



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014031842-5 B1



(22) Data do Depósito: 13/06/2013

(45) Data de Concessão: 15/09/2020

(54) Título: MÉTODO PARA REMOVER UM CONTAMINANTE VIRAL DE UMA PREPARAÇÃO

(51) Int.Cl.: C12M 1/00; A61L 2/00; C12M 1/12; C12N 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 21/06/2012 US 61/662,814.

(73) Titular(es): BAXALTA GMBH; BAXALTA INCORPORATED.

(72) Inventor(es): WOLFGANG MUNDT; ARTUR MITTERER; MANFRED REITER; MEINHARD HASSLACHER; LEOPOLD GRILLBERGER; THOMAS KREIL.

(86) Pedido PCT: PCT US2013045663 de 13/06/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/192009 de 27/12/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/12/2014

(57) Resumo: MÉTODO PARA REMOVER UM CONTAMINANTE VIRAL DE UMA PREPARAÇÃO, USO DE UM FILTRO DE VÍRUS E DE UMA PREPARAÇÃO, MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO FARMACÊUTICO, DE DIAGNÓSTICO OU COSMÉTICO. A invenção refere-se a um método para remover um contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células. O método compreende submeter a dita preparação à filtração durante pelo menos cerca de 24 horas através de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo igual a cerca de 75 nm. Além disso, a invenção refere-se ao uso de um filtro de vírus na filtração durante pelo menos cerca de 24 horas, em que o filtro de vírus tem um tamanho de poro efetivo máximo igual a cerca de 75 nm para a remoção do contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células de pelo menos um componente de um meio de cultura de células. Em algumas modalidades, a filtração de acordo com a invenção ocorre a uma capacidade volumétrica igual a pelo menos cerca de 2.000 L/m². Além disso, a invenção refere-se ao uso (...).

MÉTODO PARA REMOVER UM CONTAMINANTE VIRAL DE UMA PREPARAÇÃO

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0001] A segurança virológica é uma preocupação significativa na indústria biofarmacêutica. Apesar dos esforços para mitigar o risco, incidentes envolvendo contaminação viral em grande escala de produtos biológicos têm gerado preocupação na indústria. Eventos de grande destaque incluem, por exemplo, a detecção de 2009 da Genzyme de uma contaminação com o vesivírus 2117 de sua cultura de células CHO (ovário de hamster chinês) que interrompeu a produção de Cerezyme® e Fabrazyme® e a contaminação de 2010 da Merck, de sua vacina Rotarix® pelo circovírus 1. Uma fonte provável de contaminação está no estágio de cultura de células. Além da pressão econômica sobre a empresa fabricante (um relatório coloca a estimativa em mais de cem milhões de perda por contaminação de um reator de 10000 L mais multas das agências), tais eventos representam um risco para os pacientes e interrompem o acesso aos produtos biofarmacêuticos (Liu et al., *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 425-434). Como resultado, há um rigoroso exame regulamentar e demanda por novas técnicas para detectar, prevenir e remediar as contaminações virais.

[0002] Em geral, os contaminantes virais podem ser diferenciados em contaminações virais a montante e a jusante. As contaminações a jusante podem ser controladas através da aplicação de sistemas fechados, no entanto, contaminações especialmente a montante são difíceis de controlar e detectar até mesmo por testes extensivos. Contaminantes virais também podem se originar do uso de materiais de origem animal na produção biofarmacêutica. Onde a produção da linhagem celular é isenta de contaminantes virais externos e a produção não envolve o uso de materiais de origem animal, os contaminantes virais ainda poderiam entrar, através dos meios de cultura de

células. Por exemplo, meios sintéticos podem ser suplementados com fatores de crescimento recombinantes produzidos em um sistema suplementado com soro, e o meio isento de proteína, no entanto, pode conter hidrolisados de proteína filtrados. Entretanto, a contaminação viral pode até mesmo ocorrer em um meio completamente quimicamente definido, porque grandes quantidades dos componentes do meio podem ser embaladas em recipientes não estéreis. Filtros esterilizantes de grade convencionais não são nem projetados e nem são capazes de salvaguardar contra contaminantes virais, de modo que outras medidas devem ser empregadas para garantir a segurança virológica.

[0003] A detecção dos vírus acidentais em um ou mais pontos de verificação do processo de produção é uma prática padrão. No entanto, apenas a detecção é uma medida inadequada contra a contaminação viral de produtos biofarmacêuticos, especialmente onde o contaminante viral presente é insuspeito, desconhecido ou um agente viral emergente. Tais agentes virais podem escapar da detecção por micromatrizes de DNA bem projetadas representativas de uma grande coleção de vírus sequenciados. O desafio é adicionalmente agravado pelos baixos níveis de contaminantes virais necessários para infectar uma cultura de células e pela sensibilidade atualmente limitada dos ensaios de detecção.

[0004] Títulos elevados do contaminante viral podem não se manifestar sob a forma de parâmetros de cultura de células alterados, por exemplo, densidade de cultura e títulos de proteína, além de seus intervalos normais. Por outro lado, os ensaios de infecciosidade são altamente específicos e requerem condições diferentes para cada vírus. Como resultado da contaminação viral, equipamentos, fluidos e produtos a jusante podem ser maculados, incorrendo em milhões de dólares na configuração de lote, eliminação de resíduos, vendas perdidas e descontaminação. A varredura completa das matérias-primas para vírus é difícil devido à heterogeneidade da

amostra e aos grandes volumes envolvidos nos processos de produção biofarmacêuticos.

[0005] Técnicas de depuração viral podem ser classificadas em um dos dois grupos: inativação e filtração. Os métodos de inativação buscam a perda irreversível da infecciosidade viral, enquanto que os métodos de filtração visam reduzir mecanicamente a contaminação viral. Os métodos de inativação convencionais empregam irradiação ultravioleta (UV), irradiação gama, calor, pH baixo ou alto ou exposição de solvente/detergente. Nos casos onde a irradiação UV pode eliminar de modo eficaz e irreversivelmente a atividade viral, ela pode ser impraticável em uma base em grande escala ou inadequada para os meios preparados. A autoclavagem, embora seja possível para líquidos termoestáveis, pode alterar a sensibilidade do meio. Um método alternativo conhecido como tratamento térmico em alta temperatura por curto espaço de tempo (HTST) não é tão severo, mas exige equipamentos, automação e processos de validação caros para preservar as características dos meios. Exposição a pH baixo ou alto é ineficaz pelo espectro de possíveis contaminantes virais, e pode afetar negativamente a qualidade ou a osmolaridade dos meios. A exposição ao solvente/detergente, da mesma forma, não é uma solução de amplo espectro e é eficaz apenas para vírus com um envelope lipídico. Como tal, o método ideal deve equilibrar considerações de custo e as necessidades de realizar a depuração viral nas matérias-primas, e fornecer uma solução de amplo espectro sem comprometer a taxa de crescimento ou o rendimento.

[0006] A filtração de retenção de vírus oferece o equilíbrio adequado. Ela não altera quimicamente os componentes dos meios e é adequada para uso com alimentos meios sensíveis ao calor. Além disso, a filtração de retenção de vírus é uma solução de amplo espectro, pois ela opera com base em um princípio de exclusão de tamanho. No entanto, as membranas de retenção de vírus são caras (aproximadamente cerca de 2.000 a 5.000 euros/m²). As taxas

específicas de baixa vazão características da filtração de e volumes de meios tornaram o método economicamente caro em uma escala apropriada para suprir um biorreator em grande escala, devido ao custo da área de membrana necessária. Por exemplo, onde a filtração do vírus é ligada em série à filtração do meio de grau esterilizante, a filtração de vírus precisa preferencialmente ocorrer dentro de um dia útil, ou seja, no máximo de 2 a 10 horas após a preparação do meio a granel, para evitar a contaminação do meio a granel. Portanto, uma grande área de filtração é necessária para permanecer dentro desse prazo crítico, o que, por sua vez, gera custos.

[0007] Surpreendentemente, verificou-se que as desvantagens da dita filtração de vírus da técnica anterior podem ser superadas pela filtração da respectiva preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, durante pelo menos 24 horas, através de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo de 75 nm. Se o volume necessário das respectivas preparações for filtrado durante um período de tempo mais longo, ou seja, durante pelo menos 24 horas, a capacidade volumétrica dos filtros de vírus aumenta muito. Surpreendentemente, verificou-se ainda que uma significativa redução global do título viral pode ser alcançada durante esse período prolongado de tempo. Isso é especialmente benéfico para remover vírus a montante em sistemas de cultura de células.

[0008] Portanto, o método da invenção aumenta a eficiência econômica de filtração de vírus, aumentando respectivamente a produtividade e a capacidade volumétrica. O método de acordo com a presente invenção opera em uma capacidade volumétrica de pelo menos 2.000 L/m², auxiliando dessa forma a maximizar o uso de filtros de vírus de alta capacidade, diminuindo o custo efetivo associado com isso e apresentando uma solução viável em grande escala e facilmente integrável aos processos de produção existentes.

[0009] O enorme impacto do método de acordo com a invenção e o uso inventivo dos respectivos filtros de vírus em processos de fabricação estéreis, particularmente em processos onde preparações estéreis, por exemplo, meios de cultura de células e tampões, são usados podem ser compreendidos por meio do exemplo a seguir. Supondo que um metro quadrado de uma membrana de filtro de vírus custa cerca de 3.000 euros em média e um meio de cultura de células usado custa cerca de 10 euros/litro em média, então os custos para 1.000 L de meio de vírus filtrado é 13 euros por litro de meio, o que aumenta os custos das mercadorias para a preparação dos meios em cerca de 30%. Se 2.000 L podem ser filtrados com uma membrana de filtro de vírus, então os custos caem até 11,50 euros. Um aumento adicional das capacidades volumétricas, por exemplo, além de 5.000 L, reduz os custos até menos de 0,6 euro por meio litro de meio, o que torna os custos adicionais para fornecer um meio filtrado sem vírus consideravelmente baixo. Como resultado, os elevados custos do uso de filtros de vírus, em particular na descontaminação a montante do potencial viral ou contaminação viral, diminuem significativamente através do aumento da capacidade volumétrica do método de filtração de vírus.

[0010] A presente invenção totalmente aborda esse problema de altos custos e baixa capacidade volumétrica dos filtros de vírus, respectivamente. A capacidade volumétrica do filtro de vírus pode aumentar executando a filtração de vírus durante pelo menos cerca de 24 horas, através de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo de 75 nm. Surpreendentemente, verificou-se que a capacidade volumétrica dos filtros de vírus caros usados pode ser mais bem explorada, levando a um aumento da capacidade volumétrica de 2 a 100 vezes, preservando concomitantemente a integridade do filtro. Apesar de um aumento de 2 a 3 vezes da capacidade volumétrica já representa um grande impacto para o processo de produção e os custos de produção relacionados, o método de acordo com a invenção

permite um aumento de até 100 vezes da capacidade volumétrica, podendo-se alcançar um aumento ainda maior. Isto oferece grandes oportunidades e torna a remoção viral barata, mesmo com filtros de vírus caros que podem ser agora usados para melhorar ainda mais a segurança viral nos processos de cultura de células, em particular na remoção viral a montante dos processos de cultura de células e dos processos farmacêuticos, diagnóstico e/ou cosmético e de alimentos.

RESUMO DA INVENÇÃO

[0011] A presente invenção fornece um método para remover um contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células. O método compreende submeter a dita preparação à filtração durante pelo menos cerca de 24 horas através de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo igual a 75 nm.

[0012] Além disso, a invenção refere-se ao uso de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo igual a 75 nm em uma filtração durante pelo menos 24 horas, para a remoção do contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células.

[0013] Além disso, a invenção refere-se ao uso de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células que pode ser obtido de acordo com qualquer método da presente invenção para a cultura de células; preparações farmacêuticas, de diagnóstico e/ou cosméticas, bem como para preparações alimentícias.

[0014] Todos os métodos e usos de acordo com a invenção podem operar a uma capacidade volumétrica igual a pelo menos cerca de 2.000 L/m², de preferência pelo menos cerca de 3.000 L/m², e mais preferencialmente de pelo menos cerca de 5.000 L/m². Além disso, a preparação é submetida à

filtração e a filtração é realizada, respectivamente, durante pelo menos 24 horas ou durante pelo menos cerca de 48 horas até cerca de 7 meses ou de cerca de 72 horas até cerca de 3 meses. A filtração é realizada a uma temperatura de cerca de 2°C a cerca de 60°C, ou de cerca de 10 a cerca de 40°C, preferencialmente de cerca de 15 a cerca de 37°C.

[0015] Em todas as modalidades da invenção, a filtração é realizada a uma pressão que varia de cerca de 10 kPa (100 mbar) a cerca de 400 kPa (4.000 mbar), preferencialmente de cerca de 20 kPa (200 mbar) a cerca de 350 kPa (3.500 mbar), mais preferencialmente de cerca de 100 kPa (1.000 mbar) a cerca de 300 kPa (3.000 mbar).

[0016] Em todas as modalidades da invenção, o filtro de vírus usado atinge um valor de redução de pelo menos 1 Log₁₀ (LRV) para um contaminante viral.

[0017] Surpreendentemente, verificou-se que a capacidade volumétrica dos filtros de vírus pode ser muito aumentada quando o processo de filtração ocorrer durante pelo menos cerca de 24 horas. Normalmente, as preparações para a cultura de células, por exemplo, os tampões ou meios de cultura de células a granel são filtrados em lote, dentro de cerca de 2 a cerca de 10 horas após a preparação das preparações a granel, a fim de evitar a contaminação das preparações por crescimento bacteriano ou viral. Foi verificado que, na prática, a capacidade máxima dos filtros de vírus usados não é nem de perto explorada em processos de filtração que filtram as respectivas preparações em um período de tempo de cerca de 2 a cerca de 10 horas. Portanto uma área do filtro em excesso deve ser usada. Em contrapartida, verificou-se que devido ao uso do método da presente invenção, a capacidade volumétrica dos filtros de vírus caros usados pode ser mais bem explorada, levando a um aumento da capacidade volumétrica de 2 a 100 vezes, preservando concomitantemente a integridade do filtro. Apesar de um aumento de 2 a 3 vezes da capacidade volumétrica já representa um

grande impacto para o processo de produção e os custos de produção relacionados, o método de acordo com a invenção permite um aumento de até 100 vezes, podendo-se alcançar um aumento ainda maior. Isto oferece grandes oportunidades e torna a remoção viral barata, mesmo com filtros de vírus caros que podem ser agora usados para melhorar ainda mais a segurança viral nos processos de cultura de células, em particular na remoção viral a montante dos processos de cultura de células e dos processos farmacêuticos, diagnóstico e/ou cosmético e de alimentos.

[0018] As modalidades preferenciais específicas da presente invenção serão evidentes a partir da descrição mais detalhada a seguir de certas modalidades e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0019] Descrições mais particulares da invenção são feitas por referência a certas modalidades exemplares da mesma, que são ilustradas nas FIGS. em anexo. Essas FIGS. representam uma parte do relatório descritivo. Deve-se notar, contudo, que as FIGS. em anexo ilustram modalidades exemplificadoras da invenção e, portanto, não devem ser considerados limitantes em seus escopos.

[0020] A FIG. 1 está mostrando a cinética de filtração de vírus realizada aplicando um fluxo de filtração de vírus controlado (FIG. 1C) usando diferentes filtros, todos combinados com meios de cultura de células suplementados com 3 diferentes lotes de hidrolisado de soja (Kerry HyPep1510 No. 1, DOMO SE50 MAF UF No. 1 e No. 2).

Filtro e condições experimentais aplicadas (consulte também o Exemplo 1 ao Exemplo 4):

Filtro A: Virosart CPV da Sartorius, 180 cm²; a 30°C, com vazões de cerca de 30 L/(m² x h)

Filtro B: Viresolve NFP da Millipore, 3,1 cm²; a 30°C, com vazões de cerca de 40 a 60 L/(m² x h). As filtrações foram realizadas durante um período

máximo de 9 dias, ou até exceder uma pressão máxima de 200 kPa (2.000 mbar). A FIG. 1A está mostrando a capacidade volumétrica como o volume filtrado por área superficial da membrana representada graficamente em relação ao tempo, variando de um mínimo de cerca de 4.000 L/m² até cerca de 12.000 L/m². A pressão máxima, no final da filtração, foi entre cerca de 60 kPa (600 mbar) e 240 kPa (2.400 mbar), dependendo do tipo de filtro (FIG. 1B). Em geral, a diferença entre os hidrolisados de soja é muito baixa para a capacidade volumétrica e a pressão máxima.

[0021] A FIG. 2 está mostrando a cinética de filtração de vírus realizada aplicando um fluxo de filtração de vírus controlado (FIG. 2C) usando diferentes filtros e o meio de cultura de células suplementado com 3 diferentes lotes de hidrolisado de soja (Kerry HyPep 1510 No. 1, DOMO SE50 MAF UF No. 1 e No. 2).

Filtro e condições experimentais aplicadas (consulte também o Exemplo 1 ao Exemplo 4):

Filtro A: Virosart CPV da Sartorius, 180 cm²; a 30°C, com vazões de cerca de 30 L/(m² x h)

Filtro D: BioEX da Asahi, 10 cm²; em temperatura ambiente (cerca de 22°C), com vazões de cerca de 20 L/(m² x h). Ao contrário dos experimentos descritos na FIG. 1, as filtrações foram realizadas durante um período de tempo mais longo, de até 81 dias, ou até atingir uma pressão de 200 kPa (2.000 mbar). A FIG. 2A está mostrando a capacidade volumétrica como o volume filtrado por área superficial da membrana representado graficamente em relação ao tempo, variando de um mínimo de cerca de 16.000 L/m² (para o filtro A com DOMO SE50 MAF No. 2) até cerca de 35.000 L/m² (para o filtro D, com todos os 3 lotes de hidrolisado diferentes). A pressão máxima, no final da filtração, foi entre cerca de 120 kPa (1.200 mbar) e 200 kPa (2.000 mbar), dependendo do tipo de filtro (FIG. 2B). Em geral, a diferença entre os hidrolisados de soja é muito baixa para a capacidade volumétrica e a pressão

máxima.

[0022] A FIG. 3 é um gráfico mostrando a relação entre o fluxo e a pressão diferencial, tal como observado a cerca de 22°C, usando o filtro A (Virosart CPV da Sartorius, 180 cm²) e meio contendo o hidrolisado de soja DOMO SE50 MAF UF, Lote No. 2 (consulte o exemplo 5). Uma pressão diferencial mínima de cerca de 10 kPa (100 mbar) é necessária para alcançar uma vazão específica detectável mínima que, em seguida, é aumentada gradualmente com uma correlação proporcional obviamente linear entre a vazão específica e a pressão diferencial.

[0023] A FIG. 4 está mostrando a diferença entre uma pressão controlada e uma filtração de vazão controlada usando o filtro A (CPV da Sartorius, 180 cm²) e o meio com hidrolisado de soja Kerry HyPep 1510 No. 2 (consulte os exemplos de 1 a 4).

As filtrações foram realizadas durante 19 dias e alcançaram, neste tempo, uma capacidade volumétrica de cerca de 6.000 a 7.000 L/m². A pressão final da filtração de fluxo controlado foi comparável com a pressão da filtração sob pressão controlada (consulte a FIG. 4B), e a vazão específica final da filtração sob pressão controlada foi comparável à vazão da filtração com vazão controlada (consulte a FIG. 4C). Isso demonstra que ambas estratégias de controle para a filtração de vírus podem resultar em capacidade volumétrica comparável.

[0024] A FIG. 5 está mostrando os resultados de um experimento em biorreator de 10 L usando meio filtrado sem vírus e um meio sem remoção de vírus por filtração, descrito no exemplo 6. Os meios de cultura de células foram filtrados para remover os vírus, em lote, com o filtro A, antes do início do experimento. Experimentos foram realizados em paralelo, cada um usando os meios de cultura de células suplementados com 3 hidrolisados de soja diferentes (Kerry HyPep 1510, lote No. 1; DOMO SE50 MAF UF, lote No. 1 e DOMO SE50 MAF UF, lote No. 2). Os dados foram calculados a partir das

3 últimas semanas de uma cultura de células de 4 semanas contínua. Nenhuma diferença entre os respectivos meios filtrados sem vírus (soja 1 NF, soja 3 NF e Soja 2 NF) versus as suas referências não filtradas (soja 1, soja 3 e soja 2) pôde ser detectada para a produtividade específica (FIG. 5A), a produtividade volumétrica (FIG. 5B) e a taxa de crescimento específica (FIG. 5C).

[0025] A FIG. 6 está mostrando os resultados de um experimento em biorreator de 120 L usando meio filtrado sem vírus em comparação com um meio sem remoção de vírus por filtração, descrito no exemplo 7. Os vírus dos meios de cultura de células foram removidos por filtração na linha de alimentação de meio dos biorreatores, usando alternativamente o filtro E (Virosart CPV da Sartorius, 2000 cm²) e o filtro F (Viresolve NFP da Millipore, 850 cm²) durante cerca de 58 dias em modo contínuo. Os intervalos de tempo e a capacidade volumétrica da alimentação de meio filtrado sem vírus são mostrados na FIG. 6A. Os dados foram calculados para os intervalos usando os diferentes filtros. Nenhuma diferença entre os respectivos meios filtrados sem vírus em comparação com a referência não filtrada pôde ser detectada para a taxa de crescimento específica (FIG. 6B) e a produtividade volumétrica (FIG. 6C).

[0026] A FIG. 7 mostra a mudança do título de infecciosidade de MMV [TCID₅₀/mL] encontrado em amostras de filtrado sequenciais coletadas durante a filtração do meio fortificado com MMV contendo o hidrolisado de soja DOMO SE50 MAF No. 5 UF com os filtros de vírus filtro G (ASAHI Planova 15N) (consulte exemplo 8). Um baixo nível de ruptura viral foi observado de 2 a 3 dias. No entanto, a remoção de vírus se mostrou eficaz.

[0027] A FIG. 8 mostra a mudança do título de infecciosidade de MMV [TCID₅₀/mL] encontrado em amostras de filtrado sequenciais coletadas durante a filtração de meio fortificado com MMV contendo hidrolisado de soja (análise No. 1 com hidrolisado de soja DMV SE50 MAF UF No. 5;

análise No. 2 com hidrolisado de soja DMV SE50 MAF UF No. 4) com filtros de vírus tipo D (Asahi BioEX) (consulte o exemplo 9). Nenhuma saturação de vírus foi observada e a remoção de vírus se mostrou eficaz e completa.

[0028] A FIG. 9 mostra a mudança do título de infecciosidade de MMV [TCID₅₀/mL] encontrado nas amostras de filtrado sequenciais coletadas durante a filtração do meio fortificado com MMV, conforme divulgado no exemplo 10. Nenhuma saturação de vírus foi observada para as análises No. 1 e No. 2 (filtro D), resultando na remoção de vírus completa e eficaz do meio contendo hidrolisado de soja. Um baixo nível de saturação de vírus foi observado para as análises No. 3 e No. 4 (filtro I) e para as análises No. 5 e No. 6 (filtro G), resultando em uma remoção de vírus eficaz, porém não completa, do meio contendo hidrolisado de soja. Uma saturação de vírus mais significativa foi observada para a análise No. 7 (filtro B) e para a análise No. 8 (filtro H), resultando em menores fatores de remoção de vírus no limite de significância. No entanto, com todos os filtros, pelo menos em um experimento uma redução de título global mínima de mais de cerca de 1 log de TCID₅₀/mL pode ser alcançada.

Tabela 1: Combinação dos filtros de vírus e hidrolisados de soja usados nos experimentos de fortificação

| No. do Experimento | Filtro | Lote de hidrolisado de soja | Fator de redução 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 |

[0029] A FIG. 10 mostra a cinética de uma filtração viral realizada conforme descrito no exemplo 11. A pressão foi mantida entre 80 e 120 kPa (0,8 e 1,2 bar) (média de 110 kPa (1,1 bar)), com exceção de pressão intencional e interrupções de fluxo, que simulam o pior caso das condições

operacionais. Taxas de fluxo inicial de cerca de 38 L/(m² x h) foram atingidas, que diminuíram gradualmente até o final do experimento, no entanto, uma vazão mínima de 4 L/(m² x h) poderia ser mantida. A duração global, incluindo as interrupções de pressão, foi igual a 30 dias. Cerca de 6.500 L/m² passaram sobre o filtro.

[0030] A FIG. 11 mostra a mudança do título de infecciosidade de MMV [\log_{10} (TCID₅₀/mL)] encontrado nas amostras de filtrado sequenciais durante a filtração do meio fortificado com MMV, conforme descrito no exemplo 11. Nenhuma saturação de vírus foi observada em qualquer uma das 20 frações analisadas. As cargas virais variaram de < 0,9 [\log_{10} (TCID₅₀)] até < 2,8 [\log_{10} (TCID₅₀)], dependendo do volume da fração. A carga de vírus total nos filtrados foi < 3,0 [\log_{10} (TCID₅₀)] que – quando subtraída da carga de vírus inicial do material fortificado (ou seja, 8,5 [\log_{10} (TCID₅₀)] – resulta em um fator de redução de vírus global > 5,5 \log_{10} . Isto se mostrou eficaz e completo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0031] A presente invenção fornece um método para remover um contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células. O método compreende submeter a dita preparação à filtração durante pelo menos cerca de 24 horas através de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo igual a 75 nm.

[0032] Além disso, a invenção refere-se ao uso de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo igual a 75 nm em uma filtração durante pelo menos 24 horas, para a remoção do contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células.

[0033] Além disso, a invenção refere-se ao uso de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um

meio de cultura de células que pode ser obtido de acordo com qualquer método da presente invenção para a cultura de células; preparações farmacêuticas, de diagnóstico e/ou cosméticas, bem como para preparações alimentícias.

[0034] Em todas as modalidades da invenção, a preparação é submetida à filtração de vírus, a filtração de vírus ou o uso do filtro de vírus é realizado durante pelo menos cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 72 horas, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 4 meses, cerca de 5 meses, cerca de 6 meses ou cerca de 7 meses. Além disso, em uma modalidade, a preparação é submetida à filtração de vírus, ou a filtração de vírus é realizada durante cerca de 1 semana a cerca de 3 semanas, de cerca de 2 semanas a cerca de 3 semanas, de cerca de 1 semana a cerca de 4 semanas, de cerca de 2 semanas a cerca de 4 semanas, de cerca de 1 semana a cerca de 7 meses, de cerca de 1 mês a cerca de 5 meses, de cerca de 2 meses a cerca de 5 meses, de cerca de 2 meses a cerca de 4 meses, de cerca de 2 meses a cerca de 3 meses ou de pelo menos cerca de 24 horas até cerca de 7 meses ou de cerca de 48 horas até cerca de 5 meses, ou de cerca de 72 horas até cerca de 3 meses. Além disso, em uma modalidade, a preparação é submetida à filtração de vírus, ou a filtração de vírus é realizada durante mais de 48 horas até cerca de 7 meses, preferencialmente de cerca de uma semana até cerca de 5 meses ou de cerca de 3 semanas até cerca de 3 meses, ou de cerca de 2 meses até cerca de 3 meses.

[0035] O método de acordo com a invenção pode operar a uma capacidade volumétrica de pelo menos cerca de 2.000 L/m², ou de pelo menos cerca de 3.000 L/m², ou de pelo menos cerca de 4.000 L/m², ou de pelo menos cerca de 5.000 L/m², de pelo menos cerca de 7.500 L/m², de pelo menos cerca de 10.000 L/m² ou de pelo menos cerca de 20.000 L/m². Sob

esse aspecto, a "capacidade volumétrica" refere-se ao volume de solução que pode ser filtrado através de uma área especificada da membrana de filtro de vírus antes de o fluxo de filtrado ser reduzido, ou da contrapressão aumentar até condições de operação indesejáveis devido a entupimento da membrana de filtro.

[0036] É contemplado que a presente invenção, incluindo todas as modalidades, pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras abordagens conhecidas na técnica para minimizar a contaminação viral, por exemplo, triagem, separação, detecção, inativação viral, retenção adsortiva, etc. Os presentes métodos são orientados para a entrada de agentes virais indesejados através da preparação, sendo um meio de cultura de células meio de cultura celular ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, no início do processo de produção e proporcionam um mecanismo de redução viral. As vantagens da presente invenção incluem a facilidade de implementação em grande escala, área de membrana de filtro reduzida para processar um determinado volume de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, com o custo reduzido sendo derivado disso. Em particular, a filtração de vírus das preparações de acordo com a invenção é fácil de integrar nos processos de fabricação contínuos, por exemplo, em processos de cultura de células contínuos, como perfusão ou quimiostato, como sistemas biorreatores.

[0037] O termo "temperatura", conforme utilizado na presente invenção, diz respeito à temperatura das preparações filtradas de acordo com a invenção, por exemplo, um tampão ou meio de cultura de células, no momento em que ele passa pelo filtro de vírus. Em uma modalidade de acordo com a invenção, a temperatura varia de cerca de 2°C a cerca de 60°C. Em uma modalidade, o limite inferior do intervalo de temperatura é cerca de 2°C, cerca de 4°C, cerca de 8°C, cerca de 10°C, cerca de 15°C, cerca de 20°C, cerca de 22°C, cerca de 25°C, cerca de 30°C, cerca de 37°C ou cerca de 40°C. O limite

superior do intervalo de temperatura, de acordo com a invenção, é cerca de 10°C, cerca de 20°C, cerca de 22°C, cerca de 25°C, cerca de 30°C, cerca de 37°C, cerca de 40°C, cerca de 50°C ou cerca de 60°C. Em uma modalidade, a temperatura está em um intervalo faixa de cerca de 4°C a cerca de 45°C, ou em um intervalo de temperatura de cerca de 10°C a cerca de 40°C, ou de cerca de 20°C a cerca de 40°C, ou de cerca de 30°C a cerca de 37°C. Também em uma modalidade, a temperatura é temperatura ambiente que é um intervalo de cerca de 20°C a cerca de 30°C. Obviamente, também modalidades são preferenciais onde as preparações são submetidas à filtração sem qualquer aquecimento ou arrefecimento adicional das preparações. Portanto, em uma modalidade adicional, uma temperatura de cerca de 10°C a cerca de 30°C é usada, dependendo da temperatura do respectivo local no qual a filtração é realizada. Em outra modalidade, são usadas temperaturas de cerca de 30°C a cerca de 37°C, por exemplo, por pré-aquecimento da preparação líquida antes da filtração. O filtrado resultante dessa filtração de uma preparação pode ser alimentado continuamente em um biorreator.

[0038] Em uma modalidade da invenção, a filtração é realizada a uma pressão que varia de cerca de 10 kPa (100 mbar) a cerca de 400 kPa (4.000 mbar), ou de cerca de 20 kPa (200 mbar) a cerca de 350 kPa (3.500 mbar). Em uma modalidade, a filtração de vírus é realizada em um intervalo de pressão, em que o limite inferior é igual a cerca de 10 kPa (100 mbar), cerca de 20 kPa (200 mbar), cerca de 50 kPa (500 mbar), cerca de 100 kPa (1.000 mbar), cerca de 120 kPa (1.200 mbar), cerca de 150 kPa (1.500 mbar), cerca de 200 kPa (2.000 mbar), cerca de 250 kPa (2.500 mbar) ou cerca de 280 kPa (2.800 mbar). O limite superior é igual a cerca de 120 kPa (1.200 mbar), cerca de 150 kPa (1.500 mbar), cerca de 200 kPa (2.000 mbar), cerca de 250 kPa (2.500 mbar), cerca de 280 kPa (2.800 mbar) ou cerca de 300 kPa (3.000 mbar). Em uma modalidade, a filtração é realizada em uma pressão que varia de cerca de 100 a cerca de 400 kPa (1.000 a cerca de 4.000 mbar), de cerca de

150 a cerca de 350 kPa (1.500 a cerca de 3.500 mbar), de cerca de 170 a cerca de 330 kPa (1.700 mbar a cerca de 3.300 mbar) ou de cerca de 100 a cerca de 200 kPa (1.000 mbar a cerca de 2.000 mbar).

[0039] Ajustes de temperatura e pressão podem ser utilizados em modalidades adicionais da invenção para regular a vazão específica e a capacidade volumétrica. Outras melhorias na capacidade volumétrica e no intervalo de tempo de uso do filtro de vírus podem ser obtidas regulando-se outros parâmetros do processo, como a temperatura e a pressão de filtração. Por exemplo, verificou-se que, em algumas modalidades, é preferível submeter a preparação à filtração a uma temperatura de cerca de 10°C a cerca de 40°C, e a uma pressão de cerca de 100 kPa (1.000 mbar) até cerca de 200 kPa (2.000 mbar).

[0040] Experimentos de filtração preliminares demonstraram a influência da temperatura das preparações a serem filtrados na vazão específica. Um aumento de 50 a cerca de 100% da vazão foi observado ao aumentar a temperatura de filtração de uma preparação de acordo com a invenção, tendo uma temperatura de armazenamento de cerca de 4°C até temperaturas de cerca de 18°C a cerca de 37°C. No entanto, todas essas modalidades estão dentro do escopo de que o uso da filtração durante pelo menos cerca de 24 horas, os efeitos que a capacidade dos filtros de vírus caros usados pode ser mais bem explorados, levando a um aumento de 2 a 100 vezes da capacidade volumétrica, mantendo ao mesmo tempo a integridade do filtro.

[0041] Em uma modalidade preferencial, o método de remoção de um contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, compreende a etapa de submeter a dita preparação à filtração durante pelo menos cerca de 10 dias até cerca de 2 meses através de um filtro de vírus, tendo um tamanho de poro eficaz de no máximo 75 nm a uma pressão de cerca de 100 kPa

(1.000 mbar) a 200 kPa (2.000 mbar), e a uma temperatura de 10°C a 40°C, com uma capacidade volumétrica de pelo menos 2.000 L/m². Obviamente, todos os outros parâmetros também podem ser combinados com essa modalidade. Além disso, como uma outra modalidade preferencial, o dito método é realizado em um modo de filtração contínuo, em que a preparação é preferencialmente um meio de cultura de células, por exemplo, um meio de cultura de células que compreende um hidrolisado de soja ou um meio de cultura de células, compreendendo os componentes derivados de animais, em que o filtrado é continuamente alimentado para um biorreator, em particular um reator quimiostato. Em outra modalidade, essa modalidade pode ser adicionalmente realizada usando pelo menos 2 filtros de vírus dispostos em paralelo ou em série.

[0042] É contemplado que os métodos de filtração de vírus, conforme descrito na presente invenção, podem ser usados para reduzir a contaminação viral de qualquer preparação sendo um meio de cultura de células ou um componente de um meio de cultura de células, ou seja, um meio e tampões adequados para o crescimento de células animais e, preferencialmente, células de mamíferos, em cultura de células *in vitro*. Tipicamente, o meio de cultura contém um tampão, sais, fonte de energia, aminoácidos, vitaminas e traços de elementos essenciais.

[0043] O termo "preparação" também inclui qualquer componente, sendo uma parte possível de um meio de cultura de células no sentido da presente invenção e capaz de suportar o crescimento da célula apropriada na cultura. As ditas preparações incluem, por exemplo, um tampão ou soluções de pelo menos um aminoácido ou proteína; soluções de pelo menos uma vitamina; soluções de pelo menos um sal orgânico ou inorgânico; ou soluções compreendendo pelo menos uma fonte de carboidratos ou açúcares.

[0044] No contexto da presente invenção, "redução logarítmica no valor" (LRV) é uma medida da eficiência de uma membrana na retenção de

uma partícula, como bactérias ou vírus, definida como o logaritmo (base 10), da razão da dita contagem de partículas no fluxo de alimentação para a contagem de partículas no permeado da membrana de filtro de vírus. O valor da LRV é específico para um determinado tipo de partícula. Em uma modalidade de acordo com a invenção, o filtro de vírus atinge pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 1 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 2 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 3 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 4 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 5 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 6 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 7 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 8 para um contaminante viral, preferencialmente pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 4 para um contaminante viral. Obviamente, é evidente para uma pessoa versada na técnica que qualquer redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor de um contaminante viral ou viral potencial da preparação a ser filtrado é benéfica para melhorar a segurança de um processo de produção. Portanto, especialmente esse parâmetro pode ser combinado com todos os outros parâmetros que são usados no método da presente invenção.

[0045] "Fluxo", conforme utilizado na presente invenção, é intercambiável usado com "vazão específica" ou "vazão" é uma medida utilizada para caracterizar membranas, refere-se à taxa de fluxo do filtrado (expressa em volume ou peso de solução que permeia através da membrana de filtração de vírus por área de filtro e tempo, por exemplo, L/(m² x h). No contexto da invenção, o termo "específico" significa dentro de um prazo

definido, no entanto, quando apenas "vazão" é usado, também a partir das unidades desse parâmetro, é evidente que se refere à "vazão específica". Como abreviação da quantidade "volume" dada na unidade "litro", "l" ou "L" é usado de forma intercambiável. A vazão específica no método da presente invenção pode variar dentro de um intervalo ou permanecer substancialmente fixa durante a duração do processo de filtração usando um dado filtro de vírus. Em uma modalidade da presente invenção, a vazão específica pode variar de cerca de 5 L/(m² x h) até cerca de 500 L/(m² x h) durante pelo menos 24 horas até cerca de 7 meses. O limite inferior do fluxo pode ser cerca de 5 L/(m² x h) ou cerca de 10 L/(m² x h). O limite superior pode ser cerca de 25 L/(m² x h), cerca de 75 L/(m² x h), cerca de 100 L/(m² x h), cerca de 200 L/(m² x h), cerca de 250 L/(m² x h), cerca de 300 L/(m² x h) ou cerca de 500 L/(m² x h). O fluxo pode adicionalmente variar de cerca de 5 L/(m² x h) até cerca de 100 L/(m² x h), de cerca de 10 L/(m² x h) até cerca de 100 L/(m² x h) ou de cerca de 10 L/(m² x h) até cerca de 25 L/(m² x h).

[0046] "Filtração em lote" também conhecida como "filtração em lotes" ou filtração feita no modo de lote, refere-se aqui a um processo no qual uma quantidade total específica ou volume de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, é filtrado através de um filtro de vírus em um lote, dependendo da capacidade do filtro do vírus, e em que o processo de filtração é finalizado antes de o filtrado ser direcionado ou alimentado para o processo no qual ele é utilizado ou consumido.

[0047] O termo "filtração contínua" ou "filtração em linha", ou "filtração na linha" refere-se a um processo de filtração em que a quantidade total específica ou o volume de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, é filtrado através do filtro de vírus continuamente, dependendo da capacidade do filtro de vírus e em que o processo de filtração está ainda em andamento

quando o filtrado já é dirigido ou alimentado no processo no qual ele é utilizado ou consumido.

[0048] Todas as modalidades da presente invenção podem ser realizadas usando a filtração em lote ou contínua. O efeito benéfico da invenção já é alcançado submetendo uma preparação, sendo um meio de cultura de células celular ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, à filtração durante pelo menos 24 horas através de um filtro de vírus tendo um tamanho de poro efetivo de no máximo 75 nm, a fim de remover um contaminante viral da dita preparação.

[0049] Em uma modalidade preferencial de acordo com a invenção, o método para a remoção de um contaminante viral de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, em que a dita preparação é submetida à filtração durante pelo menos cerca de 24 horas através de um filtro de vírus com um tamanho de poro efetivo máximo de 75 nm, é realizado como uma filtração contínua. Esse modo de operação tem a vantagem de que o filtrado produzido da preparação pode ser diretamente e continuamente alimentado ao processo onde ele é utilizado ou consumido. Em uma outra modalidade preferencial, a preparação filtrada de vírus, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células, pode alimentar de modo direto e contínuo um biorreator, mais preferencialmente um biorreator de grande escala usado em um processo de cultura de células continuamente alimentado, por exemplo, um processo de quimiostato, um processo de perfusão ou processo de lote alimentado. Essa modalidade é realizada em uma modalidade usando uma pressão de cerca de 100 kPa a 200 kPa (1.000 mbar a 2.000 mbar) e uma temperatura de 10°C a 40°C, onde a capacidade volumétrica é igual a pelo menos 2.000 L/m² ou pelo menos 5.000 L/m². Além disso, é adicionalmente preferido que a filtração de vírus da preparação seja realizada durante pelo menos cerca de 24 horas ou cerca de 48 horas até

cerca de 7 meses, de modo mais preferencial durante pelo menos cerca de uma semana até cerca de 5 meses e, mais preferencialmente, durante pelo menos cerca de uma a cerca de 3 semanas ou cerca de 3 semanas a cerca de 3 meses e, ainda mais preferencialmente, de pelo menos cerca de 2 a cerca de 3 meses. Obviamente, todos os outros parâmetros também podem ser combinados com essa modalidade. Além disso, é preferível que a preparação a ser filtrada seja um meio de cultura de células e o modo de filtração seja uma filtração de modo contínuo.

[0050] Claramente, uma pessoa versada na técnica sabe que as preparações filtradas de vírus que podem ser obtidas de acordo com qualquer um dos métodos de acordo com a invenção também podem ser direcionadas ou alimentadas para outros processos de produção relacionados à cultura de células; preparações farmacêuticas, de diagnóstico e/ou cosméticas, bem como às preparações alimentícias. Também nessas modalidades, uma filtração contínua das preparações é preferencial.

[0051] Portanto, a invenção também se refere ao uso de uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um componente de um meio de cultura de células que pode ser obtido de acordo com qualquer um dos métodos de acordo com a invenção para a cultura de células; preparações farmacêuticas, de diagnóstico e/ou cosméticas, bem como preparações alimentícias.

[0052] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células a ter os vírus removidos por filtração é estéril, ou de outro modo, pré-tratado. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende proteínas animais ou soro ou outros componentes de origem animal, ou é isento de proteína animal, ou isento de soro, ou isento de componentes de origem animal, ou possuir qualquer combinação das características acima mencionadas. Em outras modalidades, o meio de cultura de células compreende várias concentrações e espécies de plantas ou hidrolisados

derivados microbianos, especialmente os hidrolisados de soja. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células é um meio isento de proteína animal que compreende várias concentrações de pelo menos um hidrolisado de soja. No entanto, deve se enfatizar que o método de acordo com a invenção é especialmente adequado para a filtração de vírus das preparações que compreendem proteína animal ou soro, ou outros componentes derivados de animais, a fim de melhorar ainda mais a segurança virológica dessas preparações, em particular quando usado em processos de cultura de células, em preparações farmacêuticas, de diagnóstico e/ou cosméticas ou em preparações alimentícias.

[0053] O "meio de cultura de células" é definido, para fins da invenção, como um meio adequado para o crescimento das células, e preferencialmente de células animais, mais preferencialmente de células de mamíferos, em cultura de células *in vitro*. Qualquer meio capaz de suportar o crescimento das células adequadas na cultura de células pode ser usado. O meio de cultura de células, de acordo com a invenção, pode ser baseado em qualquer meio basal, como DMEM, F12 de Ham, meio 199, McCoy ou RPMI, geralmente conhecido pelo profissional qualificado. O meio basal pode compreender vários ingredientes, incluindo aminoácidos, vitaminas, sais orgânicos e inorgânicos e fontes de carboidrato, com cada ingrediente estando presente em uma quantidade que suporta o cultivo de uma célula que é geralmente conhecida pela pessoa versada na técnica. O meio pode conter substâncias adjuvantes, como substâncias tampão como bicarbonato de sódio, antioxidantes, estabilizantes para neutralizar o estresse mecânico ou inibidores de protease. Se necessário, um tensoativo não iônico, tal como misturas de polietilenoglicóis e polipropilenoglicóis (por exemplo, Pluronic F68.RTM, SERVA) pode ser adicionado como um agente antiespumante.

[0054] Conforme utilizado na presente invenção, um "meio que compreende proteína animal" é um meio de cultura de células que

compreende qualquer proteína que foi derivada de uma fonte humana ou de uma fonte animal.

[0055] Conforme utilizado na presente invenção, um “meio isento de proteína” é um meio de cultura de células que é isento de qualquer proteína que tenha sido derivada de uma fonte humana ou de uma fonte animal.

[0056] O termo "meio de cultura de células", de acordo com a invenção, refere-se a um meio que não contém proteínas e/ou componentes de eucariócitos não vegetais multicelulares superiores. Proteínas típicas que são evitadas são aquelas encontradas no soro e em substâncias derivadas do soro, tais como albumina, transferrina, insulina e outros fatores de crescimento. O meio de cultura de células isento de proteína animal também é isento de quaisquer produtos de origem animal purificados e produtos de origem animal recombinantes, bem como de produtos da digestão de proteína e os extratos dos mesmos, ou extratos lipídicos ou seus componentes purificados. Proteínas e componentes proteicos de origem animal devem ser distinguidos das proteínas que não são de origem animal, pequenos peptídeos e oligopeptídeos obtidos de plantas (geralmente com de 10 a 30 aminoácidos de comprimento), tais como de soja e eucariotos inferiores, como a levedura, que pode ser incluída no meio de cultura de células isento de proteína animal de acordo com a invenção.

[0057] O termo “hidrolisado” inclui qualquer produto da digestão de um material fonte de origem animal ou de origem vegetal, ou extratos derivados de levedura ou bactérias. No meio de cultura de células de acordo com a invenção, "hidrolisado de soja" pode ser compreendido que pode ser um hidrolisado de soja altamente purificado, um hidrolisado de soja purificado ou um hidrolisado de soja bruto.

[0058] O termo "compreendendo soro", conforme aplicado ao meio, inclui qualquer meio de cultura de células que contém soro.

[0059] O termo "isento de soro", conforme aplicado ao meio, inclui

qualquer meio de cultura de células que não contém soro. Por "isento de soro" entende-se que o meio tem preferencialmente menos de 0,1% de soro e, mais preferencialmente, menos de 0,01% de soro. O termo "soro" refere-se à porção fluida do sangue obtido após a remoção do coágulo de fibrina e das células sanguíneas.

[0060] Em algumas modalidades, o filtrado ou o fluxo do filtrado obtido do processo de filtração é alimentado a uma cultura de células de grande escala e ao biorreator, respectivamente. Uma cultura de células de "grande escala", conforme utilizado na presente invenção, refere-se a uma cultura de células em uma escala de pelo menos cerca de 100 L, pelo menos cerca de 200 L, pelo menos cerca de 300 L, pelo menos cerca de 400 L, pelo menos cerca de 500 L, pelo menos cerca de 1.000 L, pelo menos cerca de 1.500 L, pelo menos cerca de 2.000 L, pelo menos cerca de 2.500 L, pelo menos cerca de 3.000 L, pelo menos 4.000 L, pelo menos cerca de 5.000 L, pelo menos cerca de 7.500 L, pelo menos cerca de 10.000 L ou pelo menos cerca de 20.000 L. Em uma modalidade preferencial, o fluxo de filtrado obtido em qualquer método de acordo com a invenção é alimentado a um biorreator usado em um processo quimiostato, um processo de perfusão ou um processo de lote alimentado, preferencialmente por filtração contínua.

[0061] A cultura de células contemplada na presente invenção pode ser qualquer cultura de células independentemente do tipo e da natureza das células cultivadas e da fase de crescimento das células cultivadas, por exemplo, células aderentes ou não aderentes; células em crescimento ou com crescimento interrompido.

[0062] O termo "estéril", como usado de acordo com a invenção, refere-se a uma substância que é isenta, ou essencialmente isenta de contaminação microbiana e/ou viral. Sob esse aspecto, o "contaminante" significa um material que é diferente dos componentes desejados em uma preparação, sendo um meio de cultura de células ou pelo menos um

componente de um meio de cultura de células. No contexto da "filtração estéril", o termo filtração estéril é uma descrição funcional que uma preparação é filtrada através de um filtro estéril para remover os contaminantes bacterianos e/ou micoplasma.

[0063] O termo "filtração de vírus" é usado, na presente invenção, de forma intercambiável com o termo "nanofiltração" e significa que, para o processo de filtração, um filtro de vírus é usado tendo um tamanho de poro eficaz definido. Em geral, aqueles filtros são dedicados para remover vírus.

[0064] O contaminante viral orientado para a remoção por filtração, de acordo com todos os métodos da invenção, pode ser qualquer vírus presentemente conhecido na técnica, ou a ser descoberto no futuro. Essa definição inclui também um potencial contaminante viral a ser removido por filtração e também inclui que mais de um vírus é removido pelos métodos da presente invenção. Por exemplo, o contaminante viral ou o contaminante viral potencial pode ser um membro das famílias de vírus de *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Arteriviridae*, *RetParvoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae*, *Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae* ou *Reoviridae*. Mais especificamente, o contaminante viral pode ser qualquer um do grupo consistindo em parvovírus canino (CPV), vírus minuto do camundongo (MVM), vírus Cache Valley, vírus Bunyamwera, vírus da encefalite de Northway, vírus influenza A/B, vírus de Junin, vírus parainfluenza 1/2/3, vírus símio 5, vírus da caxumba, vírus sincicial respiratório bovino, vírus Sendai, vírus da doença de Newcastle, vírus da pneumonia de camundongos, vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva, coronavírus bovino, vírus da hepatite de murino, vírus da febre amarela, vírus do oeste do Nilo, vírus da dengue, vírus da encefalite transmitida por carrapato, vírus da encefalite de St. Louis, vesivírus 2117, vírus da encefalomiocardite, vírus Coxsackie B-3,

vírus da encefalite do camundongo de Theiler, vírus da febre aftosa, enterovírus bovino, enterovírus suíno, vírus da floresta de Semliki, vírus sindbis, vírus da rubéola, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite equina oriental, vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos, vírus espumoso, reovírus 1/2/3, reovírus aviário, rotavírus, circovírus suíno tipo 1, adenovírus, vírus da pseudorraiva, herpes vírus gama-murino 68, vírus herpes simplex tipo 1, vírus do sapo tipo 3, vírus minuto do camundongo-cortador (MVMc), vírus da febre catarral ovina (BTV), vírus da doença epizootica hemorrágica (EHDV), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), parvovírus suíno (PPV), vírus da encefalomiocardite (EMCV), reovírus 3 e o vírus da leucemia de murino (MuLV), da hepatite A, poliomielite ou parvoviridae B19.

[0065] O termo "filtro de vírus" é usado de forma intercambiável na presente invenção, com os termos "filtro de concentrado de vírus", "filtro de vírus" e "nanofiltro", e refere-se, em geral, a um filtro com características que, como um todo, o torna adequado para retenção de vírus, tendo um tamanho de poro eficaz para cumprir essa função. Essas características incluem, a título de exemplo, atributos de membrana como a morfologia, forma dos poros, densidade de poros e uniformidade, tamanho de poro efetivo, espessura da membrana, etc. As membranas de filtro de vírus úteis na presente invenção abrangem as membranas que operam por exclusão de tamanho e carga, possivelmente juntamente com a retenção adsortiva. Mecanismos de exclusão de tamanho e retenção adsortiva não são necessariamente exclusivos um do outro, e um filtro pode empregar bem um ou mais mecanismos.

[0066] O filtro de vírus, conforme definido na presente invenção e utilizado em uma modalidade da presente invenção, é caracterizado por ter uma membrana com um tamanho de poro efetivo de no máximo 75 nm. Em uma modalidade de acordo com a invenção, o limite inferior do tamanho de

poro efetivo é igual a cerca de 5 nm, cerca de 10 nm, cerca de 15 nm, cerca de 20 nm, cerca de 25 nm, cerca de 30 nm, cerca de 35 nm, cerca de 50 nm ou cerca de 60 nm. Na dita modalidade de acordo com a invenção, o limite superior do tamanho de poro efetivo é igual a cerca de 10 nm, cerca de 15 nm, cerca de 20 nm, cerca de 25 nm, cerca de 35 nm, cerca de 50 nm, cerca de 60 nm ou cerca de 75 nm. Em algumas modalidades da invenção, o filtro de vírus tem um tamanho de poro efetivo de cerca de 5 a cerca de 75 nm, ou de cerca de 10 a cerca de 75 nm ou de cerca de 15 a cerca de 75 nm, ou de cerca de 20 a cerca de 75 nm ou de cerca de 15 a cerca de 50 nm, ou de cerca de 15 a cerca de 35 nm.

[0067] O tamanho de poro efetivo, conforme utilizado na presente invenção, é uma característica de uma membrana e refere-se ao tamanho de uma partícula que pode ser efetivamente retida pela membrana, considerando que o nível de eficácia é descrito por um fator de redução logarítmica de uma partícula de tal tamanho.

[0068] O filtro de vírus usado nos métodos da presente invenção pode ser qualquer filtro tendo uma construção suficiente para suportar uma capacidade volumétrica igual a pelo menos cerca de 2.000 L/m², ou pelo menos cerca de 3.000 L/m², ou pelo menos cerca de 4.000 L/m², ou pelo menos cerca de 5.000 L/m², ou pelo menos cerca de 7.500 L/m² ou pelo menos cerca de 10.000 L/m² ou pelo menos cerca de 20.000 L/m², ou que pode ser operado por um período de tempo de mais de cerca de 24 horas até cerca de 7 meses, ou de preferência durante pelo menos cerca de 48 horas, cerca de 72 horas, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 4 meses, cerca de 5 meses, cerca de 6 meses ou cerca de 7 meses.

[0069] Naturalmente, se mais de um filtro é usado em um método de acordo com a invenção, também diferentes tipos de filtros de vírus podem ser

usados e combinados no processo de filtração, de preferência em paralelo ou em série.

[0070] O filtro de vírus exemplar compreende uma membrana com uma ou múltiplas camadas, e é construído de material, tal como fluoreto de polivinilideno (PVDF), celulose, celulose modificada, por exemplo, fibras com orifícios de celulose regenerada com cupramônio ou polietersulfona. As membranas dos filtros de vírus podem ter uma carga positiva, negativa ou neutra. As membranas podem ser membranas iônicas, ou seja, elas podem conter grupos aniônicos ou catiônicos, mas membranas neutras podem ser preferidas, dependendo das condições de pH. As membranas de filtro de vírus podem ser selecionadas dentre membranas hidrofóbicas e hidrofílicas. Em uma modalidade preferencial, a membrana do filtro de vírus usado no método de acordo com a invenção é feita a partir de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou polietersulfona.

[0071] Os fabricantes de filtros exemplares, tendo demonstrado a capacidade de remover vírus, incluem, sem exclusão, Asahi/Planova, PALL, Millipore, Sartorius, Gambro e Amersham/AG Technology. Os filtros adequados para uso na presente invenção incluem, sem limitação, o filtro 15 N da Asahi Planova (Asahi Kasei Corporation, Divisão Planova), o filtro Planova 20 N (Asahi Kasei Corporation, Divisão Planova), o filtro Planova 35 N (Asahi Kasei Corporation, Divisão Planova) e o filtro BioEX (Asahi Kasei Corporation, Divisão Planova).

[0072] Naturalmente, é desejável que o filtro usado em um dos métodos da presente invenção seja autoclavável e/ou autoclavado e/ou, de outra forma, esterilizado antes de usar. No entanto, todas as outras possibilidades para garantir a esterilidade do filtro de vírus usado são adequadas para realizar a invenção. Além disso, é desejável que o filtro possa ser testado quanto à integridade antes do uso e/ou após o uso. Em uma modalidade preferencial, no método de acordo com a invenção, um filtro de

vírus testado quanto à integridade autoclavado é usado, com uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou polietersulfona.

[0073] "Filtrado", usado de forma intercambiável na presente invenção com o termo "permeado", refere-se à solução que atravessa um filtro ou membrana, bem como a solução que atravessou um filtro ou membrana.

[0074] "Concentrado", conforme utilizado na presente invenção, refere-se ao componente da solução que é retido e não atravessa um filtro ou membrana, bem como aquele que não atravessou um filtro ou membrana.

[0075] O equipamento de filtração de vírus útil na presente invenção compreende pelo menos um elemento de membrana de filtração de vírus dividindo a alimentação em uma pré e pós-seção de filtro. O equipamento de filtração tipicamente inclui também os meios para controlar a pressão e o fluxo, tais como bombas e válvulas, e medidores de vazão e pressão e medidores de densidade. O equipamento também pode incluir vários elementos de membrana de filtração em diferentes combinações, dispostas em paralelo ou série, ou ambos.

[0076] O fluxo de filtração varia de acordo com a pressão. Em geral, em uma faixa de operação normal, quanto maior a pressão, maior é o fluxo. O fluxo também varia com a temperatura. Um aumento da temperatura operacional aumenta o fluxo. No entanto, com temperaturas mais altas e com pressões mais elevadas, há uma maior tendência para uma ruptura de membrana. Para as membranas inorgânicas, temperaturas e pressões mais altas e intervalos de pH mais altos podem ser usados do que para as membranas poliméricas.

[0077] Para uma pessoa versada na técnica, é claramente evidente que, ao invés de um filtro de vírus de acordo com a invenção, um filtro pode ser usado tendo um peso molecular de corte menor que cerca de 5.000 Daltons ou menor que cerca de 1.000 Daltons, para remover também os vírus. Nesse contexto, "peso Molecular de corte" (MWCO) é uma característica da

membrana de um filtro que especifica o peso molecular médio dos solutos, no entanto, também as partículas ou vírus não irão permear a membrana desse filtro.

[0078] O valor de pH no processo de filtração de vírus da presente invenção pode ser definido em qualquer intervalo necessário para preservar a estabilidade e a funcionalidade da preparação sendo filtrada, preferencialmente de um meio de cultura de células ou tampão. Por exemplo, o valor de pH pode ser fixado em cerca de 1 a cerca de 10, preferencialmente de cerca de 2 a cerca de 8 ou de cerca de 3 a cerca de 7, preferencialmente de cerca de 6,8 a cerca de 8 ou, mais preferencialmente, em 7,0 até cerca de 7,45 (valor de pH fisiológico).

[0079] Também é contemplado que o método de acordo com a invenção pode ser integrado em um sistema a jusante de um filtro de grau esterilizante que remove os contaminantes bacterianos e, dessa forma, produz um fluxo de alimentação estéril de uma preparação que pode ser a "preparação inicial", ou seja, a preparação sendo usada em qualquer método de acordo com a invenção.

[0080] Em uma modalidade, o método da invenção pode ser realizado usando dois ou mais filtros dispostos em série. Isso tem a vantagem de aumentar a capacidade de depuração de vírus e salvaguardar contra a falha do filtro de vírus potencial ou rompimento. Em modalidades alternativas, a filtração é realizada usando dois ou mais filtros de vírus dispostos em paralelo, desse modo permitindo a substituição do filtro de vírus sem interromper um processo contínuo e evitando retenções de meio imprevisíveis, devido ao entupimento.

[0081] Em ainda outras modalidades, a filtração é realizada usando pelo menos dois filtros dispostos em paralelo em um sistema de tubulação que compreende uma junção conformada em Y, em que cada filtro está em comunicação fluida com uma ramificação da junção conformada em Y e uma

fonte de alimentação de preparação. Em algumas modalidades, a junção conformada em Y compreende um conector. Em outras modalidades, a filtração é realizada usando uma configuração contendo uma pluralidade de filtros dispostos em série e em paralelo. É especialmente útil no contexto da presente invenção uma disposição em que pelo menos um segundo filtro está disposto em paralelo juntamente com outros filtros paralelos ou filtros dispostos em série, a fim de ter a possibilidade de substituir um dos filtros sem interromper o processo de filtração por motivos de manutenção.

[0082] Em algumas modalidades, o filtro é submetido a um teste de integridade antes de usar. O teste de integridade pode assumir a forma de um teste baseado em difusão de ar-água, em que o ar é direcionado para o filtro e este é, em seguida, submerso em água estéril e examinado quanto a presença de bolhas, que indicariam um vazamento no filtro.

[0083] Em uma modalidade, o filtro de vírus ou a membrana de filtro de vírus pode ser pré-tratado antes do procedimento de filtração de vírus, por exemplo, por lavagem com um agente de lavagem, em particular com um agente de lavagem ácido, agentes de lavagem alcalinos e/ou etanol.

[0084] Em uma modalidade da invenção, também a filtração de fluxo tangencial pode ser realizada no método de acordo com a invenção. No contexto da presente invenção "filtração de fluxo tangencial", é usado de forma intercambiável na presente invenção com o termo "filtração cruzada". No modo de fluxo tangencial, o caminho do fluxo de líquido do lado a montante do filtro é direcionado aproximadamente paralelo ou tangencial a ou através da superfície do filtro. A passagem do permeado é facilitada restringindo o fluxo do concentrado em relação à alimentação, resultando em uma contrapressão no sistema e permitindo que a migração do permeado através da membrana de filtro. A constante de varredura constante pela superfície da membrana tem o efeito de minimizar o entupimento por contaminantes no produto sendo filtrado. Qualquer filtro de vírus atinge pelo

menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 1 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 2 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 3 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 4 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 5 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 6 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 7 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 8 para um contaminante viral, preferencialmente pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 4 para um contaminante viral. Todos os fatores de redução logarítmica podem se aplicar para qualquer um dos tamanhos de poro eficazes de tamanho máximo igual a 75 nm do filtro de vírus. Em uma modalidade de acordo com a invenção, o limite inferior do tamanho de poro efetivo é igual a cerca de 5 nm, cerca de 10 nm, cerca de 15 nm, cerca de 20 nm, cerca de 25 nm, cerca de 30 nm, cerca de 35 nm, cerca de 50 nm ou cerca de 60 nm. Na dita modalidade de acordo com a invenção, o limite superior do tamanho de poro efetivo do filtro de vírus é igual a cerca de 10 nm, cerca de 15 nm, cerca de 20 nm, cerca de 25 nm, cerca de 35 nm, cerca de 50 nm, cerca de 60 nm ou cerca de 75 nm. Em algumas modalidades da invenção, o filtro de vírus tem um tamanho de poro efetivo de cerca de 5 a cerca de 75 nm, ou de cerca de 10 a cerca de 75 nm ou de cerca de 15 a cerca de 75 nm, ou de cerca de 20 a cerca de 75 nm ou de cerca de 15 a cerca de 50 nm, ou de cerca de 15 a cerca de 35 nm.

[0085] Em algumas modalidades da presente invenção, a filtração em fluxo normal é usada. "Filtração em fluxo normal", usado de forma intercambiável na presente invenção com os termos "terminal", "de passagem

única" e "filtração de fluxo direto" refere-se a um processo de filtração com filtro de vírus no qual o caminho de fluxo de líquido é direcionado normalmente perpendicular à superfície do filtro, dependendo da construção do módulo do filtro, o fluxo de fluido também poderia ser direcionado tangencial à membrana de filtro, no entanto, ao contrário da filtração cruzada, nenhuma recirculação de concentrado é aplicada, o que significa que a vazão específica antes e depois do filtro é idêntica. Qualquer filtro de vírus atinge pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 1 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 2 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 3 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 4 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 5 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 6 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 7 para um contaminante viral, ou pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 8 para um contaminante viral, preferencialmente pelo menos uma redução logarítmica de base 10 (LRV) no valor igual a 4 para um contaminante viral. Todos os fatores de redução logarítmica podem se aplicar para qualquer um dos tamanhos de poro eficazes de tamanho máximo igual a 75 nm do filtro de vírus. Em uma modalidade de acordo com a invenção, o limite inferior do tamanho de poro efetivo é igual a cerca de 5 nm, cerca de 10 nm, cerca de 15 nm, cerca de 20 nm, cerca de 25 nm, cerca de 30 nm, cerca de 35 nm, cerca de 50 nm ou cerca de 60 nm. Na dita modalidade de acordo com a invenção, o limite superior do tamanho de poro efetivo do filtro de vírus é igual a cerca de 10 nm, cerca de 15 nm, cerca de 20 nm, cerca de 25 nm, cerca de 35 nm, cerca de 50 nm, cerca de 60 nm ou cerca de 75 nm. Em algumas modalidades

da invenção, o filtro de vírus tem um tamanho de poro efetivo de cerca de 5 a cerca de 75 nm, ou de cerca de 10 a cerca de 75 nm ou de cerca de 15 a cerca de 75 nm, ou de cerca de 20 a cerca de 75 nm ou de cerca de 15 a cerca de 50 nm, ou de cerca de 15 a cerca de 35 nm.

[0086] Conforme as pessoas normalmente versadas na técnica compreenderão, todas as modalidades da invenção podem ser implementadas com o auxílio de qualquer sistema disponível tecnicamente útil para a finalidade, por exemplo, uma bomba peristáltica de velocidade variável ou de velocidade fixa, uma bomba centrífuga, etc. Qualquer tipo de recipiente pressurizado ou outro recipiente pode ser usado para gerar o fluxo através do filtro de vírus com pressão constante ou variável durante o processo de filtração.

[0087] As pessoas normalmente versadas na técnica compreenderão que a escolha do tipo de filtro e do modo do mesmo (filtração convencional ou filtração de fluxo tangencial) dependerá de fatores tais como a composição, o teor de proteína, a distribuição de peso molecular, a carga de impurezas/partículas ou qualquer outra propriedade física ou bioquímica na alimentação a ser processada, os requisitos e limitações do processo (pressão admissível, tempo de processo, volumes a serem filtrados) ou características do contaminante viral potencial, por exemplo, o tamanho do vírus. A disponibilidade de um teste de integridade no processo e estudos de logística da depuração do vírus também devem ser levados em consideração. A filtração convencional deveria ser tipicamente empregada para fluxos de alimentação de alta pureza para produzir um fluxo de processo razoável, enquanto que, em algumas modalidades, a filtração de fluxo tangencial pode acomodar fluxos de alimentação com alta carga de partículas. Em algumas modalidades preferenciais, a filtração em fluxo normal é preferencial juntamente com um modo de filtração contínuo, usando pelo menos um filtro de vírus com um tamanho de poro efetivo de no máximo 75 nm.

Naturalmente, essa modalidade também pode ser combinada com todos os outros parâmetros da presente invenção.

[0088] Naturalmente, deve ser compreendido que essa invenção não se limita às modalidades particulares descritas, uma vez que as mesmas podem, naturalmente, variar. É também para se compreendido que a terminologia usada neste documento tem o propósito de apenas descrever modalidades particulares, e não se destina a limitar o escopo da presente invenção, que será limitado apenas pelas reivindicações em anexo.

[0089] Onde é fornecido um intervalo de valores, entende-se que cada valor intermediário, até o décimo da unidade do limite inferior, a menos que o contexto claramente afirme de outro modo, entre o limite superior e o limite inferior daquele intervalo e qualquer outro valor declarado ou intermediário naquele intervalo declarado, é englobado na divulgação. Os limites superior e inferior desses intervalos menores podem ser independentemente incluídos nos intervalos menores, e também estão englobados na divulgação, sujeitos a qualquer limite especificamente excluído no intervalo indicado. Onde o intervalo indicado inclui um ou ambos os limites, os intervalos, excluindo um ou ambos os limites incluídos, também estão incluídos na invenção.

[0090] A menos que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que o comumente compreendido por uma pessoa versada na técnica a que esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes a aqueles descritos neste documento podem ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos serão agora descritos.

[0091] Todas as publicações e patentes citadas nesse relatório descritivo são incorporadas na presente invenção por referência, como se cada publicação ou patente individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por referência, e são incorporadas na presente

invenção por referência, para divulgar e descrever os métodos e/ou materiais em relação aos quais as publicações são citadas. A menção de qualquer publicação é para a sua divulgação antes da data de depósito, e não deve ser interpretada como uma admissão de que a presente divulgação não é passível de antedatar tal publicação em virtude da divulgação anterior. Além disso, as datas de publicação fornecidas poderiam ser diferentes das datas de publicação efetivas, que podem precisar ser independentemente confirmadas.

[0092] É observado que, conforme utilizado na presente invenção e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um" "uma" e "o/a" incluem referências no plural, a menos que o contexto claramente estabeleça de outra forma. É adicionalmente observado que as reivindicações podem ser redigidas para excluir qualquer elemento opcional. Como tal, essa declaração destina-se a servir como base antecedente para o uso de tal terminologia exclusiva como "unicamente," "apenas" e similares, juntamente com a citação dos elementos da reivindicação, ou o uso de uma limitação "negativa".

[0093] Como será evidente para as pessoas versadas na técnica ao ler essa divulgação, cada uma das modalidades individuais descritas e ilustradas na presente invenção tem componentes e características distintos que podem ser prontamente separados de ou combinados com os recursos de qualquer uma das outras várias modalidades, sem se afastar do escopo ou do espírito da presente divulgação. Qualquer método citado pode ser realizado na ordem dos eventos citados, ou em qualquer outra ordem que seja logicamente possível.

EXEMPLOS

[0094] São fornecidos abaixo exemplos para ilustrar a presente invenção. Esses exemplos não se destinam a restringir a presente invenção a qualquer aplicação específica ou teoria de operação.

Exemplo 1: Redução de escala da filtração de vírus com diferentes filtros de vírus e meios de cultura de células

[0095] As membranas de filtração de vírus de diferentes fabricantes

(consulte a tabela 2) foram avaliadas quanto às suas cinéticas de filtração em tamanhos de filtro diferentes, com os meios de cultura de células contendo uma concentração igual a 4 g/L concentração de hidrolisados de soja de diferentes lotes e fornecedores (consulte a tabela 3). A composição e a preparação dos meios de cultura de células são descritas no exemplo 2. Experimentos de filtração foram realizados controlando a pressão com um recipiente pressurizado (FIG. 3, FIG. 4, FIG. 5 e experimentos de fortificação na FIG. 7, FIG. 8 e FIG. 9), ou controlando a vazão, por exemplo, por meio de uma bomba peristáltica (FIG. 1, FIG. 2, FIG. 3 e FIG. 6). Outro equipamento utilizado para o controle de temperatura e pressão dos experimentos é descrito na tabela 4.

Tabela 2: Lista de filtros de vírus

| Código do filtro interno nas FIGS./exemplos | Fabricante/nome do produto/tamanho |
|---|---|
| Filtro A | Virosart CPV da Sartorius, 180 cm ² |
| Filtro B | Viresolve NFP da Millipore, 3,1 cm ² |
| Filtro C | Ultipor VF grau DV20 da Pall, 700 cm ² |
| Filtro D | BioEX da Asahi, 10 cm ² |
| Filtro E | Virosart CPV da Sartorius, 2000 cm ² |
| Filtro F | Viresolve NFP da Millipore, 850 cm ² |
| Filtro G | 15 N da Asahi, 10 cm ² |
| Filtro H | Ultipor VF grau DV20 da Pall, 9,6 cm ² |
| Filtro I | Virosart CPV da Sartorius, 5 cm ² |

Tabela 3: Lista de hidrolisados de soja

| Código do hidrolisado de soja interno nas FIGS./exemplos | Fabricante/nome do produto/número do lote interno |
|--|---|
| Hidrolisado de soja 1 | HyPep 1510 No.1 da Kerry |
| Hidrolisado de soja 2 | SE50 MAF UF No. 1 da DOMO |
| Hidrolisado de soja 3 | SE50 MAF UF No. 2 da DOMO |
| Hidrolisado de soja 4 | SE50 MAF UF No. 3 da DOMO |
| Hidrolisado de soja 5 | HyPep 1510 No. 2 da Kerry |
| Hidrolisado de soja 6 | SE50 MAF UF No. 4 da DOMO |
| Hidrolisado de soja 7 | SE50 MAF UF No. 5 da DOMO |

Tabela 4: Lista de equipamentos

| |
|--|
| WM Marprene mm de furo x mm de parede 3,2 x 1,6 e 1,6 x 1,6 (Watson Marlow) |
| Bombas peristálticas Watson Marlow 101U/R (Watson Marlow) |
| Recipiente de pressão da Sartorius modelo 17532 (Sartorius-Stedim) |
| Transdutores de pressão: Pascal Ci CL1010 (Labom) e KrosFlo ACPM-499-03N (Spectrum Labs) |
| Balança Sartorius FBG64EDE-SOCE (Sartorius Stedim) |
| Banho-maria Haake DC10 (Thermo Scientific) |
| Sensor de temperatura CEM IR-68, termômetro infravermelho flexível |

Exemplo 2: Preparação dos Meios de Cultura de Células

Uma descrição geral da composição dos meios de cultura de células é

fornecida na tabela 5 abaixo, com a composição dos diferentes hidrolisados de soja listados na tabela 3 acima. Os diferentes lotes dos meios de cultura de células foram esterilizados por filtração com um filtro de grau estéril, por exemplo, um cartucho de filtro de membrana Fluorodyne® II DJL da Pall de 0,1 μ antes das diferentes filtrações de vírus descritas nos exemplos. As preparações dos meios descritas aqui foram usadas para todos os experimentos descritos e mostrados na FIG. 1 até a FIG. 11.

Tabela 5: Composição dos meios

| Componente | Concentração [g/Kg] |
|----------------------------------|---------------------|
| DMEM/HAMS F12 | 11,76 |
| Etanolamina | 0,00153 |
| Lutrol F68 | 0,25 |
| Hidrolisado de soja | 4,0 |
| Elemento traço – solução estoque | Máx. de 4 μ g/L |
| L-glutamina | 0,6 |
| NaHCO ₃ | 2,0 |
| Água purificada | Até completar 1 Kg |

Exemplo 3: Preparação do filtro:

[0096] Os filtros de vírus foram preparados de acordo com os manuais do produto dos fabricantes de filtro de vírus. A menos que os filtros foram fornecidos e montados de maneira estéril, os filtros foram autoclavados a $> 121^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

Exemplo 4: Teste de Integridade

[0097] Após o uso, filtros de tamanho apropriado (filtros A, C, E e F da Tabela 2) foram lavados de acordo com as respectivas recomendações do fabricante Um teste de fluxo normal foi realizado com o Flowstar XC da Palltronic (Pall, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Todos os testes de integridade realizados após experimentos de filtração descritos na presente invenção estavam em conformidade com os limites especificados.

Exemplo 5: Relação proporcional entre a pressão diferencial e o fluxo

[0098] Para investigar a relação entre a pressão diferencial e a vazão volumétrica, o meio de cultura de células foi submetido à filtração usando filtros de vírus autoclavados em temperatura ambiente. O meio foi colocado em um recipiente de pressão e os filtros de vírus foram conectados ao

recipiente de pressão, que foi, em seguida, pressurizado em diferentes níveis. A vazão específica e as pressões diferenciais foram medidas com uma balança e um transdutor de pressão e anotadas ao longo do tempo (FIG. 3).

Exemplo 6: Modelo de Sistema de Fermentação de Escala Reduzida de 10 L

[0099] Uma comparação dos meios de cultura de células com e sem filtração de vírus foi realizada usando uma proteína recombinante expressando o sistema de fermentação de células CHO (FIG. 6). O desempenho em relação à taxa de crescimento e o rendimento foi investigado. O meio de cultura de células, conforme descrito no exemplo 2, foi preparado. Uma parte do experimento foi realizada apenas com meio filtrado estéril, enquanto que a outra parte foi realizada com o mesmo meio e uma filtração de vírus adicional, usando um Virosart CPV da Sartorius, de 180 cm². A filtração foi realizada a 2 a 8°C. O experimento de fermentação foi realizado em biorreatores de bancada de 10L tipo agitados Rushton, com pH, pO₂ e temperatura controlados em linha. Os pontos de ajuste do parâmetro e os intervalos para a fermentação foram os seguintes:

pH: 7,05 (6,8 a 7,3)

T: 37,0°C (35 a 39°C)

DO: 20% (saturação de ar) (10 a 60%)

[00100] As células foram cultivadas em modo de lote, seguido por uma cultura quimiostata usando os meios com e sem filtração de vírus adicional. Os dados do modo quimiostato (taxas de crescimento e produtividade) foram gerados a partir de uma cultura de células contínua de 4 semanas.

[00101] As contagens de células foram determinadas por medição CASY. Na cultura do quimiostato, a taxa de crescimento específica (μ) foi calculada por:

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

onde D é a taxa de diluição, calculada como a razão da taxa de alimentação de meio por dia e o volume de trabalho [1/d]. As taxas de crescimento foram

calculadas a partir das contagens de células homogeneizadas CASY.

[00102] Para a análise bioquímica, a suspensão homogênea foi centrifugada com 400 x g em um Multifuge 1 S-R da Heraeus durante 10 min, e alíquotas de 1,0 mL foram preparadas em tubos Eppendorf e armazenadas a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes isentos de células foram analisados quanto à atividade de uma proteína recombinante expressa por um ensaio cromogênico, de acordo com os procedimentos operacionais padrão.

[00103] A produtividade volumétrica P neste experimento foi calculada por:

$$P \text{ [U / (L x d)]} = \text{atividade [mU/mL]} * \text{taxa de diluição [d}^{-1}\text{]}$$

[00104] A produtividade de célula específica qP foi calculada por:

$$qP \text{ [mU / (10E06 células x d)]} = P \text{ [U / (L x d)]} / \text{contagem de células [10E06 células/mL]}$$

Exemplo 7: Modelo de Sistema de Fermentação de Escala Reduzida de 120 L

[00105] Uma técnica de filtração de vírus contínua foi realizada em um volume de trabalho de 120 L de meio, antes de sua adição a uma proteína recombinante expressando o sistema de fermentação de células CHO foi investigada em relação ao seu efeito sobre a taxa de crescimento e rendimentos (FIG. 6A, FIG. 6B e FIG. 6C). O estudo comparou os processos de produção usando três variações dos mesmos meios de cultura de células: a) meio padrão; b) meio padrão filtrado usando filtros de vírus CPV Virosart; e c) meio padrão filtrado usando filtros de vírus Viresolve NF da Millipore.

[00106] Durante o processo de produção contínua, os dois diferentes filtros de vírus (CPV Midicap da Virosart, tamanho 2000 cm² e Viresolve NFP da Millipore, tamanho 850 cm²) foram usados como alternativa para intervalos de tempo diferentes. O filtro CPV da Sartorius foi usado a partir do dia de cultura K00-K14, K23-K30 e K39-K63, e o filtro NFP da Millipore foi usado a partir do dia de cultura K14-K23 e K30-K39.

[00107] Os pontos de ajuste do parâmetro e os intervalos para a

fermentação foram os seguintes:

pH: 7,05 (6,8 a 7,3)

T: 37,0°C (35 a 39°C)

DO: 20% (saturação de ar) (10 a 60%)

Amostragem e Análise

[00108] As contagens de células foram determinadas pelo sistema de contagem de células e analisador CASY ®. Para análise bioquímica, a suspensão homogênea foi centrifugada com 400 g em um Multifuge 1 S-R da Heraeus (Thermo Scientific, EUA) durante 10 min. Os sobrenadantes isentos de células foram analisados quanto à atividade de uma proteína recombinante expressa por um ensaio cromogênico.

[00109] Na cultura do quimiostato, a taxa de crescimento específica (μ) foi calculada por:

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

onde D é a taxa de diluição, calculada como a razão da taxa de alimentação de meio por dia e o volume de trabalho [1/d]. As taxas de crescimento são calculadas a partir das contagens de células homogeneizadas CASY.

[00110] A produtividade volumétrica P neste experimento foi calculada por:

$$P [U / (L * d)] = \text{atividade [mU/mL]} * \text{taxa de diluição [d-1]}$$

[00111] A produtividade de célula específica qP foi calculada por:

$$qP [mU / (10E06 \text{ células} \times d)] = P [U / (L \times d)] / \text{contagem de células [10E06 células/mL]}$$

Exemplo 8: Filtração de vírus com os filtros de vírus Planova 15N, da ASAHI

[00112] Meio contendo hidrolisado de soja (SE50 MAF No. 5, da DOMO) foi fortificado com MMV e colocado em um tanque conectado a uma fonte de gás nitrogênio pressurizado. O material fortificado com MMV passou por uma configuração em linha de filtro de vírus Planova 15N da ASAHI, de 10 cm², em modo convencional a uma pressão constante de 110

kPa (1.100 mbar) (ponto de ajuste). Os valores mínimo e máximo dos seguintes parâmetros foram medidos e registrados continuamente: pressão de alimentação; alimentação, filtrado e temperatura ambiente e peso de filtrado (a alteração dos quais foi usada para calcular a vazão do filtrado). As amostras foram coletadas diariamente durante até 7 dias e analisadas quanto ao título viral de MMV (FIG. 7).

Exemplo 9: Filtração de vírus com os filtros de vírus Planova BioEX, da ASAHI

[00113] Meio contendo hidrolisado de soja (análise No. 1 com hidrolisado de soja DMV SE50 MAF UF No. 5); Análise No. 2 com hidrolisado de soja SDMV SE50 MAF UF No. 4) foram fortificados com MMV e colocados em um tanque conectado a uma fonte de gás nitrogênio pressurizada. O material fortificado com MMV passou por uma configuração em linha de filtro de vírus BioEX da Planova, de 10 cm², em modo convencional a uma pressão constante de 200 kPa (2.000 mbar) (ponto de ajuste). Os valores mínimo e máximo dos seguintes parâmetros foram medidos e registrados continuamente: pressão de alimentação; alimentação, filtrado e temperatura ambiente e peso de filtrado (a alteração dos quais foi usada para calcular a vazão do filtrado). As amostras foram coletadas diariamente durante 5 dias e analisadas quanto ao título viral de MMV (FIG. 8).

Exemplo 10: Resumo da filtração de vírus

[00114] Meio de cultura de células contendo diferentes hidrolisados de soja foi fortificado com MMV e colocado em um tanque conectado a uma fonte de gás nitrogênio pressurizado. Diferentes filtros de vírus foram usados juntamente com os diferentes hidrolisados de soja, conforme listado na tabela 6:

Tabela 6: Combinação dos filtros de vírus e hidrolisados de soja usados nos experimentos de fortificação

| No. do Experimento | Filtro | Lote de hidrolisado de | Tempo de análise |
|--------------------|--------|------------------------|------------------|
|--------------------|--------|------------------------|------------------|

| | | soja | [dias] |
|---|---|------|--------|
| 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 |

[00115] As filtrações foram configuradas em modo convencional a uma pressão constante de 200 kPa (2 bar) (ponto de ajuste) para todas as análises, exceto para as análises dos experimentos Nos. 5 e 6, que foram realizadas a uma pressão constante de 110 kPa (1,1 bar) (ponto de ajuste). Os valores mínimo e máximo dos seguintes parâmetros foram medidos e registrados continuamente: pressão de alimentação; alimentação, filtrado e temperatura ambiente e peso de filtrado (a alteração dos quais foi usada para calcular a vazão do filtrado). As amostras foram amostradas durante o tempo de análise do experimento e analisadas quanto ao título viral de MMV. As reduções logarítmicas globais foram calculadas pela diferença entre a carga de infecciosidade de vírus total no filtrado e a carga de infecciosidade de vírus total antes da filtração (FIG. 9).

Exemplo 11: Filtração de longo prazo com fortificação de vírus MMV

[00116] O meio de cultura de células, conforme descrito no exemplo 2, foi fortificado com MMV até um título de 5,0 [\log_{10} (TCID₅₀/mL)] e submetido a uma filtração de longo prazo durante 30 em um filtro de vírus de tamanho de poro igual a 20 nm (Visrosart CPV da Sartorius, 5 cm²). A filtração foi realizada com uma configuração comparável ao exemplo 9 e ao exemplo 10, mas com pressão constante de 100 kPa (1,1 bar) (intervalo especificado: 80 kPa a 120 kPa (0,8 bar a 1,2 bar)) e com interrupções regulares de pressão e fluxo para desafiar o filtro de vírus. As vazões durante o experimento foram anotadas e mantidas acima de 4 L / (m² x h) (FIG. 10).

[00117] 20 amostras do filtrado foram coletadas (até 5 vezes por semana) e o título de vírus MMV e a carga foram determinados. Nenhuma saturação de vírus foi observada em qualquer uma das 20 frações analisadas.

As cargas virais variaram de $< 0,9$ [$\log_{10}(\text{TCID}_{50})$] até $< 2,8$ [$\log_{10}(\text{TCID}_{50})$], dependendo do volume da fração. A carga de vírus total nos filtrados foi $< 3,0$ [$\log_{10}(\text{TCID}_{50})$] que – quando subtraída da carga de vírus inicial do material fortificado (ou seja, $8,5$ [$\log_{10}(\text{TCID}_{50})$]) – resultados em um fator de redução de vírus global $> 5,5 \log_{10}$. Isto se mostrou eficaz e completo.

[00118] Embora a invenção acima tenha sido descrita em certo grau de detalhes a título de ilustração e exemplo para fins de clareza de compreensão, é facilmente perceptível pelas pessoas normalmente versadas na técnica, à luz dos ensinamentos dessa invenção, que certas alterações e modificações podem ser feitas à mesma sem se afastar do espírito e do escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para remover um contaminante viral de uma preparação, a dita preparação sendo um meio de cultura de células ou um componente de um meio de cultura de células, caracterizado pelo fato de compreender:

a) submeter a dita preparação à filtração por de 24 horas a 7 meses através de um filtro de vírus com um tamanho de poro eficaz máximo igual a 75 nm, em que o mesmo filtro de vírus é usado por de 24 horas a 7 meses e a filtração opera a uma capacidade volumétrica de 2.000 L/m² a 20.000 L/m².

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita preparação é submetida a filtração durante 48 horas até 7 meses.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda:

b) alimentar o filtrado a um meio de cultura de células ou a um componente de um meio de cultura de células.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a filtração é uma filtração contínua.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a filtração é realizada a uma temperatura de 2 °C a 60 °C.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito filtro de vírus atinge uma redução logarítmica de base 10 (LRV) de um valor igual a 1 para um contaminante viral.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a filtração é realizada usando dois ou mais filtros dispostos em série, em paralelo ou uma mistura de ambos.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a filtração é realizada usando dois filtros dispostos em paralelo em

um sistema de tubos que compreende uma junção conformada em Y, e em que cada filtro está em comunicação fluida com uma ramificação da junção conformada em Y e uma fonte de alimentação de preparação.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a filtração é realizada a uma pressão que varia de 10 kPa (100 mbar) a 400 kPa (4.000 mbar).

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito filtro de vírus é autoclavável.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende hidrolisado de soja.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a filtração opera a uma capacidade volumétrica de 5.000 L/m² a 20.000 L/m².

13. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a dita preparação é submetida a filtração durante 72 horas até 3 meses.

14. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a filtração é realizada a uma temperatura de 15 °C a 37 °C.

15. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a filtração é realizada a uma pressão que varia de 100 kPa (1.000 mbar) a 300 kPa (3.000 mbar).

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita preparação é submetida a filtração durante 48 horas até 7 meses.

17. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita preparação é submetida a filtração durante 48 horas até 7 meses.

18. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita preparação é submetida a filtração durante 48 horas até

7 meses.

19. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a dita preparação é submetida a filtração durante 48 horas até 7 meses.

FIGURA 1A

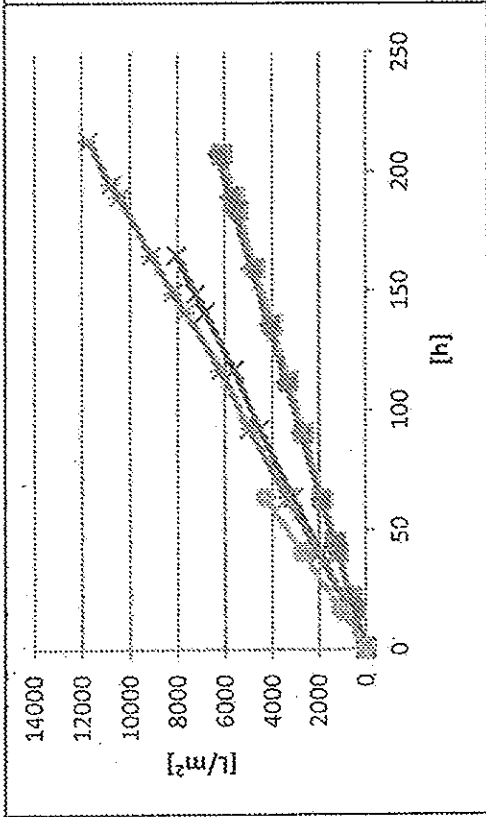


FIGURA 1B

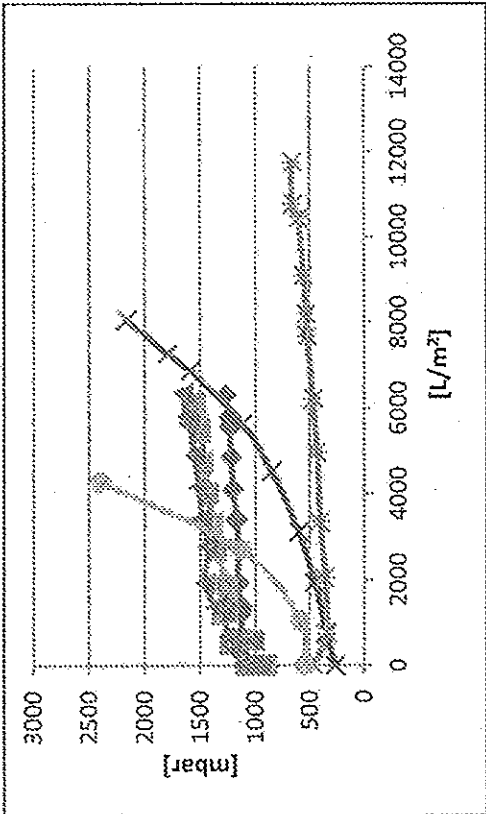
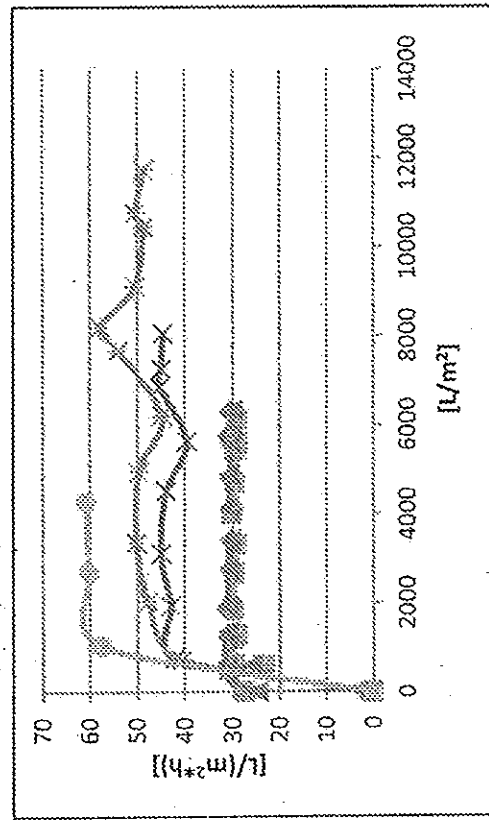


FIGURA 1C



- Hidrolisado 1 de soja do filtro A
- Hidrolisado 2 de soja do filtro A
- Hidrolisado 3 de soja do filtro A
- Hidrolisado 1 de soja do filtro B
- Hidrolisado 2 de soja do filtro B
- Hidrolisado 3 de soja do filtro B

FIGURA 2A

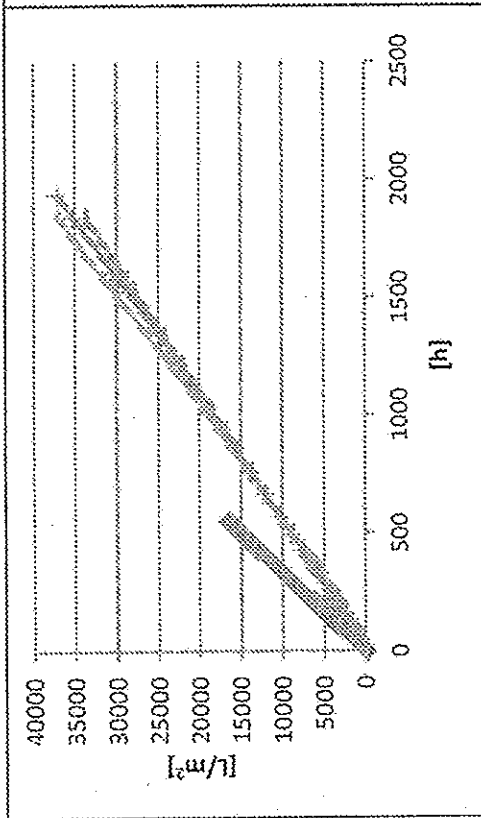


FIGURA 2B

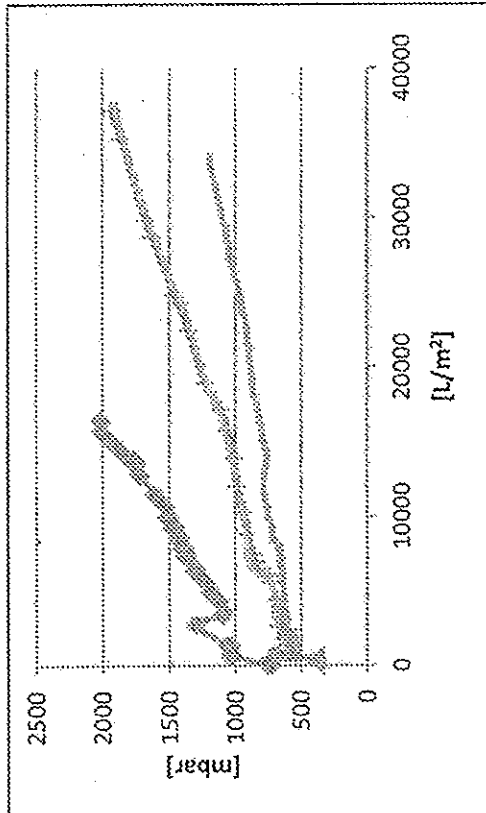
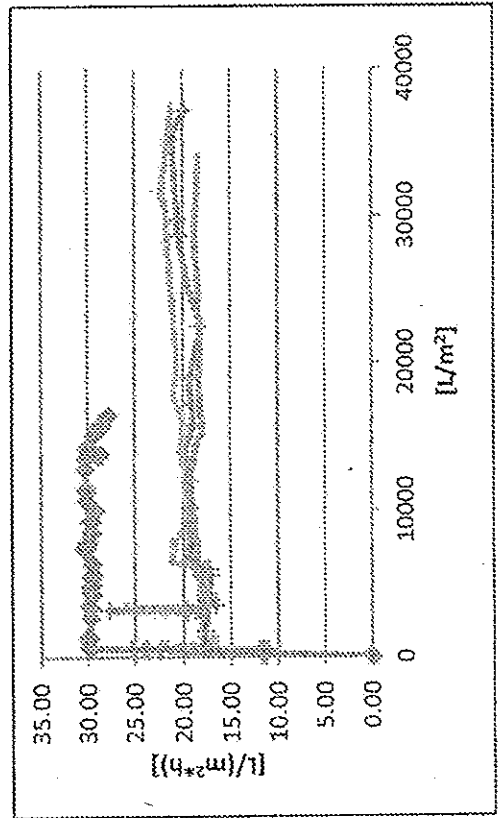


FIGURA 2C



Peptona 1 do filtro D

Peptona 2 do filtro D

Peptona 3 do filtro D

Peptona 3 do filtro D

Hidrolisado 3 de soja do filtro A

FIGURA 3B

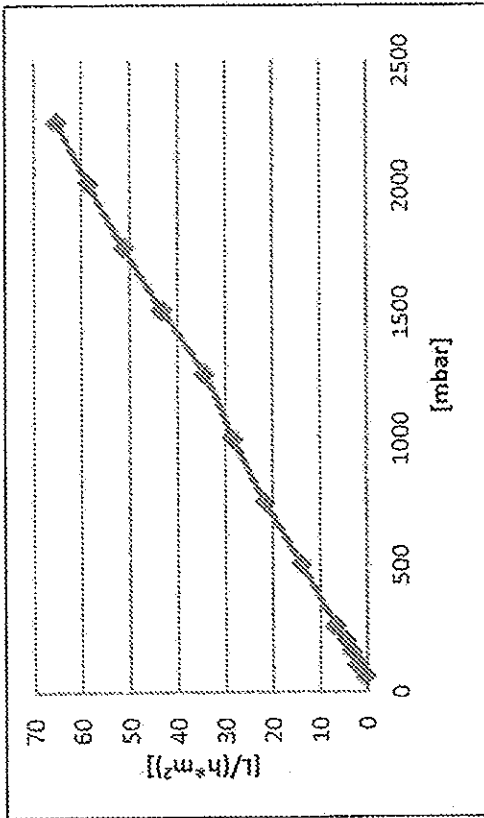


FIGURA 4B

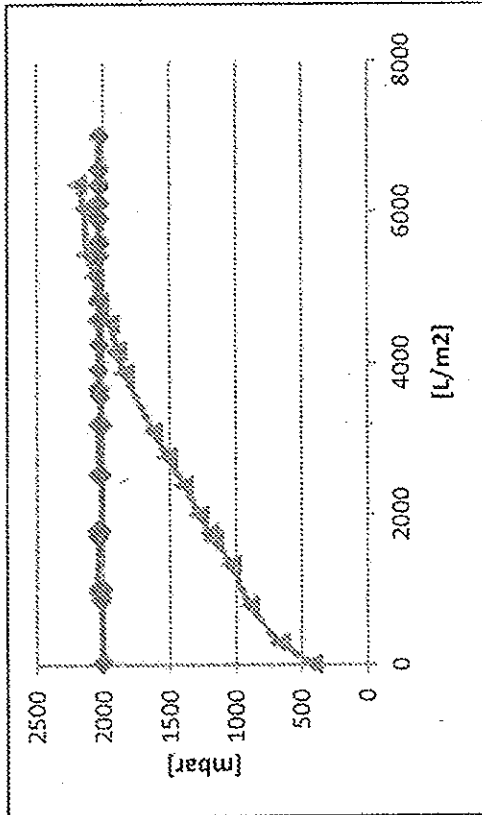


FIGURA 4A

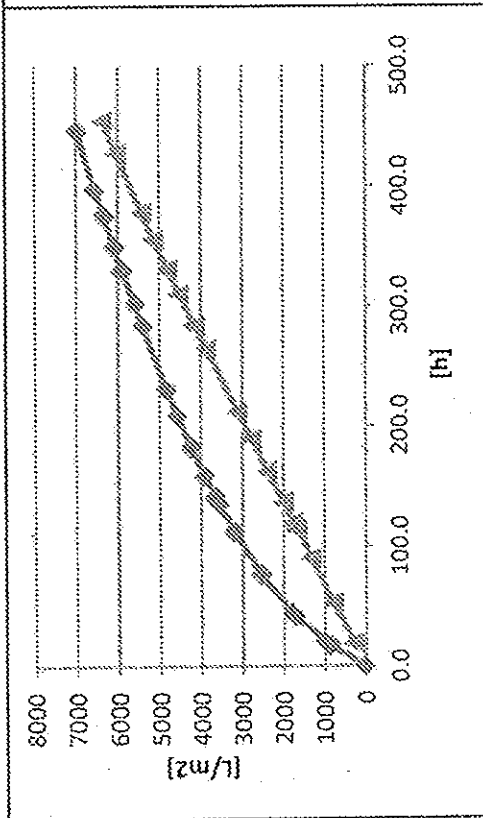
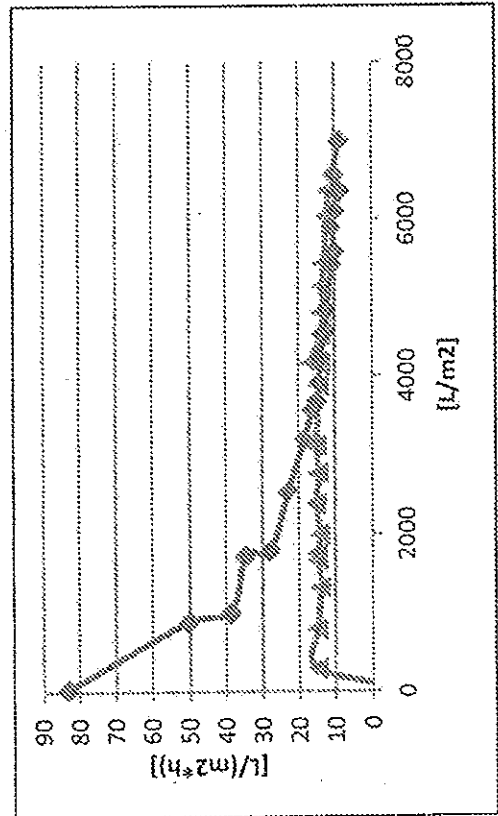


FIGURA 4C



Hidrolisado 5 de soja do filtro A
Pressão controlada

Hidrolisado 5 de soja do filtro A
Vazão controlada



FIGURA 5B

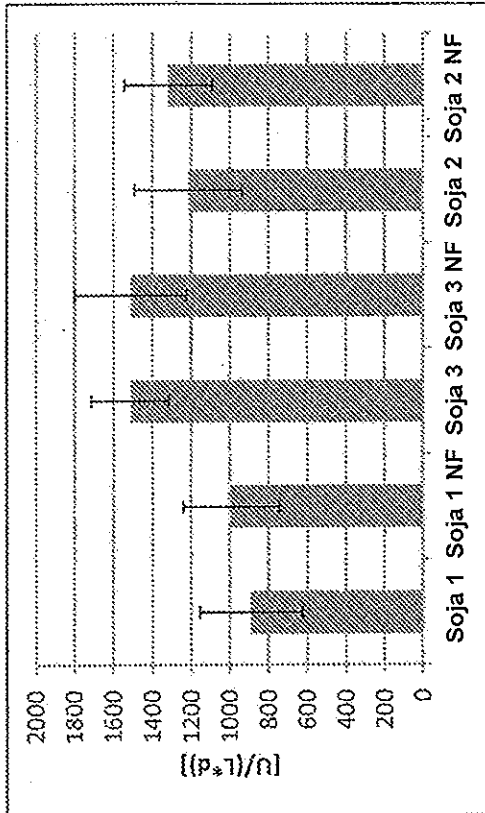


FIGURA 5A

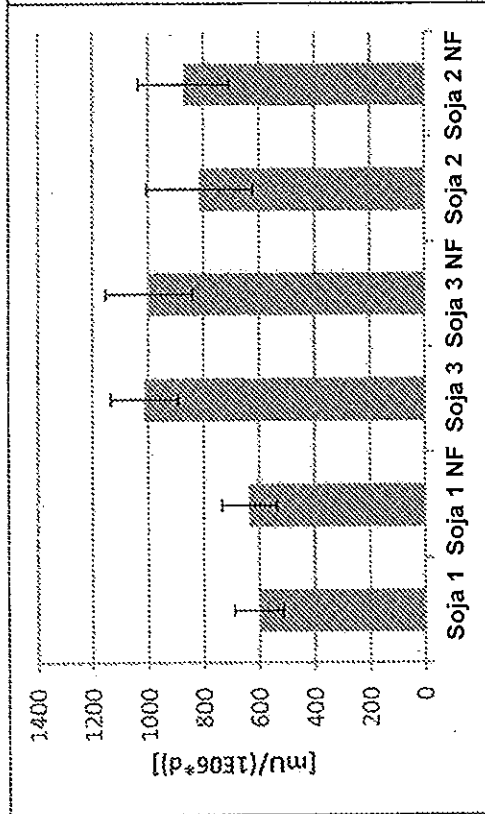


FIGURA 5C

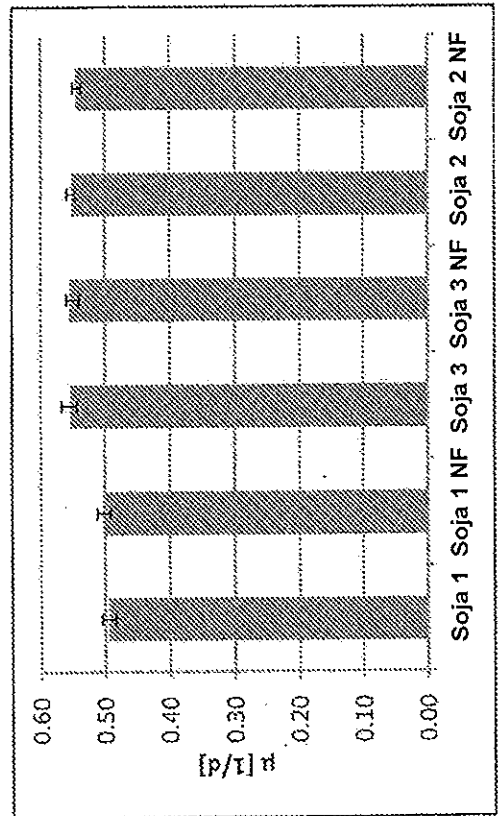


FIGURA 6A

| | Tempo de uso (d) | Volume de vírus filtrado sum [L] | Capacidade volumétrica [L/m ²] | Filtro 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

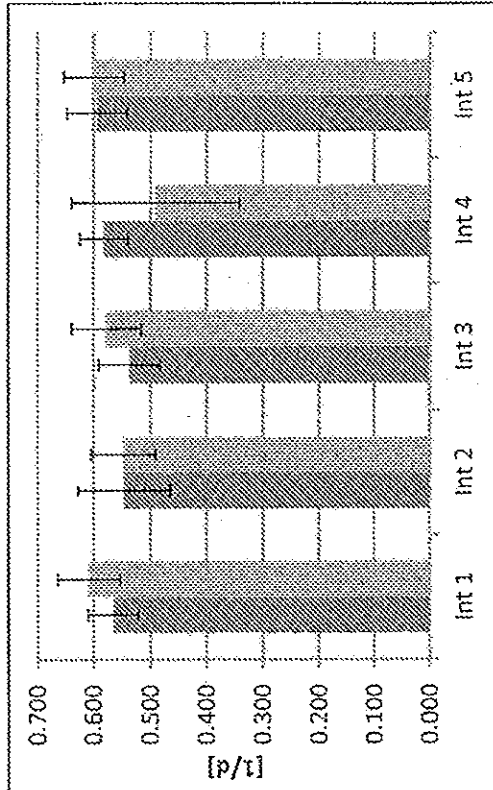
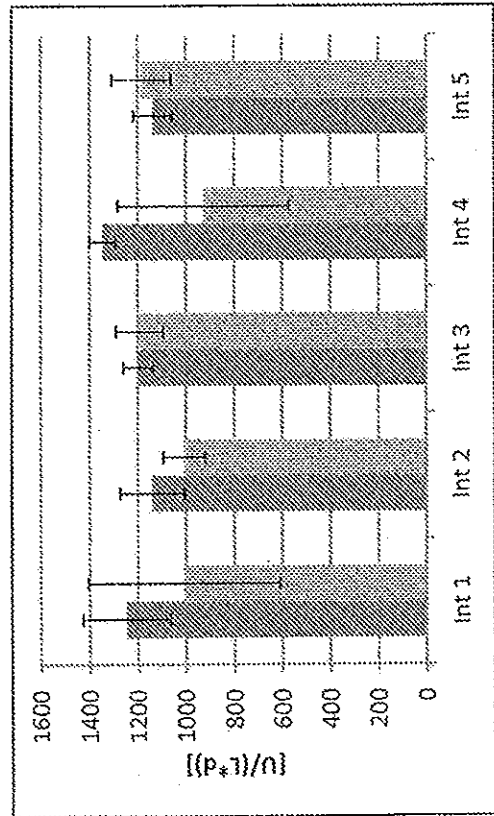


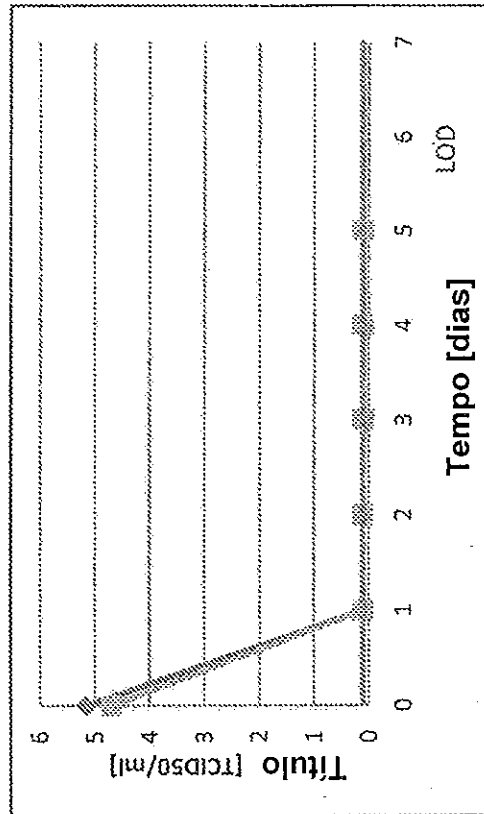
FIGURA 6C



■ Meio nanofiltrado

■ Referência

FIGURA 7

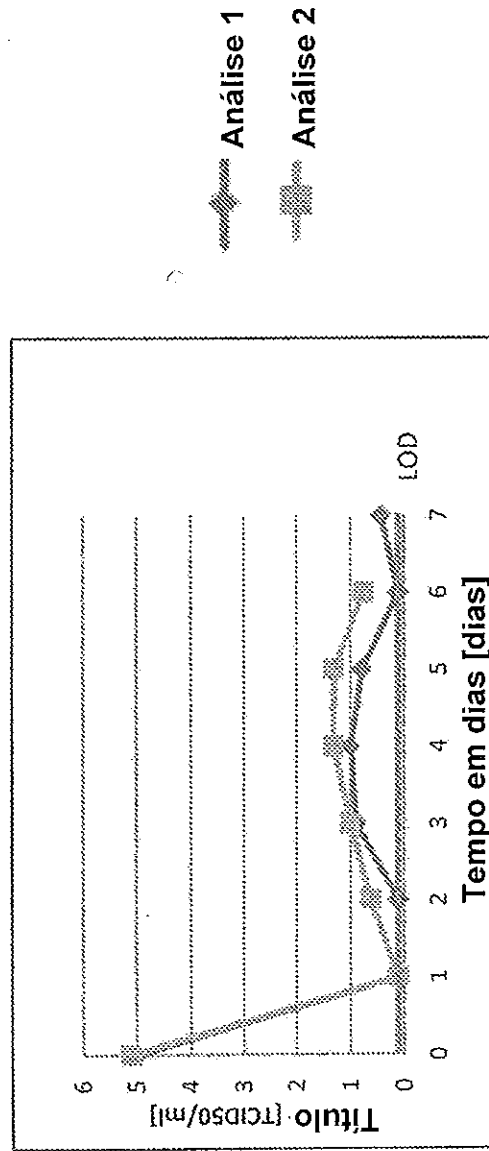


Análise 1

Análise 2

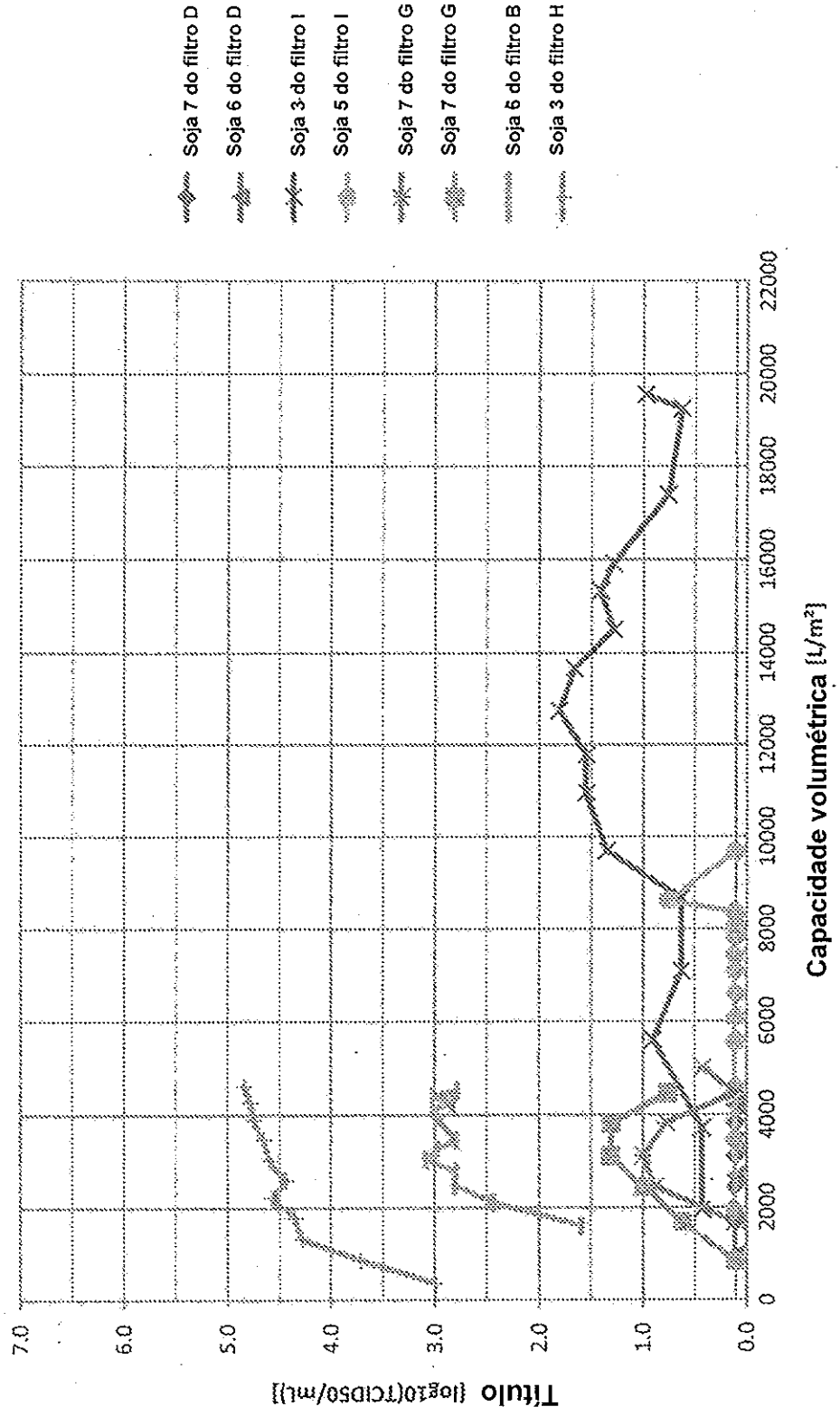
LOD

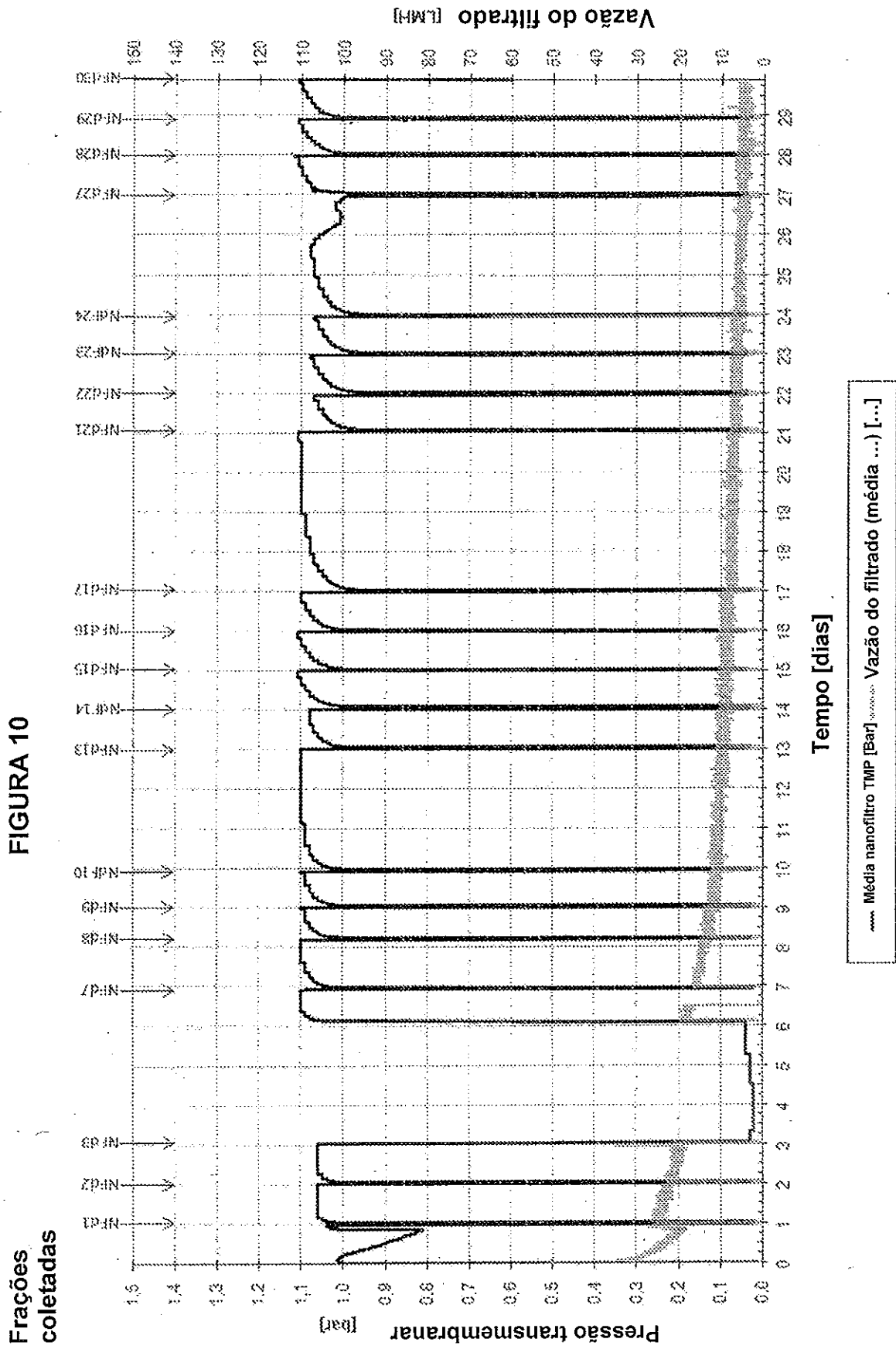
FIGURA 8



Análise 1
Análise 2

FIGURA 9





Frações coletadas

Tempo [dias]

Média nanofiltro TMP [Bar] Vazão do filtrado (média ...) [...]

FIGURA 11

| | Volume de alimentação [mL] | Título de MMV [log ₁₀ (TCID ₅₀ /mL)] | Carga de MMV [log ₁₀ (TCID ₅₀)] |
|------------------------------|----------------------------|---|---|
| Material fortificado | 3,270 | 5.0 | 8.5 |
| NF dia 1 | 287 | < -0.8 | < 1.7 |
| NF dia 2 | 272 | < -0.8 | < 1.6 |
| NF dia 3 | 246 | < -0.8 | < 1.6 |
| NF dia 7 | 330 | < 0.3 | < 2.8 |
| NF dia 8 | 216 | < -0.8 | < 1.5 |
| NF dia 9 | 118 | < -0.8 | < 1.3 |
| NF dia 10 | 121 | < -0.8 | < 1.3 |
| NF dia 13 | 368 | < -0.8 | < 1.8 |
| NF dia 14 | 106 | < -0.8 | < 1.2 |
| NF dia 15 | 98 | < -0.8 | < 1.2 |
| NF dia 16 | 99 | < -0.8 | < 1.2 |
| NF dia 17 | 96 | < -0.8 | < 1.2 |
| NF dia 21 | 354 | < -0.8 | < 1.7 |
| NF dia 22 | 69 | < -0.8 | < 1.0 |
| NF dia 23 | 74 | < -0.8 | < 1.1 |
| NF dia 24 | 67 | < -0.8 | < 1.0 |
| NF dia 27 | 194 | < -0.8 | < 1.5 |
| NF dia 28 | 57 | < -0.8 | < 1.0 |
| NF dia 29 | 49 | < -0.8 | < 0.9 |
| NF dia 30 | 52 | < -0.8 | < 0.9 |
| Volume filtrado total | 3,270 | | < 3.0 |
| L/m ² | 6,540 | | |
| RF | | | > 5.5 log₁₀ |