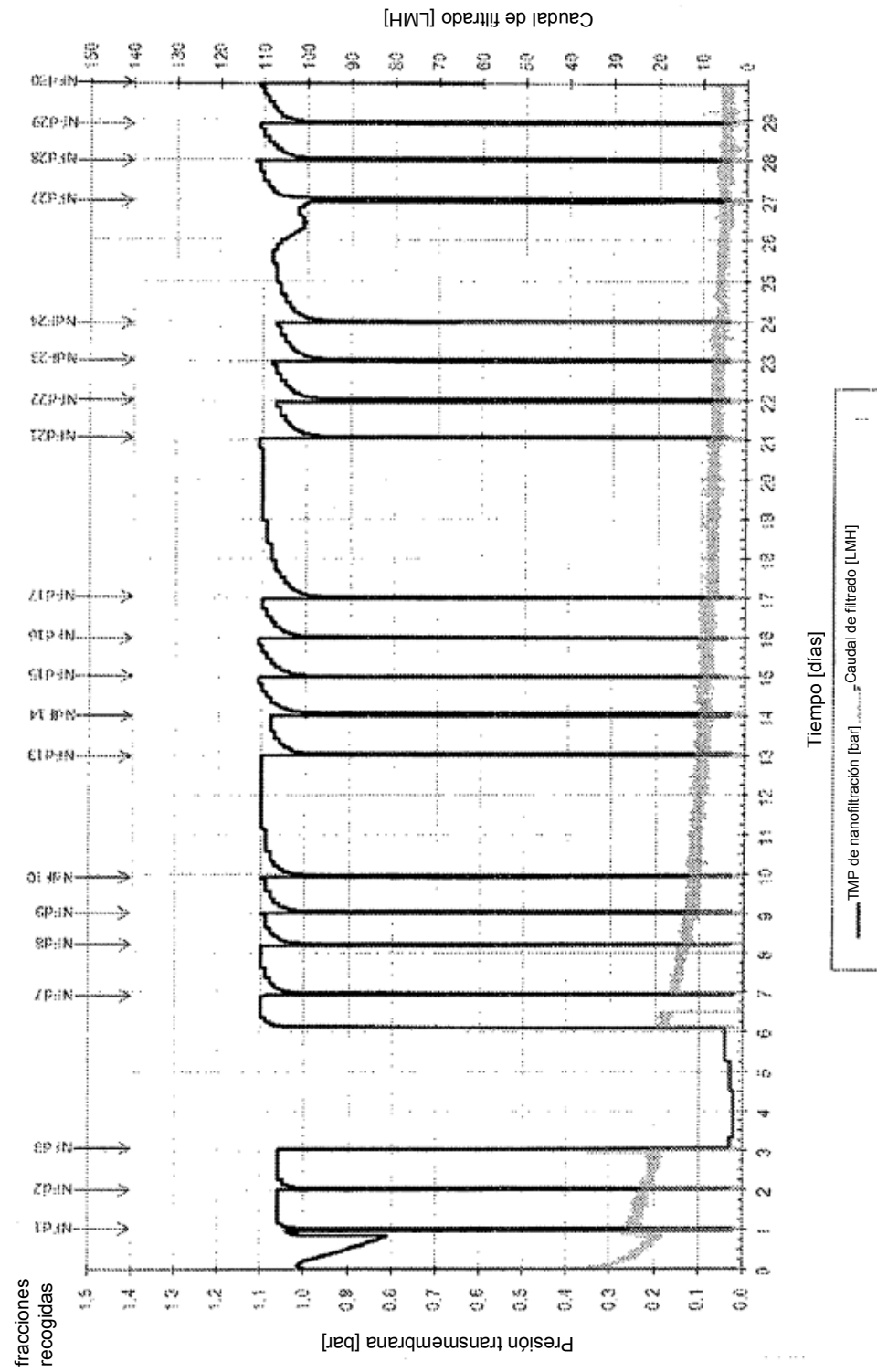


Figura 11

Material añadido	Volumen de alimentación [ml]	Título de MMV [log ₁₀ (TCID ₅₀ /ml)]	Carga de MMV [log ₁₀ (TCID ₅₀)]
NF día 1	3270	5,0	8,5
NF día 2	287	< -0,8	< 1,7
NF día 3	272	< -0,8	< 1,6
NF día 7	246	< -0,8	< 1,6
NF día 8	330	< -0,3	< 2,8
NF día 9	216	< -0,8	< 1,5
NF día 10	118	< -0,8	< 1,3
NF día 13	121	< -0,8	< 1,3
NF día 14	368	< -0,8	< 1,8
NF día 15	106	< -0,8	< 1,2
NF día 16	98	< -0,8	< 1,2
NF día 17	99	< -0,8	< 1,2
NF día 21	96	< -0,8	< 1,2
NF día 22	354	< -0,8	< 1,7
NF día 23	69	< -0,8	< 1,0
NF día 24	74	< -0,8	< 1,1
NF día 27	67	< -0,8	< 1,0
NF día 28	194	< -0,8	< 1,5
NF día 29	57	< -0,8	< 1,0
NF día 30	49	< -0,8	< 0,9
NF día 30	52	< -0,8	< 0,9
Volumen de filtrado total:			
	3270		< 3,0
l/m²			
	6540		
FR			
			> 5,5 log ₁₀