

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042527**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.22

(21) Номер заявки
201990887

(22) Дата подачи заявки
2013.06.13

(51) Int. Cl. **C12M 1/00** (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(54) ВИРУСНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ СРЕД КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

(31) **61/662,814**

(32) **2012.06.21**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(62) **201590059; 2013.06.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
**Мундт Вольфганг, Миттерер
Артур, Райтер Манфред, Хасслахер
Майнхард, Грильбергер Леопольд,
Крайль Томас (AT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A1-1457497

LIU ET AL.: "Development and Quantification of a Novel Virus Removal Filter for Cell Culture Applications", BIOTECHNOL. PROG., vol. 16, 5 March 2000 (2000-03-05), p. 425-434, XP002711823, cited in the application, p. 426-427, 429-431

EP-A1-1775016
US-B2-7144533

(57) Изобретение относится к способу удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры. Способ включает стадию, на которой подвергают указанный препарат фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм. Кроме того, изобретение относится к применению вирусного фильтра в фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч, причем вирусный фильтр имеет эффективный размер пор максимум 75 нм, для удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры. В некоторых вариантах исполнения фильтрация согласно изобретению действует при объемной производительности по меньшей мере около 2000 л/м². Кроме того, изобретение относится к применению препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, получаемого способом согласно изобретению, для клеточной культуры, фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов, а также пищевых продуктов.

B1**042527****042527****B1**

Уровень техники

Вирусологическая безопасность является важной проблемой в биофармацевтической промышленности. Несмотря на усилия, направленные на снижение риска, происшествия, связанные с крупномасштабным заражением вирусами биологических препаратов, стали все более острой проблемой в промышленности. Наиболее заметные события включают, например, обнаружение заражения вирусом Vesivirus 2117 в фирме Genzyme в 2009 г. ее клеточной культуры CHO (Chinese hamster ovary, яичник китайского хомячка), на которой основано производство препаратов Cerezyme® и Fabrazyme®, и в фирме Merck в 2010 г. заражение ее вакцины Rotarix® вирусом porcine circovirus 1 (цирковироз свиней типа 1). Скорее всего, источник заражения находится на этапе клеточной культуры. В дополнение к экономическим потерям компании-производителя (одно сообщение приводит оценку потери свыше ста миллионов из-за заражения биореактора на 10000 л, плюс штрафы от ведомств) такие события создают опасность для пациентов и подрывают доступ к биофармацевтическим продуктам (Liu и др., *Biotechnol. Prog.*, 2000, том 16, с. 425-434). В результате этого ужесточается нормативная проверка и возрастает потребность в новых способах обнаружения, предотвращения и устранения вирусных заражений.

Как правило, вирусные контаминанты могут быть подразделены по заражению вирусами выше по потоку и ниже по потоку. Заражения ниже по потоку можно контролировать применением замкнутых систем, однако заражения выше по потоку особенно трудно контролировать и выявлять даже комплексным тестированием. Вирусные контаминанты также могут быть обусловлены применением в биофармацевтическом производстве материалов, взятых у животных. Где продуктивная клеточная линия не содержит занесенных извне вирусных контаминантов и производство не предусматривает использования материалов животного происхождения, вирусные контаминанты все еще могли бы попадать со средой клеточной культуры. Например, синтетическая среда может быть дополнена рекомбинантными факторами роста, продуцированными в сывороточной системе, и безбелковая среда тем не менее может содержать профильтрованные белковые гидролизаты. Однако заражение вирусами может происходить даже в среде с полностью химически определенным составом, поскольку большие количества компонентов среды могут быть упакованы в нестерильные контейнеры. Традиционные фильтры стерилизующего класса не только не предназначены, но и не способны создать защиту от вирусных контаминантов, так что для обеспечения вирусологической безопасности должны предприниматься иные меры.

Выявление случайно попавших вирусов на одной или многих контрольных точках производственного процесса является стандартной практикой. Однако само по себе обнаружение является недостаточной мерой для защиты от заражения вирусами биофармацевтических продуктов в особенности там, где присутствующий вирусный контаминант является непредвиденным, неизвестным вирусным агентом или его новым видом. Такие вирусные агенты могут оказаться необнаруживаемыми даже с помощью специально разработанных ДНК-микроматриц, типичных для обширной коллекции секвенированных вирусов. Проблема еще более усугубляется низкими уровнями содержания вирусных контаминантов, необходимыми для инфицирования клеточной культуры, и ограниченной в настоящее время чувствительностью анализа для детектирования.

Высокие титры вирусного контаминанта могут не проявляться в форме измененных параметров клеточной культуры, например плотности культуры, белкового титра, выходящих за пределы их нормального диапазона. С другой стороны, анализы инфекционности являются высокоспецифичными и требуют создания различных условий для каждого вируса. В результате заражения вирусами расположенное ниже по потоку оборудование, текущие среды и продукты могут быть испорчены, что приводит к убыткам в миллионы долларов из-за переделки партии, утилизации отходов, потерянному сбыту и обеззараживанию. Тщательная проверка сырьевых материалов на вирусы затруднительна вследствие неоднородности образцов и больших объемов, вовлеченных в процессы биофармацевтического производства.

Способы элиминации вирусов могут быть отнесены к одной из двух групп: инактивация и фильтрация. Методами инактивации добиваются необратимой утраты инфекционности вирусов, тогда как методы фильтрации нацелены на механическое снижение содержания вирусного контаминанта. В традиционных методах инактивации применяют ультрафиолетовое (UV, УФ) излучение, гамма-излучение, теплоту, низкое или высокое значение pH или воздействие растворителя/детергента. В ситуациях, где УФ-облучение может эффективно и необратимо устранять вирусную активность, оно может быть непрактичным в крупном масштабе или непригодным для приготовленной среды. Стерилизация в автоклаве, хотя возможная для термостойких жидкостей, может изменять чувствительную среду. Один альтернативный метод, известный как высокотемпературная кратковременная (HTST) тепловая обработка (пастеризация), не является жестким, но нуждается в дорогостоящем оборудовании, автоматизации и в процедурах проверки достоверности для сохранения характеристик среды. Воздействие в условиях низкого или высокого значения pH неэффективно в ряду возможных вирусных контаминантов и может оказать негативное влияние на качество или осмотическую концентрацию среды. Воздействие растворителя/детергента подобным образом не является решением с широким спектром действия и является эффективным только для вирусов с липидной оболочкой. По существу идеальный метод должен обеспечивать баланс факторов стоимости и потребностей в эффективной элиминации вирусов в сырьевых материалах и создавать

метод решения с широким спектром действия без ухудшения скорости роста или выхода.

Надлежащий баланс предлагает задерживающая вирусы фильтрация. Она не изменяет химическую природу компонентов среды и пригодна для применения с теплочувствительными питательными средами. Кроме того, задерживающая вирусы фильтрация представляет собой метод решения с широким спектром действия, поскольку она основывается только на принципе эксклюзии по размеру. Однако задерживающие вирусы мембраны являются дорогостоящими (приблизительно от около 2000 до 5000 евро за м²). Низкие удельные величины расхода потока, характерные для фильтрации объемов среды, сделали метод экономически нерентабельным на уровне, пригодном для питания крупномасштабного биореактора, вследствие стоимости мембраны с требуемой площадью. Например, где фильтрация вирусов последовательно соединена со стерилизующей фильтрацией среды, фильтрация вирусов предпочтительно должна выполняться в течение рабочего дня, т.е. максимум от 2 до 10 ч после приготовления всего объема среды, чтобы предотвратить заражение всего объема среды. Поэтому необходимо выдерживать большую фильтрационную площадь в течение этого критического промежутка времени, что, в свою очередь, повышает затраты.

Неожиданно было обнаружено, что недостатки этой соответствующей прототипу фильтрации вирусов могут быть преодолены фильтрацией соответственного препарата, будь то среды клеточной культуры или же по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, в течение по меньшей мере около 24 ч, через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм. Если необходимый объем соответственного препарата фильтруют в течение более длительного периода времени, т.е. в течение по меньшей мере 24 ч, то чрезвычайно возрастает объемная производительность вирусных фильтров. В дополнение к этому неожиданно было найдено, что на протяжении этого длительного периода времени может быть достигнуто значительное снижение общего титра вируса. Это является особенно благоприятным в удалении вирусов выше по потоку в системах клеточных культур.

Поэтому способ согласно изобретению повышает экономическую эффективность вирусной фильтрации благодаря возрастанию пропускной способности и объемной производительности соответственно. Способ согласно настоящему изобретению действует при объемной производительности по меньшей мере 2000 л/м², тем самым содействуя максимизации использования высокопроизводительных вирусных фильтров, снижению связанных с этим реальных затрат, и представляет решение проблемы, которое может быть реализовано в крупном масштабе, и может быть легко встроено в существующие производственные процессы.

Огромное влияние соответствующего изобретению способа и применение соответствующих изобретению вирусных фильтров на процессы стерильного изготовления, в частности процессы, где используются стерильные препараты, например, среды клеточных культур и буферы, может быть понято с помощью следующего примера. Допустим, что квадратный метр мембраны вирусного фильтра в среднем стоит около 3000 евро и применяемая среда клеточной культуры стоит около 10 евро за литр среды, тогда расходы на 1000 л подвергнутой фильтрации вирусов среды составляют 13 евро на литр среды, что повышает стоимость изделий для приготовления среды примерно на 30%. Если с использованием мембраны для фильтрации вирусов могут быть профильтрованы 2000 л, то затраты снижаются до 11,50 евро. Дальнейшее увеличение уровней объемной производительности, например, свыше 5000 л снижает расходы до величины менее 0,6 евро за литр среды, что значительно сокращает дополнительные расходы на приготовление подвергнутой фильтрации вирусов среды. В результате этого высокие стоимости применения вирусных фильтров, в частности, при обеззараживании выше по потоку от потенциальных вирусов или заражения вирусами значительно снижаются благодаря увеличению объемной производительности способа вирусной фильтрации.

Настоящее изобретение полностью разрешает эту проблему высоких затрат и низкой объемной производительности вирусных фильтров соответственно. Объемная производительность вирусного фильтра может быть повышена выполнением вирусной фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм. Неожиданно было обнаружено, что применяемые дорогостоящие вирусные фильтры могут эксплуатироваться эффективнее в отношении объемной производительности, обеспечивая 2-100-кратное повышение объемной производительности с сохранением в то же время целостности фильтра. Хотя уже 2-3-кратное увеличение объемной производительности является весьма влиятельным на производственный процесс и связанные с ним производственные расходы, с помощью способа согласно изобретению может быть достигнуто повышение объемной производительности вплоть до 100-кратного или даже большего. Это создает прекрасные благоприятные возможности и делает расходы на удаление вирусов выгодными даже с дорогостоящими вирусными фильтрами, которые сейчас могут быть использованы для дополнительного улучшения вирусологической безопасности в приготовлении клеточных культур, в частности, при удалении вирусов выше по потоку относительно процессов приготовления клеточных культур, процессов получения фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов и пищевых продуктов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение представляет способ удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры. Спо-

соб включает стадию, на которой подвергают указанный препарат фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм.

Кроме того, изобретение относится к применению вирусного фильтра, имеющего эффективный размер пор максимум 75 нм, в фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч для удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры.

В дополнение изобретение относится к применению препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, получаемого соответственно любому способу согласно настоящему изобретению, для приготовления клеточной культуры, фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов, а также в пищевых продуктах.

Все способы и варианты применения согласно изобретению могут действовать при объемной производительности по меньшей мере около 2000 л/м², предпочтительно по меньшей мере около 3000 л/м², наиболее предпочтительно по меньшей мере около 5000 л/м². В дополнение препарат подвергают фильтрации и фильтрацию выполняют, соответственно, в течение по меньшей мере 24 ч или в течение по меньшей мере от около 48 ч до около 7 месяцев или от около 72 ч до около 3 месяцев. Фильтрацию выполняют при температуре от около 2°C до около 60°C или от около 10 до около 40°C, предпочтительно от около 15 до около 37°C.

Во всех вариантах осуществления изобретения фильтрацию выполняют при давлении, варьирующем от около 100 мбар до около 4000 мбар (10-400 кПа), предпочтительно от около 200 мбар до около 3500 мбар (20-350 кПа), наиболее предпочтительно от около 1000 мбар до около 3000 мбар (100-300 кПа).

Во всех вариантах осуществления изобретения используемый вирусный фильтр достигает по меньшей мере значения 1 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) вирусного контаминанта.

Неожиданно было найдено, что объемная производительность вирусных фильтров может быть весьма существенно повышена, когда процесс фильтрации действует в течение по меньшей мере около 24 ч. Как правило, препараты для клеточной культуры, например весь объем среды клеточной культуры или буферы, подвергают фильтрации в периодическом режиме в пределах от около 2 ч до около 10 ч после приготовления объемных препаратов во избежание заражения препаратов в результате роста бактерий или вирусов. Оказалось, что на практике производительность используемых вирусных фильтров использовалась в процессах фильтрации соответствующих препаратов далеко не в максимальной степени в пределах периода времени от около 2 до около 10 ч. Поэтому нужно было применять избыточную площадь фильтра. В отличие от этого было обнаружено, что благодаря применению способа согласно настоящему изобретению применяемые дорогостоящие вирусные фильтры могут эксплуатироваться эффективнее в отношении объемной производительности, обеспечивая 2-100-кратное повышение объемной производительности, с сохранением в то же время целостности фильтра. Хотя уже 2-3-кратное увеличение объемной производительности в значительной мере влияет на производственный процесс и связанные с ним производственные расходы, с помощью способа согласно изобретению может быть достигнуто повышение объемной производительности вплоть до 100-кратного или даже большего. Это создает прекрасные благоприятные возможности и делает расходы на удаление вирусов выгодными даже с дорогостоящими вирусными фильтрами, которые сейчас могут быть использованы для дополнительного улучшения вирусологической безопасности в приготовлении клеточных культур, в частности, при удалении вирусов выше по потоку относительно процессов приготовления клеточных культур, процессов получения фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов, а также пищевых продуктов.

Конкретные предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидными из нижеследующего более подробного описания определенных вариантов исполнения и из пунктов формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Более конкретные описания изобретения приведены со ссылкой на определенные примерные варианты его осуществления, которые иллюстрированы сопроводительными фигурами. Эти фигуры составляют часть описания. Однако следует отметить, что сопроводительные фигуры иллюстрируют примерные варианты осуществления изобретения и поэтому не должны рассматриваться как ограничивающие его область.

Фиг. 1 показывает кинетические характеристики вирусной фильтрации, выполняемой с применением вирусной фильтрации с регулированием расхода потока (фиг. 1C), при использовании различных фильтров, причем все из них связаны со средами клеточной культуры, дополненными 3 различными партиями соевого гидролизата (Kerry HyPer 1510 № 1, DOMO SE50 MAF UF № 1 и 2).

Фильтр и использованные экспериментальные условия (см. также примеры 1-4).

Фильтр А: Sartorius Virosart CPV, 180 см²; при температуре 30°C с величинами расхода потока около 30 л/(м²×ч).

Фильтр В: Millipore Viresolve NFP, 3,1 см²; при температуре 30°C с величинами расхода потока около 40-60 л/(м²×ч).

Фильтрации проводили в течение вплоть до около 9 дней или до тех пор, пока не было превышено максимуме давление 2000 мбар (200 кПа). Фиг. 1А показывает объемную производительность как профильтрованный объем в расчете на площадь поверхности мембраны, нанесенную на график относительно времени, варьирующую от около минимальной 4000 л/м² до около 12000 л/м². Максимальное давление в конце фильтрации составляло между около 600 и 2400 мбар (60-240 кПа) в зависимости от типа фильтра (фиг. 1В). В общем и целом разница между соевыми гидролизатами проявляется довольно мало для объемной производительности и для максимального давления.

Фиг. 2 показывает кинетические характеристики вирусной фильтрации, выполняемой с применением вирусной фильтрации с регулированием расхода потока (фиг. 2С) при использовании различных фильтров и сред клеточной культуры, дополненных 3 различными партиями соевого гидролизата (Kerry HyPer 1510 № 1, DOMO SE50 MAF UF № 1 и 2).

Фильтр и использованные экспериментальные условия (см. также примеры 1-4).

Фильтр А: Sartorius Virosart CPV, 180 см²; при температуре 30°C с величинами расхода потока около 30 л/(м²×ч).

Фильтр D: Asahi BioEX, 10 см²; при температуре окружающей среды (около 22°C) с величинами расхода потока около 20 л/(м²×ч). В отличие от экспериментов, описанных в фиг. 1, фильтрации проводили в течение более длительного промежутка времени вплоть до 81 дня или до тех пор, пока не было превышено максимуме давление 2000 мбар (200 кПа). Фиг. 2А показывает объемную производительность как профильтрованный объем в расчете на площадь поверхности мембраны, нанесенную на график относительно времени, варьирующую от около минимальной 16000 л/м² (для фильтра А с DOMO SE50 MAF № 2) до около 35000 л/м² (для фильтра D со всеми 3 различными партиями соевого гидролизата). Максимальное давление в конце фильтрации составляло между около 1200 и 2000 мбар (120-200 кПа) в зависимости от типа фильтра (фиг. 2В). В общем и целом разница между соевыми гидролизатами проявляется довольно мало для объемной производительности и для максимального давления.

Фиг. 3 представляет график, показывающий взаимосвязь между величиной расхода потока и разностью давлений, наблюдаемую при температуре около 22°C с использованием Фильтра А (Sartorius Virosart CPV, 180 см²) и среды, содержащей соевый гидролизат DOMO SE50 MAF UF, партия № 2 (см. пример 5).

Минимальная разность давлений около 100 мбар (10 кПа) требуется для достижения минимальной обнаруживаемой удельной величины расхода потока, которая затем постепенно возрастает согласно отчетливой линейной пропорциональной зависимости между удельным расходом потока и разностью давлений.

Фиг. 4 показывает разницу между фильтрацией с регулированием давления и фильтрацией с регулированием расхода потока с использованием фильтра А (Sartorius CPV, 180 см²) и среды с соевым гидролизатом Kerry HyPer 1510 № 2 (см. примеры 1-4).

Фильтрации проводили в течение 19 дней и в это время достигали объемной производительности около 6000-7000 л/м². Конечное давление при фильтрации с регулированием расхода потока было сравнимым с давлением при фильтрации с регулированием давления (см. фиг. 4В), и конечный удельный расход потока при фильтрации с регулированием давления был сравнимым с удельным расходом потока при фильтрации с регулированием расхода потока (см. фиг. 4С). Это демонстрирует, что обе стратегии контроля вирусной фильтрации могут иметь результатом сравнимую объемную производительность.

Фиг. 5 показывает результаты эксперимента в биореакторе емкостью 10 л с использованием подвергнутой вирусной фильтрации среды сравнительно с не подвергнутой вирусной фильтрации средой, описанного в примере 6. Среды клеточной культуры были подвергнуты вирусной фильтрации в периодическом режиме с использованием фильтра А перед началом эксперимента. Эксперименты были проведены параллельно с использованием в каждой из сред клеточной культуры, дополненных 3 различными соевыми гидролизатами (Kerry HyPer 1510, партия № 1; DOMO SE50 MAF UF, партия № 1, и DOMO SE50 MAF UF, партия № 2). Данные были рассчитаны по последним 3 неделям из 4-недельной непрерывной клеточной культуры. Никаких различий между соответственными подвергнутыми вирусной фильтрации средами (Soy 1 NF, Soy 3 NF и Soy 2 NF) сравнительно с их нефильтрованным контрольным образцом (Soy 1, Soy 3 и Soy 2) не удалось обнаружить в отношении удельной продуктивности (фиг. 5А), объемной продуктивности (фиг. 5В) и удельной скорости роста (фиг. 5С).

Фиг. 6 показывает результаты эксперимента в биореакторе емкостью 120 л с использованием подвергнутой вирусной фильтрации среды сравнительно с не подвергнутой вирусной фильтрации средой, описанного в примере 7. Среды клеточной культуры были подвергнуты вирусной фильтрации в поточном режиме на линии подачи среды в биореакторы с использованием альтернативно фильтра Е (Sartorius Virosart CPV, 2000 см²) и фильтра F (Millipore Viresolve NFP, 850 см²) в течение около 58 дней в непрерывном режиме. Интервалы времени и объемная производительность подаваемой подвергнутой вирусной фильтрации среды показаны в фиг 6А. Данные были рассчитаны для интервалов с использованием различных фильтров. Никаких различий между соответственными подвергнутыми вирусной фильтрации средами сравнительно с нефильтрованным контрольным образцом не удалось обнаружить в отношении

удельной скорости роста (фиг. 6В) и объемной продуктивности (фиг. 6С).

Фиг. 7 показывает изменение титра инфекционности MMV (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей) [TCID₅₀/мл], найденного в образцах фильтрата, последовательно отобранных в ходе фильтрации MMV-дополненной среды, содержащей соевый гидролизат DOMO SE50 MAF № 5 UF с использованием фильтра G (ASAHI Planova 15N) из вирусных фильтров (см. пример 8). Низкий уровень проскока вирусов наблюдался в течение 2-3 дней. Тем не менее удаление вирусов представлялось эффективным.

Фиг. 8 показывает изменение титра инфекционности MMV [TCID₅₀/мл], найденного в образцах фильтрата, последовательно отобранных в ходе фильтрации MMV-дополненной среды, содержащей соевый гидролизат (экспериментальный цикл № 1 с соевым гидролизатом DMV SE50 MAF UF № 5; экспериментальный цикл № 2 с соевым гидролизатом DMV SE50 MAF UF № 4), с использованием фильтра D (Asahi BioEX) из вирусных фильтров (см. пример 9). Никакого проскока вирусов не наблюдалось и удаление вирусов представлялось эффективным и полным.

Фиг. 9 показывает изменение титра инфекционности MMV [TCID₅₀/мл], найденного в образцах фильтрата, последовательно отобранных в ходе фильтрации MMV-дополненной среды, как описано в примере 10. Никакого проскока вирусов не наблюдалось при экспериментальных циклах № 1 и 2 (фильтр D), что обеспечивало эффективное и полное удаление вирусов из содержащей соевый гидролизат среды. Низкий уровень проскока вирусов наблюдался в экспериментальных циклах № 3 и 4 (фильтр I) и экспериментальных циклах № 5 и 6 (фильтр G), имея результатом эффективное, но не полное удаление вирусов из содержащей соевый гидролизат среды. Более значительный проскок вирусов наблюдался в экспериментальных циклах № 7 (фильтр В) и экспериментальном цикле № 8 (фильтр Н), показывая сниженные показатели удаления вирусов на пределе значимости.

Однако в случае всех фильтров по меньшей мере в одном эксперименте удалось достигнуть минимального общего снижения общего титра более чем на около 1 log TCID₅₀/мл.

Таблица 1
Комбинация вирусных фильтров и соевых гидролизатов, использованных в спайк-экспериментах (с искусственным заражением)

Эксперимент №	Фильтр	Соевый гидролизат, партия	Показатель общего уменьшения [log ₁₀ (TCID ₅₀ /мл)]
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

Фиг. 10 показывает кинетические характеристики фильтрации вирусов, выполненной, как описано в примере 11. Давление поддерживали между 0,8 и 1,2 бар (0,08-0,12 МПа) (в среднем 1,1 бар (0,11 МПа)) за исключением преднамеренных прерываний давления и течения, которые имитировали наиболее неблагоприятную ситуацию в технологических условиях. Были достигнуты начальные величины расхода потока около 38 л/(м²×час), которые постепенно снижались вплоть до окончания эксперимента, однако удалось поддерживать минимальный расход потока на уровне 4 л/(м²×час). Общая продолжительность, включая перерывы в давлении, составляла 30 дней. Через фильтр было пропущено приблизительно 6500 л/м².

Фиг. 11 показывает изменение титра инфекционности MMV [log₁₀ (TCID₅₀/мл)], найденного в образцах фильтрата, последовательно отобранных в ходе фильтрации MMV-дополненной среды, как описано в примере 11. Никакого проскока вирусов не наблюдалось ни в одной из 20 проанализированных фракций. Вирусные нагрузки варьировали от <0,9[log₁₀(TCID₅₀)] до <2,8[log₁₀(TCID₅₀)] в зависимости от объема фракции. Совокупная вирусная нагрузка в фильтратах составляла <3,0[log₁₀(TCID₅₀)], которая, если вычесть из начальной вирусной нагрузки зараженного материала (т.е. 8,5[log₁₀(TCID₅₀)]), имеет результатом общий показатель сокращения вирусной нагрузки >5,5 log₁₀. Это представлялось эффективным и полным.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение представляет способ удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры. Способ включает стадию, на которой подвергают указанный препарат фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм.

Кроме того, изобретение относится к применению вирусного фильтра, имеющего эффективный

размер пор максимум 75 нм, в фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч для удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры.

В дополнение изобретение относится к применению препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, получаемого соответственно любому способу согласно настоящему изобретению, для приготовления клеточной культуры, фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов, а также пищевых продуктов.

Во всех вариантах осуществления изобретения препарат подвергают вирусной фильтрации, причем вирусную фильтрацию или применение вирусного фильтра выполняют в течение по меньшей мере около 24 ч, около 48 ч, около 72 ч, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 7 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев или около 7 месяцев. Кроме того, в одном варианте исполнения препарат подвергают вирусной фильтрации или вирусную фильтрацию выполняют в течение от около 1 недели до около 3 недель, от около 2 недель до около 3 недель, от около 1 недели до около 4 недель, от около 2 недель до около 4 недель, от около 1 недели до около 7 месяцев, от около 1 месяца до около 5 месяцев, от около 2 месяцев до около 5 месяцев, от около 2 месяцев до около 4 месяцев, от около 2 месяцев до около 3 месяцев, или по меньшей мере от около 24 ч до около 7 месяцев, или от около 48 ч до около 5 месяцев, или от около 72 ч до около 3 месяцев. Кроме того, в одном варианте исполнения препарат подвергают вирусной фильтрации или вирусную фильтрацию выполняют в течение времени дольше чем от около 48 ч до около 7 месяцев, предпочтительно от около 1 недели до около 5 месяцев, или от около 3 недель до около 3 месяцев, или от около 2 месяцев до около 3 месяцев.

Способ согласно изобретению может действовать при объемной производительности по меньшей мере около 2000 л/м², или по меньшей мере около 3000 л/м², или по меньшей мере около 4000 л/м², или по меньшей мере около 5000 л/м², по меньшей мере около 7500 л/м², по меньшей мере около 10000 л/м², или по меньшей мере около 20000 л/м². В этом отношении "объемная производительность" имеет отношение к объему раствора, который может быть профильтрован через заданную площадь мембраны вирусного фильтра, прежде чем снизится расход потока фильтрата или противодействие повысится до нежелательного уровня для технологических условий вследствие забивания мембраны фильтра.

Предусматривается, что настоящее изобретение, в том числе все варианты осуществления, может быть реализовано по отдельности или в сочетании с другими подходами, известными в технологии, для минимизации заражения вирусами, например, скринингом, выбором источников материалов, детектированием, инактивацией вирусов, адсорбционным задерживанием, и т.д. Настоящие способы нацелены на поступление нежелательных вирусных агентов через препарат, будь то среда клеточной культуры или по меньшей мере один компонент среды клеточной культуры, на ранней стадии производственного процесса и обеспечивают механизм сокращения вирусов. Преимущества настоящего изобретения включают простоту практической реализации на крупномасштабной основе, сокращение площади мембраны фильтра, необходимой для обработки данного объема препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, снижение связанных с этим расходов. В частности, вирусная фильтрация препаратов согласно изобретению без труда может быть встроена в процессы непрерывного производства, например непрерывные процессы приготовления клеточных культур типа перфузии, или при хемотростировании, таком как в биореакторных системах.

Термин "температура", как используется здесь, относится к температуре фильтруемых препаратов согласно изобретению, например среды клеточной культуры или буфера, во время, когда он проходит через вирусный фильтр. В одном варианте исполнения согласно изобретению температура варьирует от около 2°C до около 60°C. В одном варианте исполнения нижний предел температурного диапазона составляет около 2°C, около 4°C, около 8°C, около 10°C, около 15°C, около 20°C, около 22°C, около 25°C, около 30°C, около 37°C или около 40°C. Верхний предел температурного диапазона согласно изобретению составляет около 10°C, около 20°C, около 22°C, около 25°C, около 30°C, около 37°C, около 40°C, около 50°C, или около 60°C. В одном варианте исполнения температура варьирует в диапазоне от около 4°C до около 45°C, или в температурном диапазоне от около 10°C до около 40°C, или от около 20°C до около 40°C, или от около 30°C до около 37°C. Кроме того, в одном варианте исполнения температура представляет собой температуру окружающей среды, которая варьирует в диапазоне от около 20°C до около 30°C. Конечно, также предпочтительны варианты исполнения, где препараты подвергают фильтрации без любого дополнительного нагревания или охлаждения препаратов. Поэтому в одном дополнительном варианте исполнения используют температуру от около 10°C до около 30°C в зависимости от температуры соответствующего места, на котором выполняют фильтрацию. В еще одном варианте исполнения применяют температуры от около 30°C до около 37°C, например, предварительным нагреванием жидкого препарата перед фильтрацией. Фильтрат, полученный при такой фильтрации препарата, может непрерывно подаваться в биореактор.

В одном варианте осуществления изобретения фильтрацию выполняют при давлении, варьирующем от около 100 мбар до около 4000 мбар (10-400 кПа), или от около 200 мбар до около 3500 мбар (20-350 кПа). В одном варианте исполнения вирусную фильтрацию выполняют в диапазоне давлений, в

котором нижний предел составляет около 100 мбар (10 кПа), около 200 мбар (20 кПа), около 500 мбар (50 кПа), около 1000 мбар (100 кПа), около 1200 мбар (120 кПа), около 1500 мбар (150 кПа), около 2000 мбар (200 кПа), около 2500 мбар (250 кПа), или около 2800 мбар (280 кПа). Верхний предел составляет около 1200 мбар (120 кПа), около 1500 мбар (150 кПа), около 2000 мбар (200 кПа), около 2500 мбар (250 кПа), около 2800 мбар (280 кПа), или около 3000 мбар (300 кПа). В одном варианте исполнения фильтрацию выполняют при давлении, варьирующем от около 1000 до около 4000 мбар (100-400 кПа), от около 1500 до около 3500 мбар (150-350 кПа), от 1700 мбар до около 3300 мбар (170-330 кПа) или от около 1000 мбар до около 2000 мбар (100-200 кПа).

Корректировки температуры и давления могут быть применены в дополнительных вариантах осуществления изобретения для регулирования удельного расхода потока и объемной производительности. Дополнительные повышения объемной производительности и продолжительности использования вирусного фильтра могут быть получены регулированием других технологических параметров, таких как давление и температура фильтрации. Например, оказалось, что в некоторых вариантах исполнения предпочтительно подвергать препарат фильтрации при температуре от около 10°C до около 40°C под давлением от около 1000 мбар до около 2000 мбар (100-200 кПа).

Предварительные эксперименты по фильтрации продемонстрировали влияние температуры фильтруемых препаратов на удельный расход потока. Повышение расхода потока на величину от около 50% до около 100% наблюдалось, когда температуру фильтрации препарата согласно изобретению, имеющего температуру при хранении около 4°C, повышали до температур от около 18°C до около 37°C. Однако все эти варианты исполнения находятся в пределах того, что применение фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч обеспечивает то обстоятельство, что емкость применяемых дорогостоящих вирусных фильтров может быть использована более эффективно, приводя к 2-100-кратному повышению объемной производительности с сохранением в то же время целостности фильтра.

В одном предпочтительном варианте исполнения способ удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, включает стадию, на которой указанный препарат подвергают фильтрации в течение по меньшей мере от около 10 дней до около 2 месяцев через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм, при давлении от около 1000 до 2000 мбар (100-200 кПа) и температуре от 10°C до 40°C, имеющей объемную производительность по меньшей мере 2000 л/м². Конечно, все другие параметры могут быть также объединены с этим вариантом исполнения. В дополнение в качестве дополнительного предпочтительного варианта исполнения, указанный способ выполняют в непрерывном режиме фильтрации, в котором препарат предпочтительно представляет собой среду клеточной культуры, например среду клеточной культуры, включающую соевый гидролизат, или среду клеточной культуры, включающую компоненты животного происхождения, причем фильтрат непрерывно подают в биореактор, в частности реактор, работающий в режиме хеостата. В еще одном варианте исполнения этот вариант исполнения может быть дополнительно выполнен с использованием по меньшей мере 2 вирусных фильтров, размещенных параллельно или последовательно.

Предусматривается, что способы вирусной фильтрации, как здесь описываемые, могут быть использованы для сокращения заражения вирусами из любого препарата, будь то клеточной культуры, или же по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, т.е. среды и буферов, пригодных для выращивания животных клеток, и предпочтительно клеток млекопитающих, в *in vitro* клеточной культуре. Как правило, культуральная среда содержит буфер, соли, источник энергии, аминокислоты, витамины и следовые количества существенных элементов.

Термин "препарат" также включает любой компонент, представляющий собой возможную часть среды клеточной культуры, в смысле настоящего изобретения и способный поддерживать рост надлежащей клетки в культуре. Указанные препараты включают, например, буфер или растворы по меньшей мере одной аминокислоты или белка; растворы по меньшей мере одного витамина; растворы по меньшей мере одной органической или неорганической соли; или растворы, включающие по меньшей мере один источник углеводов или сахаров.

В контексте настоящего изобретения "логарифм величины уменьшения" (LRV) представляет меру эффективности мембраны в задерживании частиц, таких как бактерия или вирус, определяемую как логарифм (по основанию 10) отношения числа указанных частиц в сырьевом потоке к числу частиц в пермеате мембраны вирусного фильтра. Значение LRV является специфическим для данного типа частиц. В одном варианте исполнения согласно изобретению вирусный фильтр достигает по меньшей мере 1 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 2 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 3 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 4 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 5 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 6 Log₁₀ величины уменьшения для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 7 Log₁₀ величины уменьшения для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 8 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта. Конечно, квалифицированному специалисту в этой

области технологии очевидно, что любое значение Log_{10} величины уменьшения (LRV) вирусного или потенциального вирусного контаминанта в фильтруемом препарате является благоприятным для повышения надежности производственного процесса. Поэтому в особенности этот параметр может быть объединен со всеми прочими параметрами, которые используются в способе согласно настоящему изобретению.

"Расход жидкости", как применяется здесь, является взаимозаменяемым с "удельным расходом потока" или "величиной расхода потока", представляет собой меру, используемую для охарактеризования мембран, имеет отношение к скорости течения фильтрата (выраженной в объеме или весе раствора, который проникает через мембрану вирусного фильтра в расчете на площадь фильтра и время, например, $\text{л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$). В контексте изобретения термин "удельный" означает отношение к заданному времени, однако, когда используется только "расход потока", также в единицах этого параметра, очевидно, что это подразумевает "удельный расход потока". В качестве аббревиатуры "объемное" количество, приведенное в единицах "литр", взаимозаменяемо используется как "л". Удельный расход потока в пределах способа согласно настоящему изобретению может варьировать в диапазоне или оставаться по существу фиксированным на протяжении всей продолжительности процесса фильтрации с использованием данного вирусного фильтра. В одном варианте осуществления настоящего изобретения удельный расход потока может варьировать от около $5 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ до около $500 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ в течение по меньшей мере от 24 ч до около 7 месяцев. Нижний предел для расхода жидкости может составлять около $5 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ или около $10 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$. Верхний предел может составлять около $25 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, около $75 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, около $100 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, около $200 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, около $250 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, около $300 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, или около $500 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$. Расход жидкости может дополнительно варьировать от около $5 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ до около $100 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$, от около $10 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ до около $100 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ или от около $10 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$ до около $25 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{ч})$.

"Периодическая фильтрация", иначе известная как "фильтрация периодического действия", или фильтрация, выполняемая в периодическом режиме, здесь имеет отношение к процессу, в котором конкретное совокупное количество или объем препарата, будь то среды клеточной культуры или же по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, фильтруют через вирусный фильтр в одной партии, в зависимости от емкости вирусного фильтра, причем процесс фильтрации завершают, прежде чем фильтрат будет направлен или подан в процесс, в котором он используется или потребляется.

Термин "непрерывная фильтрация", или "онлайн-фильтрация", или "поточная фильтрация" имеет отношение к процессу фильтрации, в котором конкретное совокупное количество или объем препарата, будь то среды клеточной культуры или же по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, фильтруют через вирусный фильтр непрерывно в зависимости от емкости вирусного фильтра и в котором процесс фильтрации все еще продолжается, когда фильтрат уже направляется или подается в процесс, в котором он используется или потребляется.

Все варианты осуществления настоящего изобретения могут быть выполнены с использованием периодической или непрерывной фильтрации. Благоприятный эффект изобретения достигается уже тем, что препарат, будь то среда клеточную культуру или по меньшей мере один компонент среды клеточной культуры, подвергают фильтрации в течение по меньшей мере 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм, чтобы удалить вирусный контаминант из указанного препарата.

В одном предпочтительном варианте исполнения согласно изобретению способ удаления вирусного контаминанта из препарата, будь то среды клеточной культуры, или же по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, в котором указанный препарат подвергают фильтрации в течение по меньшей мере около 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм, выполняют в режиме непрерывной фильтрации. Этот режим работы имеет то преимущество, что полученный фильтрат препарата может непосредственно и непрерывно подаваться в процесс, в котором он используется или потребляется. В одном дополнительном предпочтительном варианте исполнения подвर्гаемый вирусной фильтрации препарат, будь то среда клеточная культура или по меньшей мере один компонент среды клеточной культуры, может непосредственно и непрерывно подаваться в биореактор, более предпочтительно крупномасштабный биореактор, используемый в процессе непрерывной подачи клеточной культуры, например, в режиме хемостата, процессе перфузии или процессе с периодической подачей. Этот вариант исполнения выполняют в одном варианте исполнения с использованием давления от около 1000 до 2000 мбар (100-200 кПа) и температуры от 10 до 40°C, причем объемная производительность составляет по меньшей мере $2000 \text{ л}/\text{м}^2$ или по меньшей мере $5000 \text{ л}/\text{м}^2$. В дополнение, кроме того, является предпочтительным, чтобы вирусную фильтрацию препарата выполняли в течение по меньшей мере около 24 ч, или от около 48 ч до около 7 месяцев, более предпочтительно в течение по меньшей мере от около одной недели до около 5 месяцев, и наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере от около одной до около 3 недель, или от около 3 недель до около 3 месяцев и даже наиболее предпочтительно по меньшей мере от около 2 до около 3 месяцев. Конечно, с этим вариантом исполнения могут быть объединены все прочие параметры. В дополнение предпочтительно, чтобы фильтруемый препарат представлял собой среду клеточной культуры и режим фильтрации был непрерывным режимом фильтрации.

Разумеется, квалифицированному специалисту в этой области технологии известно, что подвергнутые вирусной фильтрации препараты, которые могут быть получены любым из способов согласно изобретению, также могут быть направлены или поданы в другие производственные процессы, имеющие отношение к клеточной культуре, фармацевтическим, диагностическим и/или косметическим препаратам, а также к пищевым продуктам. Кроме того, в этих вариантах исполнения предпочтительна непрерывная фильтрация препаратов.

Таким образом, изобретение также относится к применению препарата, будь то среды клеточной культуры или по меньшей мере одного компонента среды клеточной культуры, получаемого соответственно любому из способов согласно изобретению, для клеточной культуры, фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов, а также в пищевых продуктах.

В некоторых вариантах исполнения подвергаемая вирусной фильтрации среда клеточной культуры является стерильной или иным образом предварительно обработанной. В некоторых вариантах исполнения среда клеточной культуры включает белки или сыворотку животного происхождения или другие компоненты животного происхождения, или не содержит белки животного происхождения или сыворотку животного происхождения, или не содержит компоненты животного происхождения, или обладает любой комбинацией вышеуказанных характеристик. В других вариантах исполнения среда клеточной культуры включает переменные концентрации и материалы гидролизатов растительного или микробного происхождения, в особенности соевые гидролизаты. В одном предпочтительном варианте исполнения среда клеточной культуры представляет собой не содержащую животного белка среду, включающую по меньшей мере один соевый гидролизат с переменными концентрациями. Однако следует подчеркнуть, что способ согласно изобретению в особенности пригоден для вирусной фильтрации препаратов, включающих белок или сыворотку животного происхождения, или другие компоненты животного происхождения, чтобы дополнительно повысить вирусологическую безопасность этих препаратов, в частности, когда используется для обработки клеточной культуры, фармацевтических, диагностических и/или косметических препаратов, а также в пищевых продуктах.

"Среда клеточной культуры" для целей изобретения определяется как среда, пригодная для выращивания клеток, предпочтительно животных клеток, более предпочтительно клеток млекопитающих, в *in vitro* клеточной культуре. Может быть использована любая среда, способная поддерживать рост надлежащих клеток в клеточной культуре. Среда клеточной культуры согласно изобретению может быть основана на любой базальной среде, такой как DMEM, Ham's F12, Medium 199, McCoy или RPMI, в принципе известной квалифицированному работнику. Назальная среда может включать ряд ингредиентов, в том числе аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли и источники углевода, причем каждый ингредиент присутствует в количестве, которое поддерживает культивирование клетки, что, как правило, известно квалифицированному специалисту в этой области технологии. Среда может содержать вспомогательные вещества, такие как буферные добавки типа бикарбоната натрия, антиоксиданты, стабилизаторы для противодействия механическому напряжению, или ингибиторы протеазы. Если требуется, в качестве пеногасящего агента может быть добавлено неионное поверхностно-активное вещество, такое как смеси полиэтиленгликолей и полипропиленгликолей (например, Pluronic F68.RTM., SERVA).

Как применяется здесь, "включающая животный белок среда" представляет собой среду клеточной культуры, которая включает любой белок, который имел происхождение от человека как источника или животного в качестве источника.

Как используется здесь, "не содержащая белок среда" представляет собой среду клеточной культуры, которая не содержит никакого белка, который имел бы происхождение от человека как источника или животного в качестве источника.

Термин "не содержащая животный белок среда клеточной культуры" согласно изобретению имеет отношение к среде, которая не содержит белки и/или белковые компоненты от высших многоклеточных не растительных эукариотов. Типичные белки, которые избегаются, представляет собой такие, которые находятся в сыворотке и субстанциях сывороточного происхождения, такие как альбумин, трансферрин, инсулин и прочие факторы роста. Не содержащая животный белок среда клеточной культуры также не содержит любые очищенные продукты животного происхождения и рекомбинантные продукты животного происхождения, а также белковые дигесты и их экстракты, или липидные экстракты, или их очищенные компоненты. Животные белки и белковые компоненты следует отличать от неживотных белков, коротких пептидов и олигопептидов, получаемых из растений (обычно с длиной в 10-30 аминокислот), таких как соевые бобы, и из низших эукариотов, таких как дрожжи, которые могут быть включены в не содержащую животный белок среду клеточной культуры согласно изобретению.

Термин "гидролизат" включает любой дигест материала из источника животного происхождения или растительного происхождения, или экстракты, полученные из дрожжей или бактерий. В среду клеточной культуры согласно изобретению может быть введен "соевый гидролизат", который может представлять собой высокоочищенный соевый гидролизат, очищенный соевый гидролизат или неочищенный соевый гидролизат.

Термин "включающий сыворотку" применительно к среде включает любую среду клеточной куль-

туры, которая содержит сыворотку.

Термин "не содержащий сыворотку" применительно к среде включает любую среду клеточной культуры, которая не содержит сыворотку. Термин "не содержащий сыворотку" подразумевает, что среда предпочтительно имеет менее 0,1% сыворотки и более предпочтительно менее 0,01% сыворотки. Термин "сыворотка" имеет отношение к жидкостной части крови, полученной после удаления фибринового сгустка и кровяных клеток.

В некоторых вариантах исполнения фильтрат или поток фильтрата, полученный из процесса фильтрации, подают в крупномасштабные клеточную культуру и биореактор соответственно. "Крупномасштабная" клеточная культура, как применяемая здесь, имеет отношение к клеточной культуре в количестве по меньшей мере около 100 л, по меньшей мере около 200 л, по меньшей мере около 300 л, по меньшей мере около 400 л, по меньшей мере около 500 л, по меньшей мере около 1000 л, по меньшей мере около 1500 л, по меньшей мере около 2000 л, по меньшей мере около 2500 л, по меньшей мере около 3000 л, по меньшей мере около 4000 л, по меньшей мере около 5000 л, по меньшей мере около 7500 л, по меньшей мере около 10000 л или по меньшей мере около 20000 л. В одном предпочтительном варианте исполнения поток фильтрата, полученный любым способом согласно изобретению, подают в биореактор, используемый в хемотростическом процессе, в процессе перфузии или в процессе с периодической подачей предпочтительно в результате непрерывной фильтрации.

Рассматриваемая здесь клеточная культура может представлять собой любую клеточную культуру независимо от типа и природы культивируемых клеток и фазы роста культивируемых клеток, например, прилипающих клеток и неприлипающих клеток, растущих клеток или клеток с заторможенным ростом.

Термин "стерильный", как применяемый согласно изобретению, имеет отношение к субстанции, которая не является или по существу не является зараженной микробами и/или вирусами. В этом отношении "контаминант" означает материал, который отличается от желательных компонентов в препарате, будь то в среде клеточной культуры или же по меньшей мере в одном компоненте среды клеточной культуры. В контексте "стерильной фильтрации" термин "стерильная фильтрация" представляет функциональное описание того, что препарат подвергают фильтрации через стерильный фильтр для удаления бактериальных и/или микоплазменных контаминантов.

Термин "вирусная фильтрация" используется здесь взаимозаменяемо с термином "наночистка" и означает, что для процесса фильтрации применяют вирусный фильтр, имеющий заданный эффективный размер пор. Как правило, эти фильтры специализированы для удаления вирусов.

Вирусный контаминант, предназначенный для удаления фильтрацией соответственно всем способам согласно изобретению, может представлять собой любой вирус, который известен в технологии в настоящее время или будет открыт в будущем. Это определение также включает потенциальный вирусный контаминант, который должен быть удален фильтрацией, и также предусматривает, что способами согласно настоящему изобретению удаляется более чем один вирус. Например, вирусный контаминант или потенциальный вирусный контаминант может быть представителем семейств вирусов Orthomyxoviridae, Arenaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Arteriviridae, RetParvoviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Retroviridae, Reoviridae, Circoviridae, Adenoviridae, Poxviridae, Herpesviridae, Iridoviridae или Reoviridae. Более конкретно, вирусный контаминант может быть любым из группы, состоящей из canine parvoviridae (парвовируса собак) (CPV), мелкого вируса мышей (MVM), вируса долины Каш, вируса Буньямвера, вируса энцефалита Northway, вируса гриппа A/B, вируса аргентинской геморрагической лихорадки (вируса Хунин), вируса парегриппа 1/2/3, вируса зеленой марышки 5, вируса эпидемического паротита (свинки), респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота, вируса Сендай, вируса болезни Ньюкасла, вируса пневмонии мышей, вируса везикулярного стоматита, вируса бешенства, коронавируса крупного рогатого скота, вируса мышинного гепатита, вируса желтой лихорадки, вируса Западного Нила, вируса лихорадки Денге, вируса клещевого энцефалита, вируса энцефалита Сент-Луис, вируса рыбьего гриппа 2117, вируса энцефаломиокардита, вируса Коксаки В-3, вируса энцефалита мышей Тейлера, вируса ящура, энтеровируса крупного рогатого скота, энтеровируса свиней, вируса леса Семлики, вируса Синдбис, вируса краснухи, вируса японского энцефалита, вируса восточного энцефаломиелита лошадей, вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней, вируса пенестости, реовируса 1/2/3, реовируса птиц, ротавируса, цирковируса свиней 1, аденовируса, вируса псевдобешенства, вируса гамма-герпеса мышей 68, вируса простого герпеса 1, вируса FV3 (Frog virus 3), мелкого вируса мышей (mice-cutter (MVMc)), вируса болезни синего языка (BTV), вируса эпизоотической геморрагической болезни (EHDV), возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV), парвовируса свиней (PPV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), реовируса 3, вируса лейкемии мышей (MuLV), вируса гепатита А, вируса полиомиелита, или парвовируса Parvoviridae B19.

Термин "вирусный фильтр" применяется здесь взаимозаменяемо с терминами "задерживающий вирусы фильтр", "фильтр для удаления вирусов" и "наночистка" и в основном имеет отношение к фильтру, к характеристикам которого, делающим его в принципе способным задерживать вирусы, относится эффективный размер пор для надлежащего исполнения этой функции. Эти характеристики включают в порядке примера такие параметры мембраны, как морфология, форма пор, плотность и равномерность пор,

эффективный размер пор, толщина мембраны и т.д. Мембраны вирусных фильтров, применимых в настоящем изобретении, включают мембраны, которые действуют по принципу эксклюзии по размеру и заряду, возможно, в сочетании с задерживанием адсорбционной природы. Механизмы эксклюзии по размеру и адсорбционного задерживания не обязательно исключают друг друга и в фильтре могут эффективно использоваться один или более механизмов.

Вирусный фильтр, как определяемый в настоящем изобретении и используемый в одном варианте осуществления настоящего изобретения, отличается тем, что имеет мембрану с эффективным размером пор максимум 75 нм. В одном варианте исполнения согласно изобретению нижний предел эффективного размера пор составляет около 5 нм, около 10 нм, около 15 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 30 нм, около 35 нм, около 50 нм, или около 60 нм. В указанном варианте исполнения согласно изобретению верхний предел эффективного размера пор составляет около 10 нм, около 15 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 35 нм, около 50 нм, около 60 нм, или около 75 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный фильтр имеет эффективный размер пор от около 5 до около 75 нм, или от около 10 до около 75 нм, или от около 15 до около 75 нм, или от около 20 до около 75 нм, или от около 15 до около 50 нм, или от около 15 до около 35 нм.

Эффективный размер пор, как применяемый здесь, представляет собой характеристику мембраны и имеет отношение к размеру частицы, которая может быть эффективно задержана мембраной, принимая во внимание, что уровень эффективности описывается логарифмическим множителем величины уменьшения количества частиц такого размера.

Вирусный фильтр, используемый в способах согласно настоящему изобретению, может представлять собой любой фильтр, имеющий конструкцию, которая является достаточной для выдерживания объемной производительности по меньшей мере около 2000 л/м², или по меньшей мере около 3000 л/м², или по меньшей мере около 4000 л/м², или по меньшей мере около 5000 л/м², или по меньшей мере около 7500 л/м², или по меньшей мере около 10000 л/м², или по меньшей мере около 20000 л/м², или который может действовать в течение периода времени от более чем около 24 ч до около 7 месяцев, или предпочтительно в течение по меньшей мере 48 ч, около 72 ч, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 7 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев или около 7 месяцев.

Конечно, если в способе согласно изобретению применяют более чем один фильтр, то в процессе фильтрации также могут быть использованы вирусные фильтры различных типов в сочетании, предпочтительно в параллельном или последовательном соединении.

Примерные вирусные фильтры включают одно- или многослойную мембрану и выполнены из такого материала, как поливинилиденфторид (PVDF), целлюлоза, модифицированная целлюлоза, например, искусственные полые волокна из медно-аммиачной целлюлозы, или простой полиэфирсульфон. Мембраны вирусного фильтра могут иметь нейтральный, отрицательный или положительный заряд. Мембраны могут представлять собой ионные мембраны, т.е. они могут содержать катионные или анионные группы, но нейтральные мембраны могут быть предпочтительными, в зависимости от условий величины pH. Мембраны вирусных фильтров могут быть выбраны из гидрофобных и гидрофильных мембран. В одном предпочтительном варианте исполнения мембрана вирусного фильтра, используемого в способе согласно изобретению выполнена из поливинилиденфторида (PVDF) или простого полиэфирсульфона.

Изготовители примерных фильтров, продемонстрировавших способность удалять вирусы, включают без ограничения фирмы Asahi/Planova, PALL, Millipore, Sartorius, Gambro и Amersham/AG Technology. Фильтры, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения фильтр Asahi's Planova 15 N (фирма Asahi Kasei Corporation, Planova Division), фильтр Planova 20 N (фирма Asahi Kasei Corporation, Planova Division), фильтр Planova 35 N (фирма Asahi Kasei Corporation, Planova Division) и фильтр BioEX (фирма Asahi Kasei Corporation, Planova Division).

Конечно, желательно, чтобы фильтр, применяемый в одном из способов согласно настоящему изобретению, мог быть обработан в автоклаве, и/или стерилизован в автоклаве, и/или иным образом стерилизован перед применением. Однако для исполнения изобретения пригодны все прочие возможности обеспечения стерильности используемого вирусного фильтра. Кроме того, желательно, чтобы фильтр мог быть испытан на целостность перед применением и/или после использования. В одном предпочтительном варианте исполнения в способе согласно изобретению применяют подвергнутый обработке в автоклаве, испытанный на целостность вирусный фильтр, имеющий мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) или простого полиэфирсульфона.

"Фильтрат", используемый взаимозаменяемо с термином "пермеат", имеет отношение к раствору, который проходит сквозь фильтр или мембрану, а также к раствору, который прошел через фильтр или мембрану.

"Ретентат", как используемый здесь, имеет отношение к компоненту раствора, который задерживается и не проходит сквозь фильтр или мембрану, а также который не прошел через фильтр или мембрану.

Оборудование для вирусной фильтрации, применимое в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один мембранный элемент для вирусной фильтрации, разделяющий подаваемый материал на пред- и послефильтровую секцию. Фильтрационное оборудование обычно включает также устройства

для регулирования давления и расхода потока, такие как насосы и клапаны, а также измерители расхода потока и давления и денситометры. Оборудование также может включать несколько фильтрующих мембранных элементов в различных комбинациях, размещенных параллельно или последовательно, или в обоих вариантах.

Расход фильтрационного потока варьирует в соответствии с давлением. Как правило, в нормальном технологическом режиме чем выше давление, тем больше величина расхода потока. Расход потока также варьирует в зависимости от температуры. Повышение эксплуатационной температуры увеличивает расход потока. Однако при более высоких температурах и повышенных давлениях существует возрастающая тенденция к разрушению мембраны. Для неорганических мембран могут быть использованы более высокие температуры, давления и более высокие диапазоны pH, чем для полимерных мембран.

Для квалифицированного специалиста в этой области технологии однозначно очевидно, что вместо вирусного фильтра согласно изобретению может быть применен фильтр, имеющий предел отсежки по молекулярной массе менее чем около 5000 дальтонов или менее чем около 1000 дальтонов, чтобы удалять также вирусы. В этом контексте "предел отсежки по молекулярной массе" (MWCO) представляет собой характеристику мембраны фильтра, которая задает среднюю молекулярную массу растворенных веществ, однако также частиц и вирусов, которые не проникают через мембрану этого фильтра.

Значение pH в процессе вирусной фильтрации согласно настоящему изобретению может быть отрегулировано на любой диапазон, необходимый для обеспечения стабильности и функциональности фильтруемого препарата, предпочтительно среды клеточной культуры или буфера. Например, значение pH может быть отрегулировано на величину от около 1 до около 10, предпочтительно от около 2 до около 8 или от около 3 до около 7, предпочтительно от около 6,8 до около 8 и наиболее предпочтительно от около 7,0 до около 7,45 (физиологическое значение pH).

Также предусматривается, что способ согласно изобретению может быть интегрирован в систему ниже по потоку относительно стерилизующего фильтра, который удаляет бактериальный загрязнитель и тем самым дает стерильный сырьевой поток препарата, который может представлять собой "исходный препарат", т.е. препарат, используемый в любом способе согласно изобретению.

В одном варианте исполнения способ согласно изобретению может быть выполнен с использованием двух или более фильтров, размещенных последовательно. Это имеет то преимущество, что повышает эффективность очистки от вирусов и безопасность против потенциального отказа вирусного фильтра или проскока. В альтернативных вариантах исполнения фильтрацию выполняют с использованием двух или более вирусных фильтров, размещенных параллельно, тем самым обеспечивая возможность замены вирусного фильтра без прерывания непрерывного процесса и предотвращения непредвиденных задержек среды, например, вследствие засорения.

В других дополнительных вариантах исполнения фильтрацию выполняют с использованием по меньшей мере двух фильтров, размещенных параллельно в трубопроводной системе, включающей Y-образное разветвление, причем каждый фильтр находится в сообщении по текучей среде с ветвью Y-образного разветвления и источником подачи препарата. В некоторых вариантах исполнения Y-образное разветвление включает соединительную деталь. В других вариантах исполнения фильтрацию выполняют с использованием конфигурации, содержащей многочисленные фильтры, размещенные как последовательно, так и параллельно. В контексте настоящего изобретения особенно полезным является компоновка, в которой по меньшей мере один второй фильтр размещают параллельно в соединении с другими параллельными фильтрами, расположенными последовательно, чтобы иметь возможность заменять один из фильтров без остановки процесса фильтрации при необходимости технического обслуживания.

В некоторых вариантах исполнения фильтр подвергают испытанию на целостность перед применением. Испытание на целостность может принимать форму испытания на основе водно-воздушной диффузии, в котором в фильтр направляют воздух, затем фильтр погружают в стерильную воду и проверяют на образование пузырьков, которые показывали бы утечку в фильтре.

В одном варианте исполнения вирусный фильтр или мембрана вирусного фильтра могут быть подвергнуты предварительной обработке перед процедурой вирусной фильтрации, например промыванию моющим средством, в частности кислотным моющим средством, щелочным моющим средством и/или этанолом.

В одном варианте осуществления изобретения, в способе согласно изобретению фильтрация также может быть выполнена в режиме тангенциального потока. В контексте настоящего изобретения термин "фильтрация в режиме тангенциального потока" используется здесь взаимозаменяемо с термином "фильтрация в перекрестном потоке". В режиме тангенциального потока траекторию потока жидкости на стороне выше по потоку относительно фильтра направляют приблизительно параллельно, или по касательной, или вдоль поверхности фильтра. Пропускание пермеата облегчается тем, что ограничивается течение ретентата относительно подаваемого сырьевого потока, приводя к противодавлению в системе и обеспечивая миграцию пермеата через мембрану фильтра. Постоянная смывающая струя вдоль поверхности мембраны дает эффект, состоящий в минимизации засорения загрязнителями фильтруемого продукта. Пригодным является любой вирусный фильтр, который достигает по меньшей мере 1 Log₁₀ вели-

чины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 2 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 3 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 4 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 5 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 6 Log_{10} величины уменьшения для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 7 Log_{10} величины уменьшения для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 8 Log_{10} величины уменьшения для вирусного контаминанта, предпочтительно по меньшей мере 4 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта. Все показатели log-величины уменьшения могут быть применимыми для любого из эффективных размеров пор максимум 75 нм вирусного фильтра. В одном варианте исполнения согласно изобретению нижний предел эффективного размера пор вирусного фильтра составляет около 5 нм, около 10 нм, около 15 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 30 нм, около 35 нм, около 50 нм, или около 60 нм. В указанном варианте исполнения согласно изобретению верхний предел эффективного размера пор вирусного фильтра составляет около 10 нм, около 15 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 35 нм, около 50 нм, около 60 нм, или около 75 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный фильтр имеет эффективный размер пор от около 5 нм до около 75 нм, или от около 10 нм до около 75 нм, или от около 15 нм до около 75 нм, или от около 20 нм до около 75 нм, или от около 15 нм до около 50 нм, или от около 15 нм до около 35 нм.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения используют фильтрацию в нормальном потоке. "Фильтрация в нормальном потоке", используемая здесь взаимозаменяемо с терминами "тупик", "однократный проход" и "фильтрация в прямом потоке", имеет отношение к процессу фильтрации с вирусным фильтром, в котором траекторию течения жидкости обычно направляют перпендикулярно поверхности фильтра, в зависимости от конструкции фильтрационного модуля поток текучей среды также мог бы быть направлен тангенциально к мембране фильтра, однако, в отличие от фильтрации в перекрестном потоке, не предполагается никакая рециркуляция ретентата, чем предусматривается, что удельный расход потока до и после фильтра является одинаковым. Пригодным является любой вирусный фильтр, который достигает по меньшей мере 1 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 2 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 3 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 4 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 5 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 6 Log_{10} величины уменьшения для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 7 Log_{10} величины уменьшения для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 8 Log_{10} величины уменьшения для вирусного контаминанта, предпочтительно по меньшей мере 4 Log_{10} величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта. Все показатели log-величины уменьшения могут быть применимыми для любого из эффективных размеров пор максимум 75 нм вирусного фильтра. В одном варианте исполнения согласно изобретению нижний предел эффективного размера пор вирусного фильтра составляет около 5 нм, около 10 нм, около 15 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 30 нм, около 35 нм, около 50 нм, или около 60 нм. В указанном варианте исполнения согласно изобретению верхний предел эффективного размера пор вирусного фильтра составляет около 10 нм, около 15 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 35 нм, около 50 нм, около 60 нм, или около 75 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный фильтр имеет эффективный размер пор от около 5 нм до около 75 нм, или от около 10 нм до около 75 нм, или от около 15 нм до около 75 нм, или от около 20 нм до около 75 нм, или от около 15 нм до около 50 нм, или от около 15 нм до около 35 нм.

Как было бы понятно квалифицированным специалистам в этой области технологии, все варианты осуществления изобретения могут быть реализованы на практике с помощью любой доступной системы, технически применимой для этой цели, например, перистальтического насоса с переменной скоростью или с фиксированной скоростью подачи, центробежного насоса и т.д. Для создания течения через вирусный фильтр при постоянном или переменном давлении во время процесса фильтрации могут быть применены напорная емкость любого типа или иной контейнер.

Специалистам с обычной квалификацией в этой области технологии будет понятно, что выбор типа фильтра и режима действия (тупиковая фильтрация или фильтрация в режиме тангенциального потока) будет зависеть от таких факторов, как состав, содержание белка, молекулярно-массовое распределение, содержание загрязняющих примесей/дисперсных частиц, или любая иная биохимическая или физическая характеристика обрабатываемого сырьевого материала, технологические требования и ограничения (допустимое давление, продолжительность обработки, фильтруемые объемы) или характеристики потенциального вирусного контаминанта, например величина вируса. Также должны приниматься во внимание доступность испытания на целостность в ходе процесса и логистика исследований очистки от вирусов. Тупиковую фильтрацию типично следует применять для сырьевых потоков с высокой чистотой для обеспечения приемлемого технологического расхода потока, тогда как в некоторых вариантах исполнения фильтрация в режиме тангенциального потока может применяться в отношении сырьевых потоков с высоким содержанием дисперсных частиц. В некоторых предпочтительных вариантах исполнения благоприятной является фильтрация в нормальном потоке в сочетании с режимом непрерывной фильтрации

при использовании по меньшей мере одного вирусного фильтра, имеющего эффективный размер пор максимум 75 нм. Конечно, этот вариант исполнения также может объединять в себе все прочие параметры настоящего изобретения.

Разумеется, должно быть понятно, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, так как, конечно, может варьировать как таковое. Также должно быть понятно, что применяемая здесь терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов исполнения и не предполагается как ограничивающая, поскольку область настоящего изобретения будет ограничиваться только пунктами прилагаемой формулы изобретения.

Где приведен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст определенно не оговаривает иного, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне охватывается областью изобретения. Верхний и нижний пределы этих более узких диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также предполагаются входящими в область изобретения, кроме разве что любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Где указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из таких включенных пределов, также входят в область изобретения.

Если не оговорено нечто иное, все применяемые здесь технические и научные термины имеют такое же значение, как это является общепринятым для специалиста с обычной квалификацией в области технологии, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практической реализации или в тестировании настоящего изобретения также могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, теперь будут описаны показательные иллюстративные способы и материалы.

Все публикации и патенты, цитированные в этом описании, включены здесь ссылкой, как если бы каждая индивидуальная публикация или каждый патент были конкретно и индивидуально указаны включенными ссылкой, и включены здесь ссылкой для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитированы публикации. Цитирование любой публикации производится для ее раскрытия до даты подачи и не должно рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать задним числом такую публикацию на основании предшествующего изобретения. Кроме того, даты приведенной публикации могли бы отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

Следует отметить, что как использованные здесь и в пунктах прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают обозначаемые объекты во множественном числе, если контекст ясно не оговаривает иного. Кроме того, следует отметить, что пункты формулы изобретения могут быть рассчитаны на исключение любого необязательного элемента. Как таковое, это заявление предполагается служащим в качестве априорной основы для применения такой исключающей терминологии, как "единственно", "только" и т.п., в связи с перечислением заявляемых элементов, или применения "негативного" признака.

Как будет понятно квалифицированным специалистам в этой области технологии по прочтении настоящего изобретения, каждый из индивидуальных вариантов исполнения, описанный и иллюстрированный здесь, имеет дискретные компоненты и признаки, которые могут быть без труда отделены от признаков любых других нескольких вариантов исполнения или объединены с ними, без выхода за пределы области или смысла настоящего изобретения. Любой перечисленный способ может быть исполнен в порядке указанных событий или в любом ином порядке, который является логически возможным.

Примеры

Ниже приведены примеры для иллюстрирования настоящего изобретения. Эти примеры не означают ограничения настоящего изобретения любым конкретным вариантом применения или теоретическими основами операции.

Пример 1. Маломасштабная вирусная фильтрация с различными вирусными фильтрами и средами клеточных культур.

Мембраны для вирусной фильтрации от различных производителей (см. табл. 2) оценивали по их кинетическим характеристикам фильтрации на фильтрах с различными размерами с использованием сред клеточных культур, содержащих соевые гидролизаты в концентрации 4 г/л из различных партий и поставщиков (см. табл. 3). Состав сред клеточных культур и препарата описан в примере 2. Эксперименты по фильтрации проводили либо с регулированием давления в напорной емкости (фиг. 3, 4, 5; и спайк-эксперименты в фиг. 7, 8 и 9), либо с регулированием величины расхода потока, например, с помощью перистальтического насоса (фиг. 1, 2, 3 и 6). Прочее оборудование, использованное для регулирования температуры и давления в экспериментах, описано в табл. 4.

Таблица 2

Перечень вирусных фильтров

Внутреннее кодовое обозначение фильтра в фигурах/примерах	Изготовитель/Наименование продукта/Размер
Фильтр А	Sartorius Virosart CPV 180 см ²
Фильтр В	Millipore Viresolve NFP 3,1 см ²
Фильтр С	Pall Ultipor VF сорта DV20 700 см ²
Фильтр D	Asahi BioEX 10 см ²
Фильтр Е	Sartorius Virosart CPV 2000 см ²
Фильтр F	Millipore Viresolve NFP 850 см ²
Фильтр G	Asahi 15 N 10 см ²
Фильтр H	Pall Ultipor VF сорта DV20 9,6 см ²
Фильтр I	Sartorius Virosart CPV 5 см ²

Таблица 3

Перечень соевых гидролизатов

Внутреннее кодовое обозначение соевого гидролизата в фигурах/примерах	Изготовитель/Наименование продукта/Внутренний номер партии
Соевый гидролизат 1	Kerry HyPep 1510 №1
Соевый гидролизат 2	DOMO SE50 MAF UF №1
Соевый гидролизат 3	DOMO SE50 MAF UF №2
Соевый гидролизат 4	DOMO SE50 MAF UF №3
Соевый гидролизат 5	Kerry HyPep 1510 №2
Соевый гидролизат 6	DOMO SE50 MAF UF №4
Соевый гидролизат 7	DOMO SE50 MAF UF №5

Таблица 4

Перечень оборудования

WM Marprene, канал, мм × стенка, мм: 3,2×1,6, и 1,6×1,6 (фирма Watson Marlow)
Перистальтические насосы Watson Marlow 101U/R (фирма Watson Marlow)
Напорная емкость Sartorius, Model 17532 (фирма Sartorius-Stedim)
Датчики давления: Pascal Ci CL1010 (фирма Labom), и KrosFlo ACPM-499-03N (фирма Spectrum Labs)
Весы Sartorius FBG64EDE-SOCE (фирма Sartorius Stedim)
Водяная баня Naake DC10 (фирма Thermo Scientific)
Температурный датчик CEM IR-68, инфракрасный термометр с гибким лазерным указателем

Пример 2. Приготовление сред клеточных культур.

Общее описание состава сред клеточных культур приведено ниже в табл. 5 с составом различных соевых гидролизатов, перечисленных выше в табл. 3. Различные партии сред клеточных культур подвергли стерилизующей фильтрации с использованием стерилизующего фильтра, например, Pall Fluogodyne® II DJL, мембранный фильтрационный картридж, поры 0,1 мкм, перед проведением различных вирусных фильтраций, описанных в примерах. Описанные здесь препараты сред использовали во всех экспериментах, описанных и показанных в фиг. 1-11.

Таблица 5

Состав сред

Компонент	Концентрация [г/кг]
DMEM/HAMS F12	11,76
Этаноламин	0,00153
Lutrol F68	0,25
Соевый гидролизат	4,0
Элемент в следовом количестве – маточный раствор	Макс. 4 мкг/л
L-Глутамин	0,6
NaHCO ₃	2,0
Дистиллированная вода	Ad 1 кг

Пример 3. Приготовление фильтра.

Вирусные фильтры приготовили согласно инструкциям по использованию продуктов от изготовителей вирусных фильтров. Кроме случаев, когда фильтры были поставлены и собраны стерильными, фильтры подвергли обработке в автоклаве при температуре >121°C в течение 20 мин.

Пример 4. Испытание на целостность.

После использования фильтры с надлежащим размером (фильтры А, С, Е и F из табл. 2) промыли согласно соответствующим рекомендациям изготовителей. Испытание в прямотоке выполняли с использованием прибора Palltronic Flowstar XC (фирма Pall, США) согласно инструкциям изготовителя. Все испытания на целостность выполняли после описанных здесь фильтрационных экспериментов с соблюдением заданных ограничений.

Пример 5. Пропорциональная взаимосвязь между разностью давлений и величиной расхода потока.

Для исследования взаимосвязи между разностью давлений и объемным расходом потока среду клеточной культуры подвергли фильтрации с использованием автоклавированных вирусных фильтров при температуре окружающей среды. Средами заполнили напорную емкость и вирусные фильтры присоединили к напорной емкости, в которой затем создали давление на различных уровнях. Удельный расход потока и разности давлений измеряли с использованием весов и датчика давления и регистрировали относительно времени (фиг. 3).

Пример 6. Маломасштабная модельная система ферментации емкостью 10 л.

Сравнение сред клеточных культур с вирусной фильтрацией и без нее проводили с использованием системы ферментации рекомбинантного белка, экспрессированного СНО-клетками (яичника китайских хомячков) (фиг. 6). Исследовали производительность в отношении скорости роста и выходов. Приготовили среду клеточной культуры, как описано в примере 2. Одну часть эксперимента проводили только с подвергнутой стерильной фильтрации средой, тогда как другую часть проводили с той же средой и дополнительной вирусной фильтрацией с использованием фильтра Sartorius Virosart CPV, 180 см². Фильтрацию проводили при температуре 2-8°C. Эксперимент по ферментации проводили в перемешиваемых настольных биореакторах типа Rushton емкостью 10 л при поточном контроле величины pH, pO₂ и температуры. Заданные значения параметров и диапазоны для ферментации были следующими:

pH: 7,05 (6,8-7,3);

T: 37,0°C (35-39°C);

DO (растворенный кислород): 20% (насыщение воздухом) (10-60%).

Клетки культивировали в периодическом режиме с последующим хеомостатированием культуры с использованием сред с дополнительной вирусной фильтрацией и без нее. Данные из режима хеомостатирования (скорости роста и продуктивность) были получены от 4-недельной непрерывной клеточной культуры.

Количество клеток определяли измерениями с использованием анализатора CASY. В хеомостатированной культуре удельную скорость роста (μ) рассчитывали согласно выражению

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

где D представляет степень разбавления, рассчитанную как соотношение скорости подачи среды в день и рабочего объема [1/d].

Скорости роста рассчитывали по CASY-гомогенизированным клеткам.

Для биохимического анализа гомогенизированную суспензию центрифугировали при 400×g в центрифуге Heraeus Multifuge 1 S-R в течение 10 мин, и приготовили 1,0-мл аликвоты в пробирках Эппендорфа, и хранили при температуре ≤-20°C. Не содержащие клеток надосадочные жидкости анализировали на активность экспрессированного рекомбинантного белка в хромогенном анализе согласно стандартным технологическим процедурам.

Объемную продуктивность "P" в этом эксперименте рассчитали по выражению

$$P[U/(L \times d)] = \text{активность [mU/мл]} \times \text{степень разбавления [d}^{-1}]$$

Клеточно-специфическую продуктивность "qP" рассчитали по выражению

$$qP[mU/(10E06 \text{ клеток} \times d)] = P[U/(L \times d)] / \text{количество клеток [10E06 клеток/мл]}$$

Пример 7. Маломасштабная модель системы ферментации емкостью 120 л.

Способ непрерывной вирусной фильтрации, выполненный в 120-литровом рабочем объеме среды перед ее добавлением в систему ферментации экспрессированного CHO-клетками рекомбинантного белка, исследовали в отношении его влияния на скорость роста и выходы (фиг. 6А, 6В и 6С). В исследовании сравнивали процессы продуцирования с использованием трех вариантов одной и той же среды клеточной культуры:

а) стандартной среды;

б) стандартной среды, профильтрованной с использованием вирусных фильтров Virosart CPV; и

с) стандартной среды, профильтрованной с использованием вирусных фильтров Millipore Viresolve NFP.

Во время процесса непрерывной фильтрации альтернативно использовали два различных вирусных фильтра (Virosart CPV Midicar с размером 2000 см² и Millipore Viresolve NFP с размером 850 см²) в течение различных интервалов времени. Фильтр Sartorius CPV применяли со дня культивирования K00-K14, K23-K30 и K39-K63 и фильтр Millipore NFP использовали со дня культивирования K14-K23 и K30-K39.

Заданные значения параметров и диапазоны для ферментации были следующими:

pH: 7,05 (6,8-7,3);

T: 37,0°C (35-39°C);

DO: 20% (насыщение воздухом) (10-60%).

Отбор и анализ образцов.

Количества клеток определяли с использованием анализатора CASY® для подсчета клеток и системы анализатора. Для биохимического анализа однородную суспензию центрифугировали при 400×g в центрифуге Heraeus Multifuge 1 S-R (фирма Thermo Scientific, США) в течение 10 мин. Не содержащие клеток надосадочные жидкости анализировали на активность экспрессированного рекомбинантного белка в хромогенном анализе.

В хемотатированной культуре удельную скорость роста (μ) рассчитывали согласно выражению

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

где D представляет степень разбавления, рассчитанную как соотношение скорости подачи среды в день и рабочего объема [1/d].

Скорости роста рассчитывали по CASY-гомогенизированным клеткам.

Объемную продуктивность "P" в этом эксперименте рассчитали по выражению

$$P[U/(L \times d)] = \text{активность [mU/мл]} \times \text{степень разбавления [d}^{-1}]$$

Клеточно-специфическую продуктивность "qP" рассчитали по выражению

$$qP[mU/(10E06 \text{ клеток} \times d)] = P[U/(L \times d)] / \text{количество клеток [10E06 клеток/мл]}$$

Пример 8. Вирусная фильтрация с помощью вирусных фильтров ASANI Planova 15N.

В содержащую соевый гидролизат среду (DOMO SE50 MAF № 5) внесли MMV и поместили в резервуар, соединенный с источником сжатого газообразного азота. Зараженный MMV материал пропустили через вирусный фильтр ASANI Planova 15N величиной 10 см², конфигурированный в поточной линии в режиме тупиковой фильтрации при постоянном давлении 1100 мбар (110 кПа) (заданное контрольное значение). Измеряли и непрерывно регистрировали минимальные и максимальные значения следующих параметров: давления подводимого сырьевого потока; температуры сырьевого потока, фильтрата и окружающей среды, и веса фильтрата (изменение которого использовали для расчета величины расхода потока фильтрата). Образцы отбирали ежедневно вплоть до 7 дней и анализировали для титра MMV-вируса (фиг. 7).

Пример 9. Вирусная фильтрация с использованием вирусных фильтров ASANI Planova BioEX.

В содержащую соевый гидролизат среду (экспериментальный цикл № 1 с соевым гидролизатом DMV SE50 MAF UF № 5, экспериментальный цикл № 2 с соевым гидролизатом SDMV SE50 MAF UF № 4) внесли MMV и поместили в резервуар, соединенный с источником сжатого газообразного азота. Зараженный MMV материал пропустили через вирусный фильтр ASANI Planova BioEX величиной 10 см², конфигурированный в поточной линии в режиме тупиковой фильтрации при постоянном давлении 2000 мбар (200 кПа) (заданное контрольное значение). Измеряли и непрерывно регистрировали минимальные и максимальные значения следующих параметров: давления подводимого сырьевого потока; температуры сырьевого потока, фильтрата и окружающей среды и веса фильтрата (изменение которого использовали для расчета величины расхода потока фильтрата). Образцы отбирали ежедневно в течение до 5 дней и анализировали для титра MMV-вируса (фиг. 8).

Пример 10. Обобщение вирусной фильтрации.

В среды клеточных культур, содержащие различные соевые гидролизаты, внесли MMV и поместили в резервуар, соединенный с источником сжатого газообразного азота. Различные вирусные фильтры

использовали в комбинации с различными соевыми гидролизатами, как перечислено в табл. 6.

Таблица 6

Комбинация вирусных фильтров и соевых гидролизатов, использованных в спайк-экспериментах

Эксперимент №	Фильтр	Соевый гидролизат, партия	Продолжительность эксперимента [дней]
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

Фильтрации были конфигурированы в тупиковом режиме при постоянном давлении 2 бар (0,2 МПа) (заданное контрольное значение) для всех экспериментов за исключением циклов в экспериментах № 5 и 6, которые были выполнены при постоянном давлении 1,1 бар (0,11 МПа) (заданное контрольное значение). Измеряли и непрерывно регистрировали минимальные и максимальные значения следующих параметров: давления подводимого сырьевого потока, температуры сырьевого потока, фильтра и окружающей среды и веса фильтрата (изменение которого использовали для расчета величины расхода потока фильтрата). Образцы отбирали во время продолжительности экспериментальных циклов и анализировали для титра MMV-вируса. Совокупные log-величины уменьшения рассчитывали из разности общей вирусной инфекционной нагрузки в фильтрате и общей вирусной инфекционной нагрузки до фильтрации (фиг. 9).

Пример 11. Долговременная фильтрация с внесением MMV-вируса.

В среду клеточной культуры, как описанную в примере 2, внесли MMV до титра $5,0[\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{мл}]$ и подвергли долговременной фильтрации в течение 30 дней через вирусный фильтр с размером пор 20 нм (Sartorius Visrosart CPV, 5 см²). Фильтрацию проводили в конфигурации, сравнимой с примерами 9 и 10, но при постоянном давлении 1,1 бар (0,11 МПа) (заданный диапазон: от 0,8 бар до 1,2 бар (0,08-0,12 МПа) и с регулярными прерываниями давления и расхода потока для испытания вирусного фильтра. Величины расхода потока в ходе эксперимента регистрировали и поддерживали выше 4 л/(м²×ч) (фиг. 10).

Отбрали 20 образцов фильтрата (до 5 раз в неделю) и определили титр и нагрузку MMV-вируса. Никакого проскока вируса не наблюдалось ни в одной из анализированных 20 фракций. Вирусные нагрузки варьировали от $<0,9[\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$ до $<2,8[\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$ в зависимости от объема фракции. Общая вирусная нагрузка в фильтратах составляла $<3,0[\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$, которая, если вычесть из начальной вирусной нагрузки зараженного материала (т.е. $8,5[\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$), имеет результатом общий показатель сокращения вирусной нагрузки $>5,5 \log_{10}$. Это представлялось эффективным и полным (фиг. 11).

Хотя вышеприведенное изобретение было описано в некоторых подробностях посредством иллюстрации и примера для целей ясности понимания, специалистам с обычной квалификацией в этой области технологии с учетом инструкций настоящего изобретения будет без труда понятно, что определенные изменения и модификации могут быть сделаны в нем без выхода за пределы смысла и области пунктов прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ приготовления среды для культивирования клеток для приготовления культуры клеток, фармацевтического препарата, диагностического препарата, косметического препарата или пищевого препарата, где способ включает

а) подвергание препарата непрерывной фильтрации в течение по меньшей мере приблизительно 24 ч через вирусный фильтр, имеющий эффективный размер пор максимум 75 нм, причем препарат представляет собой среду для культивирования клеток или по меньшей мере один компонент среды для культивирования клеток,

в котором непрерывная фильтрация действует при объемной производительности по меньшей мере около 2000 л/м².

2. Способ по п.1, в котором непрерывная фильтрация действует при объемной производительности по меньшей мере около 3000 л/м² или по меньшей мере около 5000 л/м².

3. Способ по п.1 или 2, в котором препарат подвергают непрерывной фильтрации в течение по меньшей мере от около 48 ч до около 7 месяцев, или по меньшей мере от около 72 ч до около 3 месяцев,

или в течение по меньшей мере от около 10 дней до около 2 месяцев.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором среду для культивирования клеток получают способом, дополнительно включающим

б) подачу фильтрата в среду для культивирования клеток или по меньшей мере к одному компоненту среды для культивирования клеток.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором непрерывную фильтрацию выполняют при температуре от около 2°C до около 60°C, или от около 10°C до около 40°C, или от около 15°C до около 37°C.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором вирусный фильтр достигает по меньшей мере 1 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 4 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта, или по меньшей мере 6 Log₁₀ величины уменьшения (LRV) для вирусного контаминанта.

7. Способ по п.6, в котором вирусный контаминант представляет собой представителя семейства вирусов Orthomyxoviridae, Arenaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Reridarida, Revarrida, Revarvidoviridae, Retrivoridae, Revarvid, Adenoviridae, Poxviridae, Herpesviridae, Iridoviridae или Reoviridae.

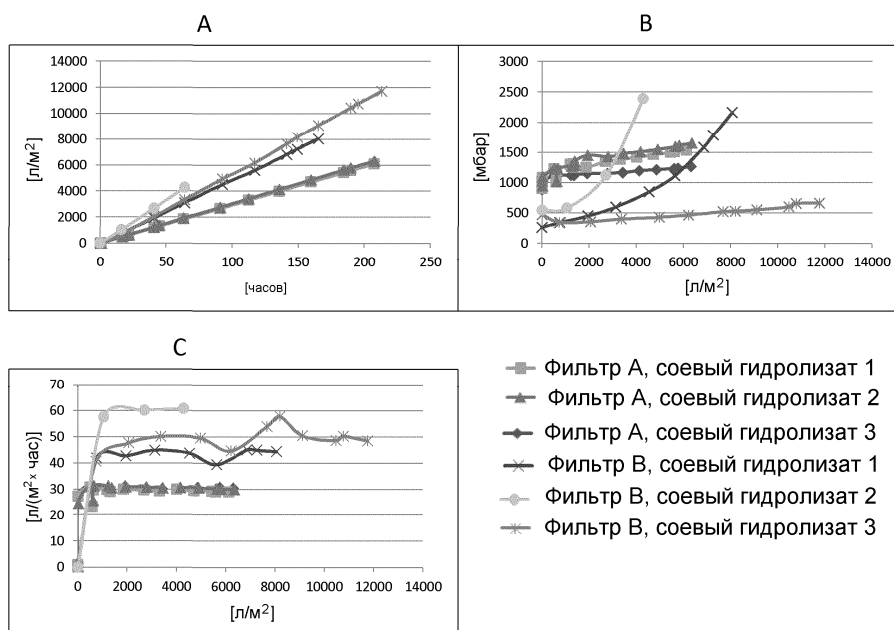
8. Способ по любому из пп.1-7, в котором непрерывную фильтрацию выполняют с использованием двух или более фильтров, размещенных последовательно и/или параллельно.

9. Способ по п.8, в котором непрерывную фильтрацию выполняют с использованием двух фильтров, размещенных параллельно в системе трубопроводов, включающей Y-образное разветвление, где каждый фильтр находится в сообщении по текучей среде с ветвью Y-образного разветвления и источником подачи препарата.

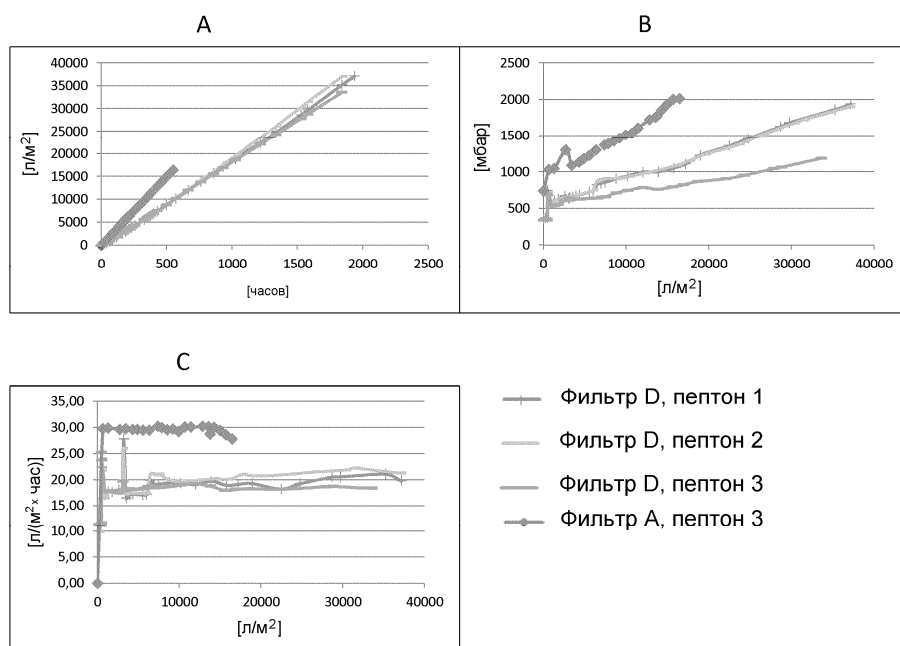
10. Способ по любому из пп.1-9, в котором непрерывную фильтрацию проводят при давлении в диапазоне от около 100 мбар до около 4000 мбар, или от около 100 мбар до около 3500 мбар, или от около 1000 мбар до около 3000 мбар.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором вирусный фильтр способен выдерживать обработку в автоклаве.

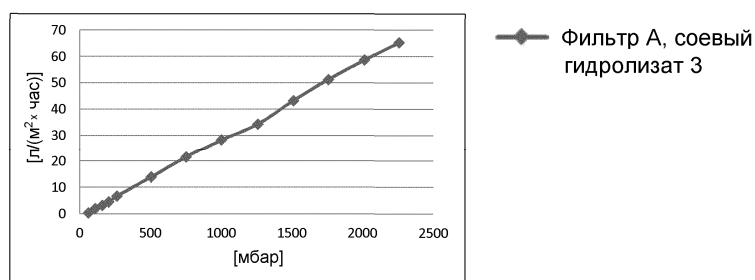
12. Способ по любому из пп.1-11, в котором среда для культивирования клеток содержит соевый гидролизат.



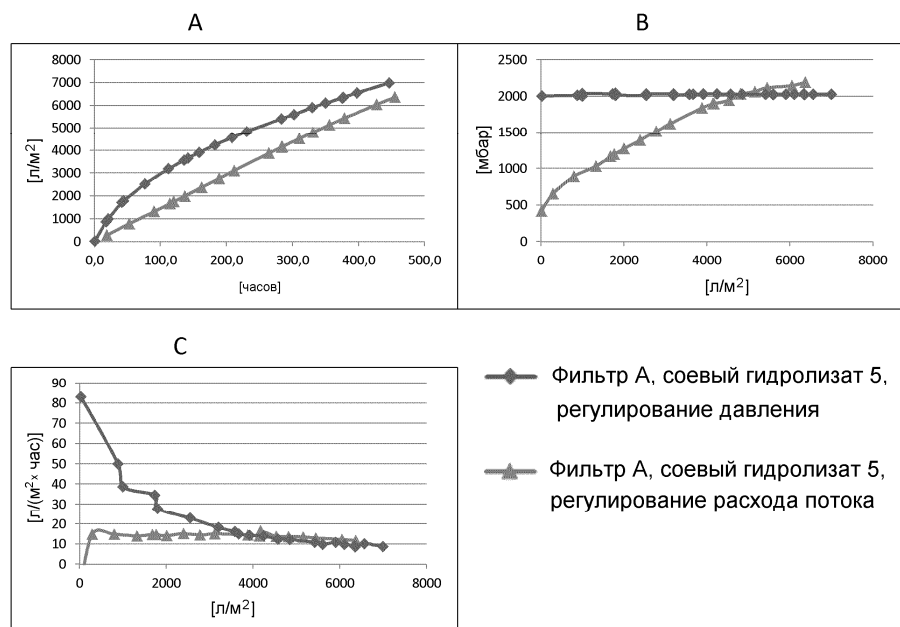
Фиг. 1



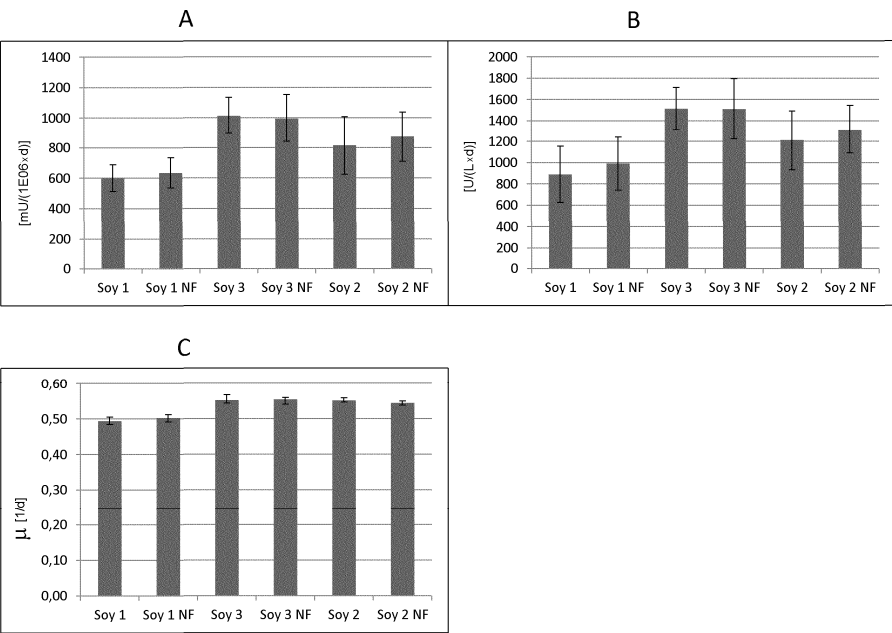
Фиг. 2



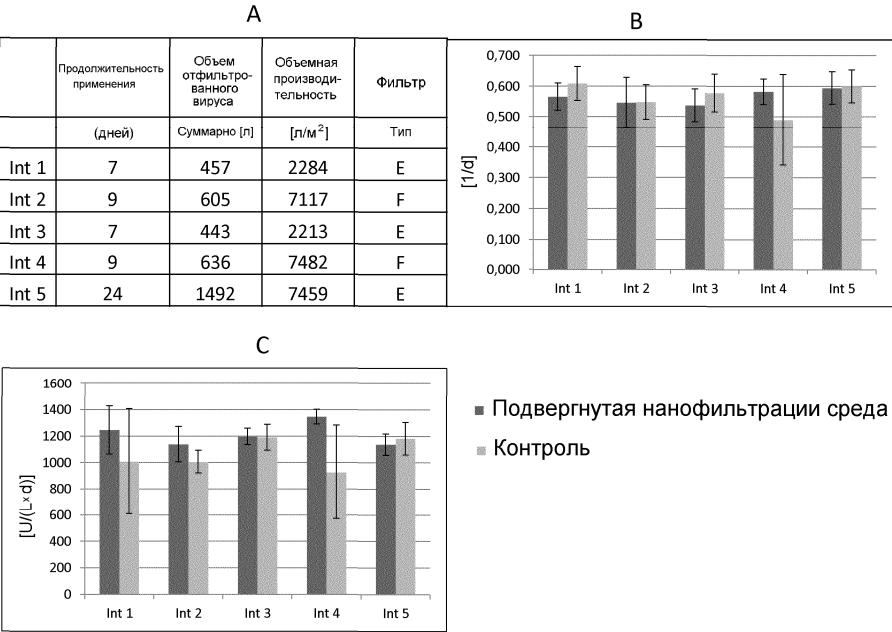
Фиг. 3



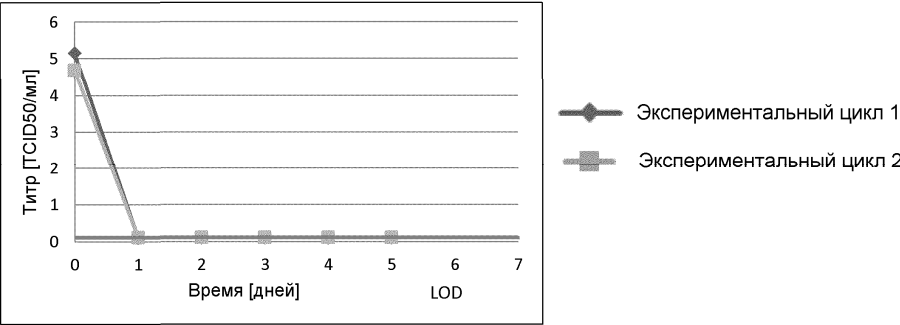
Фиг. 4



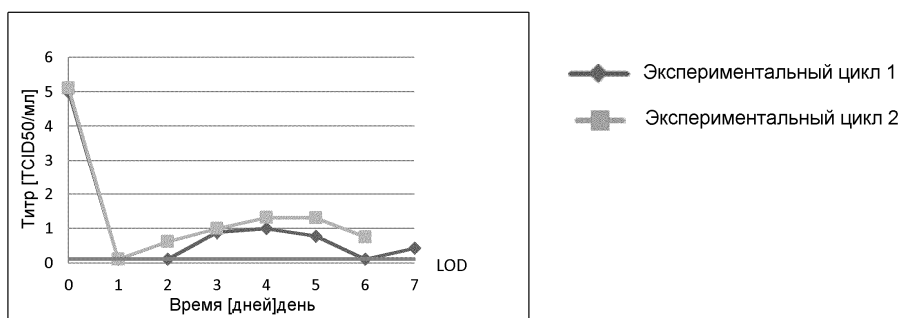
Фиг. 5



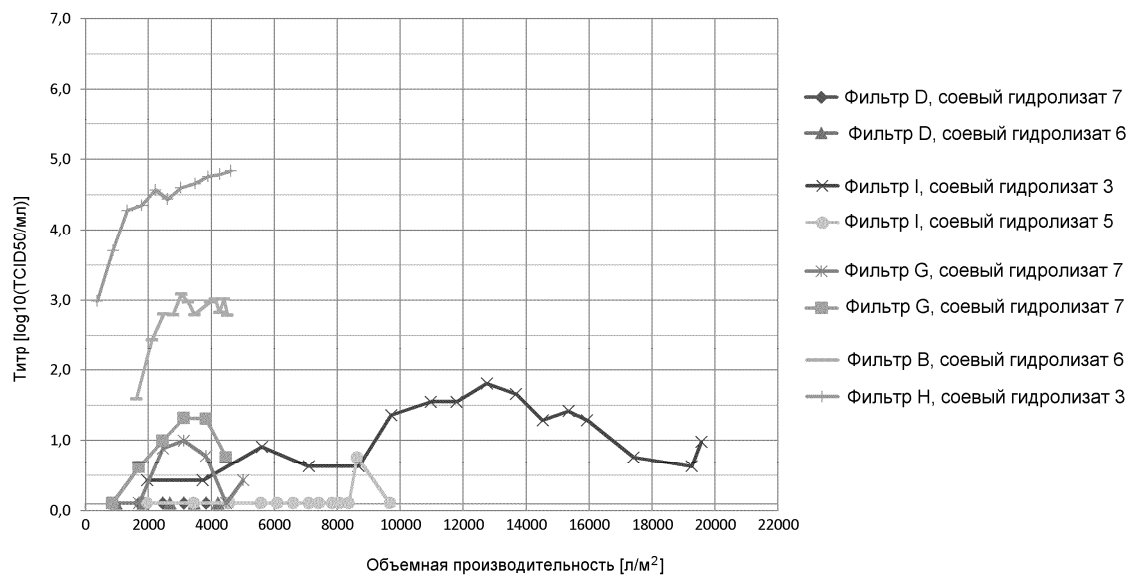
Фиг. 6



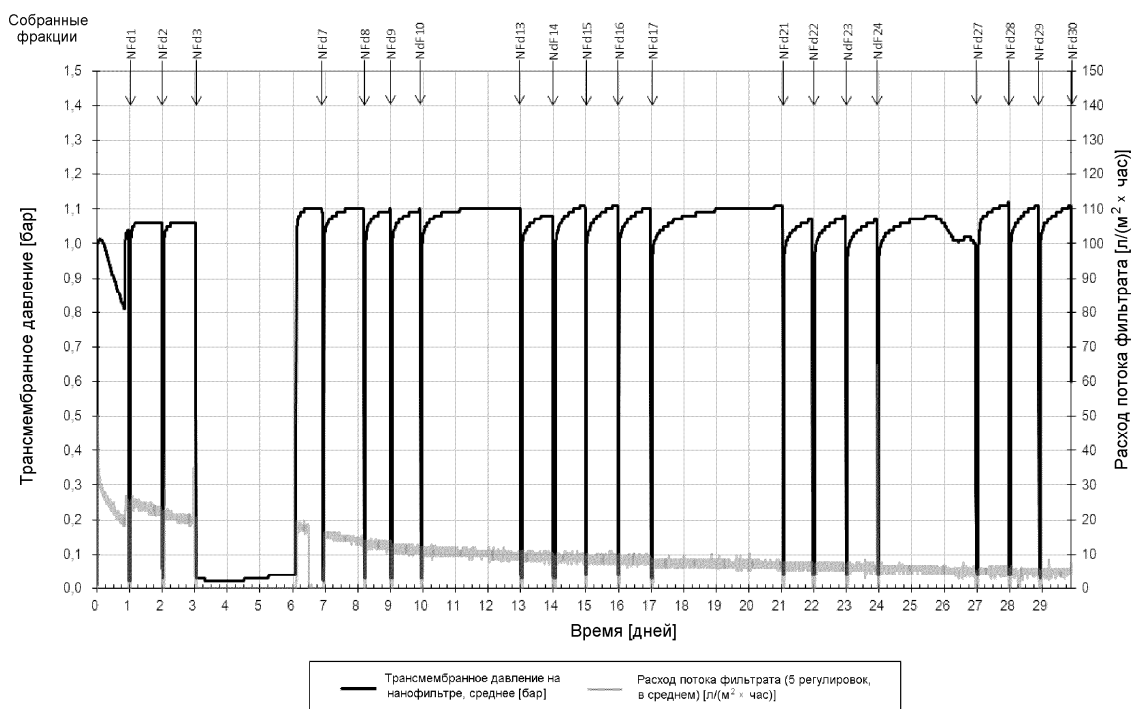
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

	Подаваемый объем [мл]	Титр MMV [log10(TCID50/мл)]	Нагрузка MMV log10(TCID50)
Зараженный материал	3,270	5.0	8.5
NF день 1	287	< -0.8	< 1.7
NF день 2	272	< -0.8	< 1.6
NF день 3	246	< -0.8	< 1.6
NF день 7	330	< 0.3	< 2.8
NF день 8	216	< -0.8	< 1.5
NF день 9	118	< -0.8	< 1.3
NF день 10	121	< -0.8	< 1.3
NF день 13	368	< -0.8	< 1.8
NF день 14	106	< -0.8	< 1.2
NF день 15	98	< -0.8	< 1.2
NF день 16	99	< -0.8	< 1.2
NF день 17	96	< -0.8	< 1.2
NF день 21	354	< -0.8	< 1.7
NF день 22	69	< -0.8	< 1.0
NF день 23	74	< -0.8	< 1.1
NF день 24	67	< -0.8	< 1.0
NF день 27	194	< -0.8	< 1.5
NF день 28	57	< -0.8	< 1.0
NF день 29	49	< -0.8	< 0.9
NF день 30	52	< -0.8	< 0.9
Совокупный профильтрованный объем	3,270		< 3.0
л/м ²	6,540		
RF			> 5.5 log₁₀

Фиг. 11

