

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 912 930**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014 PCT/US2014/018635**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14134147**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014 E 14756874 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2022 EP 2961762**

(54) Título: **Membranas de cromatografía en modo mixto**

(30) Prioridad:

26.02.2013 US 201361769330 P

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

30.05.2022

(73) Titular/es:

**MERCK MILLIPORE LTD. (100.0%)
Tullagreen County Cork
Carrigtwohill, IE**

(72) Inventor/es:

**HONEYMAN, CHARLES, H. y
KOMKOVA, ELENA, N.**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 912 930 T3

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

DESCRIPCIÓN

Membranas de cromatografía en modo mixto

5 Antecedentes de la invención

La cromatografía de modo mixto (MMC), también conocida como cromatografía multimodal, se refiere al método cromatográfico para separar un analito de otro utilizando más de una forma de interacción entre la fase estacionaria y los analitos. Es importante destacar que las interacciones secundarias en MMC deben ser lo suficientemente fuertes como para contribuir a la retención del analito; este enfoque es distinto de la cromatografía monomodo convencional.

MMC tiene muchas ventajas sobre la cromatografía monomodo tradicional y sobre otros métodos de separación. MMC exhibe una mayor selectividad que la cromatografía monomodo. Por ejemplo, las sustancias positivas, negativas y neutras podrían separarse mediante una columna de fase reversa (RP)/intercambio de anión y catión (ACE) en una sola corrida. Además, los medios cromatográficos de modo mixto muestran una capacidad de carga notablemente mayor. Debido a que MMC usa dos formas de interacción, una columna de modo mixto puede reemplazar dos o incluso más columnas de modo único; por lo tanto, MMC es económico y reduce el desperdicio.

20 La capacidad de combinar y optimizar los métodos de separación puede mejorar la selectividad en un proceso de purificación de proteínas. A diferencia de la cromatografía de afinidad, en la que se apunta a un sitio conocido de la proteína, los ligandos de modo mixto no se adaptan a un sitio específico conocido. En consecuencia, la selección de medios de modo mixto se convierte en una búsqueda de sitios en la proteína diana que proporcionen afinidad y selectividad útiles.

25 Los anticuerpos monoclonales constituyen el mayor número de moléculas terapéuticas basadas en proteínas actualmente en uso o en ensayos clínicos. La cromatografía de proteína A se emplea habitualmente como primera etapa de captura en los procesos industriales de purificación de anticuerpos monoclonales debido a su alta selectividad, lo que da como resultado buenos rendimientos y purezas generales. Sin embargo, un inconveniente importante de la cromatografía de afinidad es su alto precio, que, especialmente en el caso de anticuerpos terapéuticos necesarios en dosis altas o para administración crónica, puede representar un componente significativo del costo de los bienes. Además, el ligando de proteína A lixiviado de la matriz de afinidad debe eliminarse mediante más etapas de cromatografía debido a su potencial inmunogenicidad (Roque AC y otros Biotechnology Progress 20 (2004), 639-654). Además, la cromatografía de proteína A tradicional requiere elución a pH bajo, lo que puede provocar la agregación o precipitación del producto.

30 Los anticuerpos monoclonales se pueden separar mediante MMC en medios multimodales que presentan, por ejemplo, funcionalidades iónicas e hidrófobas. Estos medios multimodales ofrecen una valiosa alternativa al enfoque de afinidad clásico para la separación de anticuerpos monoclonales. Debido a la tolerancia a la sal del componente hidrófobo, el sobrenadante de cultivo celular clarificado se puede cargar directamente en la matriz, lo que da como resultado una captura efectiva del anticuerpo monoclonal. Sin embargo, debido a la naturaleza multimodal de la resina, son posibles diferentes tipos de interacción del ligando con un anticuerpo monoclonal particular, lo que requiere condiciones de lavado y elución únicas, que difieren de la cromatografía tradicional de intercambio iónico o de interacción hidrófoba.

35 45 Existe la necesidad de medios y métodos MMC que muestren una mayor selectividad, una alta velocidad de flujo y una baja contrapresión, sean económicos y permitan una vida útil más larga de la columna, tiempos de proceso reducidos, un aumento en la productividad y flexibilidad operativa en comparación con los métodos basados en la afinidad.

40 50 El documento estadounidense 2008/0264867 describe materiales compuestos que comprenden un miembro de soporte que tiene una pluralidad de poros que se extienden a través del mismo y un gel reticulado que está ubicado en los poros del miembro de soporte.

55 Breve resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un material compuesto como se define en la reivindicación 1, que comprende:

60 un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y

un gel reticulado, en donde el gel reticulado comprende un copolímero formado a partir de una reacción de: Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y acrilato de 2-carboxietilo; y el gel reticulado está ubicado en los poros del miembro de soporte.

65 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método, que comprende la etapa de:

poner en contacto a una primera tasa de flujo un primer fluido que comprende una sustancia con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para de esta manera adsorber o absorber una porción de la sustancia sobre el material compuesto.

- 5 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método, que comprende la etapa de:
poner en contacto a una primera tasa de flujo un primer fluido que comprende una sustancia y un material no deseado con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para de esta manera adsorber o absorber una porción del material no deseado sobre el material compuesto.
- 10 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar un material compuesto, que comprende las etapas de:

combinar
 15 ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y acrilato de 2-carboxietilo;
 un fotoiniciador; un agente de reticulación; y un solvente; para formar de esta manera una mezcla monomérica;
 20 poner en contacto un miembro de soporte con la mezcla monomérica, formando de esta manera un miembro de soporte modificado; en donde el miembro de soporte comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte, y el diámetro promedio de poro de los poros es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 µm;
 recubrir el miembro de soporte modificado con una lámina polimérica, formando de esta manera un miembro de soporte recubierto; y
 25 irradiar el miembro de soporte cubierto durante un período de tiempo, de esta manera se forma un material compuesto; en donde
 el gel reticulado está ubicado en los poros del miembro de soporte.

Breve descripción de las figuras

- 30 Figura 1 representa el rendimiento de una membrana de modo mixto en un experimento de unión y elución de hIgG.
 Figura 2 representa el rendimiento de una membrana de modo mixto en un experimento de tolerancia a la sal que investiga el efecto del contenido de sal en el tampón de unión sobre la capacidad de unión de hIgG.
 Figura 3 representa el rendimiento de una membrana de modo mixto en un experimento que investiga el efecto del pH en la capacidad de unión de hIgG.
- 35 Figura 4 representa el rendimiento de una membrana de modo mixto en el modo de unión y elución para purificar anticuerpos monoclonales.
 Figura 5 representa el análisis de la columna SEC: solución de alimentación de mAb.
 Figura 6 representa el análisis de la columna SEC: purificación de mAb después de la proteína mediante el uso de una membrana de modo mixto en modo de unión, elución, eluyente B.
- 40 Figura 7 representa el análisis de la columna SEC: purificación de mAb después de la proteína A mediante el uso de una membrana de modo mixto en modo de unión, elución, eluyente C.
 Figura 8 tabula los resultados de rendimiento para membranas multiciclo de modo mixto.
 Figura 9 tabula la capacidad de unión dinámica con un avance del 10 % para varios medios de modo mixto.
- 45 Figura 10 representa la separación selectiva del citocromo C (1) y la lisozima (2) en una membrana de modo mixto preparada de acuerdo con el Ejemplo 11.
 Figura 11 representa el efecto de la exposición de la membrana a NaOH 0,5 M/NaCl 0,1 M sobre el rendimiento de la membrana.
 Figura de referencia 12 representa la eliminación de agregados de hIgG mediante el uso de una membrana de modo mixto de intercambio de anión.
- 50 Figura 13 representa datos resumidos sobre la eliminación de agregados en fracciones de elución.
 Figura 14 representa datos resumidos sobre la eliminación de HCP/ADN en fracciones de elución.
 Figura de referencia 15 representa la separación selectiva de mioglobina (1), ribonucleasa A (2) y lisozima (3) en una membrana de modo mixto preparada de acuerdo con el Ejemplo 17.
- 55 Figura 16 representa el efecto de la naturaleza del comonómero sobre la permeabilidad de la membrana.
 Figura 17 representa el efecto de la naturaleza del comonómero usado en el rendimiento de la membrana.
 Figura 18 representa el efecto de la naturaleza del reticulante sobre la permeabilidad de la membrana.
 Figura 19 representa el efecto de la naturaleza del reticulante sobre el rendimiento de la membrana.
 Figura de referencia 20 representa una micrografía ESEM de una membrana de modo mixto de intercambio anión preparada de acuerdo con el Ejemplo 8.
- 60 Figura 21 representa una micrografía ESEM de una membrana de modo mixto de intercambio catiónico preparada de acuerdo con el Ejemplo 11.
 Figura de referencia 22 representa una micrografía ESEM de una membrana de modo mixto de intercambio catiónico preparada de acuerdo con el Ejemplo 17.
 Figura de referencia 23 tabula los componentes de la formulación y las concentraciones usadas para fabricar membranas de intercambio de cationes fuertes de modo mixto.

Figura de referencia 24 tabula las características de rendimiento de las membranas de intercambio de cationes fuertes de modo mixto.

Figura de referencia 25 tabula los componentes de la formulación y las concentraciones usadas para fabricar membranas de intercambio de cationes fuertes de modo mixto.

5 Figura de referencia 26 tabula las características de rendimiento de las membranas de intercambio de cationes fuertes de modo mixto.

Descripción detallada de la invención

10 Información general

La invención se refiere a la preparación y uso de soportes cromatográficos de modo mixto en fase estacionaria basados en membranas que emplean múltiples mecanismos químicos para adsorber o separar proteínas u otros solutos. En ciertas modalidades, la invención se refiere a la purificación de una proteína a partir de una mezcla que contiene otros materiales, incluidos anticuerpos fragmentados o agregados, proteínas de células huésped, ADN, endotoxinas y virus. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, soportes cromatográficos que explotan la combinación de al menos dos o posiblemente más de los siguientes mecanismos: intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrofóbica, interacción hidrófila, interacción tiófila, enlaces de hidrógeno, enlaces pi-pi y afinidad por metales.

20 Los materiales compuestos de la invención se pueden usar eficazmente tanto en el modo de "unión-elución" como en el de "flujo continuo". Es importante destacar que, dado que las funcionalidades individuales se incluyen mediante la incorporación de monómeros funcionales, la cantidad relativa de cada grupo funcional se puede ajustar fácil y rápidamente para obtener características de rendimiento óptimas.

25 "Modo enlazar-eluir" en lo que se refiere a la invención en la presente descripción, se refiere a un enfoque operativo de la cromatografía en el que las condiciones del tampón se establecen de modo que tanto la proteína objetivo como los contaminantes no deseados se unan al soporte cromatográfico de modo mixto o al material compuesto. El fraccionamiento de la proteína diana de los otros componentes se logra subsecuentemente cambiando las 30 condiciones de manera que la proteína diana y los contaminantes se eluyen por separado del soporte. Una membrana de intercambio de cationes multimodal de la invención se puede usarse en "modo de elución-unión" que presenta altas capacidades de unión dinámica a alta conductividad, alto rendimiento de volumen y selectividad. En ciertas modalidades, el eluyente se reduce en agregados de la proteína diana en aproximadamente un 50 % a 35 aproximadamente un 99 %. En ciertas modalidades, el eluyente se reduce en agregados de la proteína objetivo en aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 %.

40 En lo que se refiere a la invención de la presente descripción, el término "modo de flujo continuo" se refiere a un enfoque operativo de la cromatografía en el que las condiciones del tampón se establecen de modo que la proteína diana intacta fluya a través de la membrana tras la aplicación mientras los contaminantes se retienen selectivamente. Una membrana de intercambio de aniones multimodal de la invención puede usarse en "modo de flujo continuo" en un proceso posterior a la purificación de proteína A para eliminar contaminantes clave como ADN, 45 proteínas de células huésped (HCP), proteína A lixiviada, agregados y virus en una sola etapa.

45 Diversas características de los materiales compuestos ilustrativos

Composición de los geles

50 Los geles reticulados de la invención se pueden formar a través de la reacción *in situ* de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticulantes. Los geles se forman mediante la reacción de tres o más polímeros reticulables con uno o más reticulantes. Se puede formar un gel reticulado que tiene macroporos de un tamaño adecuado.

55 El gel se puede seleccionar para que comprenda monómeros específicos que tengan una funcionalidad específica. Pueden usarse copolímeros de estos monómeros.

60 Las propiedades de los materiales compuestos pueden calibrarse ajustando el diámetro promedio de los poros del gel macroporoso. El tamaño de los macroporos generalmente depende de la naturaleza y concentración del agente reticulante, la naturaleza del solvente o solventes en los que se forma el gel, la cantidad de cualquier iniciador de polimerización o catalizador y, si está presente, la naturaleza y concentración de porógeno. El material compuesto puede tener una distribución estrecha del tamaño de los poros.

Miembro de soporte poroso

En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso contiene poros con un diámetro promedio de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 25 µm.

5 En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso tiene una porosidad volumétrica entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 90 %.

En ciertas modalidades, el soporte poroso es plano.

10 En ciertas modalidades, el soporte poroso tiene forma de disco.

10 Pueden usarse muchos sustratos o membranas porosas como el miembro de soporte. En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso se fabrica de material polimérico. En ciertas modalidades, el soporte puede ser una poliolefina, la cual está disponible a bajo costo. En ciertas modalidades, la poliolefina puede ser polí(etileno), poli(propileno) o poli(difluoruro de vinilideno). Se mencionan membranas de poliolefina extendida fabricadas mediante separación de fases inducida térmicamente (TIPS), o separación de fases no inducida por solventes. En ciertas modalidades, el miembro de soporte puede elaborarse de polímeros naturales, tales como celulosa o sus derivados. En ciertas modalidades, los soportes adecuados incluyen membranas de polietersulfona, membranas de poli(tetrafluoroetileno), membranas de nailon, membranas de ésteres de celulosa, fibra de vidrio, o papeles de filtro.

20 En ciertas modalidades, el soporte poroso se compone de material fibroso tejido o no tejido, por ejemplo, una poliolefina tal como polipropileno. Tal miembro de soporte fibroso tejidos o no tejidos pueden tener tamaños de poro más grandes que los miembros de soporte TIPS, en algunos casos a aproximadamente 75 µm. Los poros más grandes en el miembro de soporte permiten la formación de materiales compuestos que tienen macroporos más grandes en el gel macroporoso. También se pueden usar miembro de soporte no poliméricos, como soportes a base de cerámica. El miembro de soporte poroso puede tomar varias formas y tamaños.

25 En algunas modalidades, el miembro de soporte tiene la forma de una membrana.

30 En algunas modalidades, el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000 µm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 µm, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 µm.

35 En otras modalidades, pueden combinarse múltiples unidades de soporte poroso, por ejemplo, mediante apilamiento. En una modalidad, puede ensamblarse una pila de membranas de soporte poroso, por ejemplo, de 2 a 10 membranas, antes de que se forme el gel dentro del vacío del soporte poroso. En otra modalidad, se usan unidades de miembros de soporte individuales para formar membranas de material compuesto, que después se apilan antes de su uso.

Relación entre el gel y el miembro de soporte

40 El gel puede anclarse dentro del miembro de soporte. El término "anclado" pretende significar que el gel se mantiene dentro de los poros del miembro de soporte, pero el término no se restringe necesariamente a significar que el gel está unido químicamente a los poros del miembro de soporte. El gel puede mantenerse por la restricción física impuesta al enredarlo y entrelazarlo con elementos estructurales del miembro de soporte, sin que realmente se injete químicamente en el miembro de soporte, aunque en algunas modalidades, el gel puede injertarse en la superficie de los poros del miembro de soporte.

50 Debido a que los macroporos están presentes en el gel que ocupa los poros del miembro de soporte, los macroporos del gel deben ser más pequeños que los poros del miembro de soporte. En consecuencia, las características de flujo y las características de separación del material compuesto dependen de las características del gel, pero son en gran medida independientes de las características del miembro de soporte poroso, con la condición de que el tamaño de los poros presentes en el miembro de soporte sea mayor que el tamaño de los macroporos del gel. La porosidad del material compuesto se puede adaptar llenando el miembro de soporte con un gel cuya porosidad está determinada parcial o completamente por la naturaleza y las cantidades de monómero o polímero, agente de reticulación, solvente de reacción y porógeno, si es usado. Como los poros del miembro de soporte son llenado con el mismo material de gel, se logra un alto grado de consistencia en las propiedades del material compuesto y, para un miembro de soporte particular, estas propiedades están ciertas parcialmente, si no totalmente, por las propiedades del gel. El resultado neto es que la invención proporciona control sobre el tamaño de los macroporos, la permeabilidad y el área superficial de los materiales compuestos.

60 El número de macroporos en el material compuesto no está dictado principalmente por el número de poros en el material de soporte. El número de macroporos en el material compuesto puede ser mucho mayor que el número de poros en el miembro de soporte porque los macroporos son más pequeños que los poros en el miembro de soporte. Como se mencionó anteriormente, el efecto del tamaño de poro del material de soporte sobre el tamaño de poro del gel macroporoso es generalmente insignificante. Se encuentra una excepción en aquellos casos en los que el miembro de soporte tiene una gran diferencia en el tamaño de los poros y en la distribución del tamaño de los poros,

- 5 y en los que se busca un gel macroporoso que tenga tamaños de poros muy pequeños y un intervalo estrecho en la distribución del tamaño de los poros. En estos casos, las grandes variaciones en la distribución del tamaño de los poros del miembro de soporte se reflejan débilmente en la distribución del tamaño de los poros del gel macroporoso. En ciertas modalidades, en estas situaciones puede usarse un miembro de soporte con un intervalo de tamaño de poro estrecho.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los materiales compuestos son relativamente no tóxicos.
- 15 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde los materiales compuestos son tolerantes a intervalos relativamente amplios de concentración de sal en el líquido de contacto.
- 15 Preparación de materiales compuestos
- 20 15 En ciertas modalidades, los materiales compuestos de la invención se pueden preparar mediante métodos en una sola etapa. En ciertas modalidades, estos métodos pueden usar agua u otros solventes beneficiosos para el medio ambiente como solvente de reacción. En ciertas modalidades, los métodos pueden ser rápidos y, por lo tanto, pueden conducir a procesos de fabricación relativamente simples y de bajo costo.
- 25 20 En ciertas modalidades, los materiales compuestos de la invención se pueden preparar mezclando más de tres monómeros, uno o más agentes de reticulación, uno o más iniciadores y, opcionalmente, uno o más porógenos, en uno o más disolventes adecuados. En ciertas modalidades, la mezcla resultante puede ser homogénea. En ciertas modalidades, la mezcla puede ser heterogénea. En ciertas modalidades, la mezcla puede introducirse después en un soporte poroso adecuado, donde puede tener lugar una reacción de formación de gel.
- 30 25 En ciertas modalidades, los solventes adecuados para la reacción de formación de gel incluyen 1,3-butanodiol, éter propílico de di(propilenglicol), N,N-dimetilacetamida, éter dimetílico de di(propilenglicol), 1,2-propanodiol, acetato de éter metílico de di(propilenglicol) (DPMA), agua, dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona, etanol, N-metilpirrolidona (NMP), tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, acetonitrilo, N-metilacetamida, propanol, metanol, éter dimetílico de tri(etilenglicol), éter butílico de tri(propilenglicol), éter propílico de tri(propilenglicol), o mezclas de los mismos. En ciertas modalidades, pueden usarse disolventes que tienen un punto de ebullición más alto, ya que estos disolventes reducen la inflamabilidad y facilitan la fabricación. En ciertas modalidades, se pueden usar disolventes que tienen una toxicidad baja, por lo que puede usarse para desechar fácilmente después de su uso. Un ejemplo de tal disolvente es el dipropilenglicol monometil éter (DPM).
- 35 30 En ciertas modalidades, se puede añadir un porógeno a la mezcla de reactivos, en donde los porógenos se pueden describir ampliamente como aditivos generadores de poros. En ciertas modalidades, el porógeno se puede seleccionar del grupo que consiste en disolventes termodinámicamente pobres y polímeros extraíbles, por ejemplo, polí(etilenglicol), tensioactivos y sales.
- 40 35 En algunas modalidades, los componentes de la reacción de formación de gel reaccionan espontáneamente a temperatura ambiente para formar el gel. En otras modalidades, la reacción de formación de gel debe iniciarse. En ciertas modalidades, la reacción de formación de gel puede iniciarse mediante cualquier método conocido, por ejemplo, mediante activación térmica o radiación UV. En ciertas modalidades, la reacción puede iniciarse mediante radiación UV en presencia de un fotoiniciador. En ciertas modalidades, el fotoiniciador puede seleccionarse del grupo que consiste en 2-hidroxi-1-[4-(2(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), benzofenona, benzoína y ésteres de benzoína, tales como éter etílico de benzoína y éter metílico de benzoína, dialcoxiacetofenonas, hidroxialquilfenonas y ésteres sulfónicos de α-hidroximetilbenzoína. La activación térmica puede requerir la adición de un iniciador térmico. En ciertas modalidades, el iniciador térmico puede seleccionarse del grupo que consiste en 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (VAZO® catalizador 88), azobis(isobutironitrilo) (AIBN), persulfato de potasio, persulfato de amonio y peróxido de benzoílo.
- 45 40 En ciertas modalidades, la reacción de formación de gel puede iniciarse mediante radiación UV. En ciertas modalidades, se puede añadir un fotoiniciador a los reactivos de la reacción de formación de gel, y el miembro de soporte que contiene la mezcla de monómero, agente de reticulación y fotoiniciador se puede exponer a radiación UV en longitudes de onda de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 400 nm durante un período de unos pocos segundos a unas pocas horas. En ciertas modalidades, el miembro de soporte que contiene la mezcla de monómero, agente de reticulación y fotoiniciador puede exponerse a radiación UV a aproximadamente 350 nm durante un período de unos pocos segundos a unas pocas horas. En ciertas modalidades, el miembro de soporte que contiene la mezcla de monómero, agente de reticulación y fotoiniciador puede exponerse a radiación UV a aproximadamente 350 nm durante aproximadamente 10 minutos. En ciertas modalidades, puede usarse luz de longitud de onda visible para iniciar la polimerización. En ciertas modalidades, el miembro de soporte debe tener una baja absorbancia a la longitud de onda usada para que la energía pueda transmitirse a través del miembro de soporte.
- 50 45
- 55 50
- 60 55
- 65 60

En ciertas modalidades, la velocidad a la que se lleva a cabo la polimerización puede tener un efecto en el tamaño de los macroporos obtenidos en el gel macroporoso. En ciertas modalidades, cuando la concentración de reticulante en un gel aumenta a una concentración suficiente, los constituyentes del gel comienzan a agregarse para producir regiones de alta densidad de polímero y regiones con poco o ningún polímero, estas últimas regiones se denominan "macroporos" en la presente memoria descriptiva. Este mecanismo se ve afectado por la velocidad de polimerización. En ciertas modalidades, la polimerización puede llevarse a cabo lentamente, tal como cuando se usa una baja intensidad de luz en la fotopolimerización. En este caso, tarda más en tener lugar la agregación de los componentes del gel, lo que conduce a poros más grandes en el gel. En ciertas modalidades, la polimerización puede llevarse a cabo a una tasa alta, tal como cuando se usa una fuente de luz de alta intensidad. En este caso, puede haber menos tiempo disponible para la agregación y se producen poros más pequeños.

En ciertas modalidades, una vez que se preparan los materiales compuestos, estos pueden lavarse con varios solventes para eliminar cualquiera de los componentes sin reaccionar y cualquier polímero u oligómero que no esté anclado dentro del soporte. En ciertas modalidades, los disolventes adecuados para el lavado del material compuesto incluyen agua, acetona, metanol, etanol, propanol y DMF.

Usos ilustrativos de los materiales compuestos

La invención se refiere a un método en donde se hace pasar un fluido a través del gel reticulado de cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados. Al adaptar las condiciones de unión o fraccionamiento, puede obtenerse una buena selectividad.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para separar biomoléculas, tales como proteínas o inmunoglobulinas, de la solución. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de purificación de biomoléculas tales como proteínas o inmunoglobulinas. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para purificar proteínas o anticuerpos monoclonales con alta selectividad. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, en donde la molécula biológica o el ion biológico retiene su estructura terciaria o cuaternaria, que puede ser importante para retener la actividad biológica. En ciertas modalidades, las moléculas biológicas o los iones biológicos que pueden separarse o purificarse incluyen proteínas tales como albúminas, por ejemplo, albúmina de suero bovino y lisozima. En ciertas modalidades, las moléculas biológicas o los iones biológicos que pueden separarse incluyen γ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas tales como IgG, IgM o IgE de origen humano y animal, proteínas de origen recombinante y natural, incluida la proteína A, fitocromo, proteasa halófila, polí(3-hidroxibutirato) despolimerasa, aculaecina-A acilasa, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas como fosfatasa, deshidrogenasa, ribonucleasa A, etc., anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, tripsina y su inhibidor, albúminas de diversos orígenes, por ejemplo, α -lactoalbúmina, albúmina de suero humano, albúmina de huevo de gallina, ovoalbúmina, etc., citocromo C, inmunoglobulinas, mioglobulina, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN y ARN de origen sintético y natural, plásmidos de ADN, lectina, α -quimotripsinógeno y productos naturales, incluidas moléculas pequeñas. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para recuperar un fragmento de anticuerpo a partir de variantes, impurezas, o contaminantes asociados con este. En ciertas modalidades, la separación o purificación de biomoléculas puede ocurrir sustancialmente en el gel reticulado. En ciertas modalidades, la separación o purificación de biomoléculas puede ocurrir sustancialmente en los macroporos del gel reticulado macroporoso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de adsorción reversible de una sustancia. En ciertas modalidades, puede liberarse una sustancia adsorbida mediante el cambio del líquido que fluye a través del gel. En ciertas modalidades, la captación y liberación de sustancias puede controlarse mediante variaciones en la composición del gel reticulado.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, en donde la sustancia puede aplicarse al material compuesto a partir de una solución tamponada.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método en donde la sustancia se puede eluir mediante el uso de concentraciones variables de soluciones salinas acuosas.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método que exhibe altas capacidades de unión. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método que exhibe capacidades de unión de aproximadamente de 100 mg/ml de membrana, aproximadamente de 110 mg/ml de membrana, aproximadamente de 120 mg/ml de membrana, aproximadamente de 130 mg/ml de membrana, aproximadamente 140 mg/ml de membrana, aproximadamente de 150 mg/ml de membrana, aproximadamente 160 mg/ml de membrana, aproximadamente 170 mg/ml de membrana, aproximadamente de 180 mg/ml de membrana, aproximadamente de 190 mg/ml de membrana, aproximadamente 200 mg/ml de membrana, aproximadamente de 210 mg/ml de membrana, aproximadamente 220 mg/ml de membrana, aproximadamente 230 mg/ml de membrana, aproximadamente 240 mg/ml de membrana, aproximadamente 250 mg/ml de membrana, aproximadamente de 260 mg/ml de membrana, aproximadamente 270 mg/ml de membrana, aproximadamente 280 mg/ml de membrana, aproximadamente 290 mg/ml de membrana, aproximadamente de 300 mg/ml de membrana, aproximadamente de 310 mg/ml de membrana, aproximadamente de 320 mg/ml de membrana, aproximadamente de 330 mg/ml de membrana,

aproximadamente de 340 mg/ml de membrana, aproximadamente 350 mg/ml de membrana, aproximadamente de 360 mg/ml de membrana, aproximadamente de 370 mg/ml de membrana, aproximadamente de 380 mg/ml de membrana, aproximadamente 390 mg/ml de membrana, o aproximadamente de 400 mg/ml de membrana al 10 % de penetración.

- 5 En ciertas modalidades, los métodos de la invención dan como resultado capacidades de unión superiores a las notificadas con el uso de resinas MMC convencionales. En ciertas modalidades, los métodos de la invención se pueden ejecutar a tasa de flujo, de dos conexiones al flujo significativamente más altas, debido a la tasa de flujo, que la tasa de flujo de flujo logradas en los métodos con resinas MMC. En ciertas modalidades, los métodos de la presente invención no sufren las caídas de presión problemáticas asociadas con los métodos mediante el uso de resinas MMC.

10 En ciertas modalidades, la tasa de flujo durante la unión (la primera tasa de flujo) puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 ml/min. En ciertas modalidades, la tasa de flujo durante la elución (la segunda tasa de flujo) puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 ml/min. En ciertas modalidades, la primera tasa de flujo o la segunda tasa de flujo pueden ser de aproximadamente 0,1 ml/min, aproximadamente 0,5 ml/min, aproximadamente 1,0 ml/min, aproximadamente 1,5 ml/min, aproximadamente 2,0 ml/min, aproximadamente 2,5 ml/min, aproximadamente 3,0 ml/min, aproximadamente 4,0 ml/min, aproximadamente 4,5 ml/min, aproximadamente 5,0 ml/min, aproximadamente 5,5 ml/min, aproximadamente 6,0 ml/min, aproximadamente 6,5 ml/min, aproximadamente 7,0 ml/min, aproximadamente 7,5 ml/min, aproximadamente 8,0 ml/min, aproximadamente 8,5 ml/min, aproximadamente 9,0 ml/min, aproximadamente 9,5 ml/min o aproximadamente 10,0 ml/min. En ciertas modalidades, la primera tasa de flujo o la segunda tasa de flujo pueden ser de aproximadamente 0,5 ml/min a aproximadamente 5,0 ml/min.

15 El flujo de agua, Q_{H_2O} (kg/m²h), se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$25 \quad Q_{H_2O} = \frac{(m_1 - m_2)}{A \cdot t}$$

20 donde m_1 es la masa de agua transferida a través de la membrana en t_1 , m_2 es la masa de agua transferida a través de la membrana en t_2 , A es el área de la sección transversal de la membrana y t es el tiempo transcurrido (t_1-t_2), donde $T_1 > t_2$.

25 En ciertas modalidades, puede añadirse un aditivo a la solución de sal eluyente (el segundo fluido, o el tercer fluido o posterior). En ciertas modalidades, el aditivo se añade en una concentración baja (por ejemplo, menos de aproximadamente 1 M, aproximadamente 0,5 M o aproximadamente 0,2 M). En ciertas modalidades, el aditivo es un alcohol miscible en agua, un detergente, sulfóxido de dimetilo, formamida de dimetilo o una solución acuosa de una sal caotrópica. En ciertas modalidades, sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, el aditivo puede disminuir la tensión superficial del agua, debilitando así las interacciones hidrofóbicas para dar una disociación subsecuentemente del complejo ligando-soluto.

30 En ciertas modalidades, el medio de modo mixto combina características hidrofóbicas y de intercambio iónico, de modo que su selectividad puede manipularse para que la magnitud de retención de cada modo de retención pueda ajustarse cambiando la fuerza iónica de la fase móvil, el pH, o contenido de solvente orgánico. En ciertas modalidades, la selectividad se puede manipular de forma simultáneamente o individual.

35 En ciertas modalidades, cambiar el pH es una herramienta de elución efectiva para la elución de proteínas sin cambiar la conductividad de la fase móvil.

40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de purificación de biomoléculas en una sola etapa. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de separación de biomoléculas que es más fácil de escalar, requiere menos mano de obra, es más rápido y tiene costos de capital más bajos que las técnicas de cromatografía de columna empacada convencionales comúnmente usadas.

45 Determinación del tamaño de poro

50 SEM y ESEM

55 El diámetro promedio de los macroporos en el gel reticulado macroporoso se puede estimar mediante cualquiera de muchos métodos. Un método que puede emplearse es la microscopía electrónica de barrido (SEM). SEM es un método bien establecido para determinar el tamaño de los poros y las porosidades en general, y para caracterizar las membranas en particular. Se hace referencia al libro *Basic Principles of Membrane Technology* by Marcel Mulder (© 1996) ("Mulder"), especialmente el Capítulo IV. Mulder proporciona una descripción general de los métodos para caracterizar las membranas. Para las membranas porosas, el primer método mencionado es la microscopía electrónica. SEM es una técnica muy simple y útil para caracterizar membranas de microfiltración. Se puede obtener una imagen clara y concisa de la membrana en términos de la capa superior, la sección transversal y la capa parte inferior. Además, la porosidad y la distribución del tamaño de poro puede estimarse a partir de las fotografías.

SEM ambiental (ESEM) es una técnica que permite la obtención de imágenes no destructivas de especímenes que están húmedos, al permitir un ambiente gaseoso en la cámara del espécimen. El detector secundario ambiental (ESD) requiere un fondo de gas para que funcione y opera de aproximadamente 3 torr a aproximadamente 20 torr. Estas restricciones de presión limitan la capacidad de variar la humedad en la cámara de muestras. Por ejemplo, a 5 10 torr, la humedad relativa a una temperatura específica es la siguiente:

	Humedad relativa a 10 torr (%)	T (°C)
10	Aproximadamente 80	Aproximadamente 16
	Aproximadamente 70	Aproximadamente 18
	Aproximadamente 60	Aproximadamente 20
15	Aproximadamente 40	Aproximadamente 24
	Aproximadamente 20	Aproximadamente 40
	Aproximadamente 10	Aproximadamente 50
20	Aproximadamente 2	Aproximadamente 70
	Aproximadamente 1	Aproximadamente 100

Esta es una guía útil para la humedad relativa en la cámara de muestras a diferentes temperaturas. En ciertas modalidades, la humedad relativa en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de 25 aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 %. En ciertas modalidades, la humedad relativa en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, 30 aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 %. En ciertas modalidades, la humedad relativa en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de 35 aproximadamente el 45 %.

En ciertas modalidades, el microscopio tiene una resolución nanométrica y un aumento de hasta aproximadamente 100 000X.

En ciertas modalidades, la temperatura en la cámara de muestra durante la formación de imágenes es de 40 aproximadamente 4 °C a aproximadamente 95 °C. En ciertas modalidades, la temperatura en la cámara de muestra durante la formación de imágenes es de aproximadamente 4 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 12 °C, aproximadamente 14 °C, aproximadamente 16 °C, 45 aproximadamente 18 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C o aproximadamente 85 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 5 °C.

En ciertas modalidades, la presión en la cámara de muestra durante la formación de imágenes es de 50 aproximadamente 3 torr a aproximadamente 20 torr. En ciertas modalidades, la presión en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 4 torr, aproximadamente 6 torr, aproximadamente 8 torr, aproximadamente 10 torr, aproximadamente 12 torr, aproximadamente 14 torr, aproximadamente 16 torr, aproximadamente 18 torr o aproximadamente 20 torr. En ciertas modalidades, la presión en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 3 torr.

En ciertas modalidades, la distancia de trabajo desde la fuente del haz de electrones hasta la muestra es de 55 aproximadamente 6 mm a aproximadamente 15 mm. En ciertas modalidades, la distancia de trabajo desde la fuente del haz de electrones hasta la muestra es de aproximadamente 6 mm, aproximadamente 7 mm, aproximadamente 8 mm, aproximadamente 9 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 11 mm, aproximadamente 12 mm, 60 aproximadamente 13 mm, aproximadamente 14 mm o aproximadamente 15 mm. En ciertas modalidades, la distancia de trabajo desde la fuente del haz de electrones hasta la muestra es de aproximadamente 10 mm.

En ciertas modalidades, el voltaje es de aproximadamente 1 kV a aproximadamente 30 kV. En ciertas modalidades, el voltaje es de aproximadamente 2 kV, aproximadamente 4 kV, aproximadamente 6 kV, aproximadamente 8 kV, 65 aproximadamente 10 kV, aproximadamente 12 kV, aproximadamente 14 kV, aproximadamente 16 kV, aproximadamente 18 kV, aproximadamente 20 kV, aproximadamente 22 kV, aproximadamente 24 kV,

aproximadamente 26 kV, aproximadamente 28 kV o aproximadamente 30 kV. En ciertas modalidades, el voltaje es de aproximadamente 20 kV.

5 En ciertas modalidades, el diámetro promedio de poro puede medirse estimando los diámetros de poro en una muestra representativa de imágenes desde la parte superior o inferior de un material compuesto. Un experto en la técnica reconocerá y conocerá diversas variables experimentales asociadas con la obtención de una imagen ESEM de una membrana húmeda, y podrá diseñar un experimento en consecuencia.

10 Porometría de flujo capilar

10 La porometría de flujo capilar es una técnica analítica usada para medir el(s) tamaño(s) de poro de los materiales porosos. En esta técnica analítica, se usa un líquido humectante para llenar los poros de una muestra de prueba y se usa la presión de un gas que no reacciona para desplazar el líquido de los poros. La presión de gas y la tasa de flujo a través de la muestra se miden con precisión y los diámetros del poro se determinan mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$D = 4 \times \gamma \times \cos\theta / P$$

20 D = diámetro de poro

γ = tensión superficial del líquido

θ = ángulo de contacto del líquido

P = presión de gas diferencial

25 Esta ecuación muestra que la presión requerida para desplazar el líquido de la muestra húmeda se relaciona inversamente con el tamaño de poro. Dado que esta técnica involucra el flujo de un líquido desde los poros de la muestra de prueba bajo presión, es útil para la caracterización de poros pasantes (poros interconectados que permiten el flujo de fluido de un lado de la muestra al otro). Otros tipos de poros (poros cerrados y ciegos) no son detectables mediante este método.

30 La porometría de flujo capilar detecta la presencia de un poro cuando el gas comienza a fluir a través de ese poro. Esto ocurre solo cuando la presión del gas es lo suficientemente alta como para desplazar el líquido desde la parte más estrecha del poro. Por lo tanto, el diámetro de poro calculado mediante el uso de este método es el diámetro del poro en la parte más estrecha y cada poro se detecta como un poro individual de este diámetro estrecho. El diámetro de poro más grande (llamado punto de burbuja) está determinado por la presión de gas más baja necesaria para iniciar el flujo a través de una muestra húmeda y se calcula un diámetro medio de poro a partir de la presión media de flujo. Además, tanto el intervalo de diámetro de poro estrecho como la distribución del tamaño de poro pueden determinarse mediante el uso de esta técnica.

40 Este método se puede realizar en muestras de membranas pequeñas (-2,5 cm de diámetro) que se sumergen en un fluido de prueba (por ejemplo, agua, tampón, alcohol). El intervalo de presión de gas aplicado se puede seleccionar de 0 a 500 psi.

Otros métodos para determinar el diámetro de poro

45 Mulder describe otros métodos para caracterizar el tamaño promedio de los poros de una membrana porosa, incluida la microscopía de fuerza atómica (AFM) (página 164), cálculos de permeabilidad (página 169), adsorción-desorción de gas (página 173), termoporometría (página 176), permporometría (página 179) y desplazamiento de líquido (página 181). Las enseñanzas de Mulder y las referencias citadas en ellas forman parte del conocimiento general común en el campo.

50 Materiales compuestos ilustrativos

La invención refiere a un material compuesto, que comprende:

55 un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y
un gel reticulado, en donde el gel reticulado comprende un copolímero formado a partir de una reacción de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y acrilato de 2-carboxietilo.

60 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado es macroporoso.

65 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y 2-(metiltiito)etyl metacrilato. En ciertas modalidades, la

- invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y 2-metacrilato de (metiltio) etilo en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,2:aproximadamente 0,1:aproximadamente 0,06. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y 2-metacrilato de (metiltio) etilo en una relación molar aproximadamente de 1:aproximadamente 0,22:aproximadamente 0,14:aproximadamente de 0,06.
- 5 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de hidroxipropilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de hidroxipropilo en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,2:aproximadamente 0,2:aproximadamente 0,1. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de hidroxipropilo en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,25:aproximadamente 0,15:aproximadamente 0,14.
- 15 20

La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,3:aproximadamente 0,1. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de aproximadamente de 0,26:aproximadamente de 0,15. Las variantes de la descripción que no forman parte de la invención se refieren a un gel reticulado que comprende un polímero derivado de metacrilato de 2-(dietilamino)etilo, cloruro de (ar-vinilbencil)trimetilamonio, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de 2-aminoetilo. Las variantes de la descripción que no forman parte de la invención se refieren a un gel reticulado que comprende un polímero derivado de metacrilato de 2-(dietilamino)etilo, cloruro de (ar-vinilbencil)trimetilamonio, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de 2-aminoetilo en una relación molar aproximadamente de 1:aproximadamente de 0,4:aproximadamente de 0,5:aproximadamente de 0,1. Las variantes de la descripción que no forman parte de la invención se refieren a un gel reticulado que comprende un polímero derivado de metacrilato de 2-(dietilamino)etilo, cloruro de (ar-vinilbencil)trimetilamonio, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de 2-aminoetilo en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,36:aproximadamente 0,52:aproximadamente 0,1.

25 30 35 40

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en diacrilato de 1,3-diglicerolato de glicerol, dimetacrilato de glicerol, metacrilato de 3-(acriloxi)-2-hidroxipropilo, triacrilato de propoxilato de glicerol, ácido bisacrilamidoacético, 2,2-bis[4-(2-acriloxietoxi)fenil]propano, 2,2-bis(4-metacriloxifenil)propano, diacrilato y dimetacrilato de butanodiol, éter divinílico de 1,4-butanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,4-ciclohexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,10-dodecanodiol, 1,4-diacriloilpiperazina, dialifaltalato, diacrilato y dimetacrilato de 2,2-dimetilpropanodiol, pentaacrilato de dipentaeritritol, diacrilato y dimetacrilato de dipropilenglicol, N,N-dodecametilenbisacrilamida, divinilbenceno, trimetacrilato de glicerol, éter tris(acriloxipropílico) de glicerol, N,N'-hexametilenbisacrilamida, N,N'-octametilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de 1,5-pantanodiol, diacrilato de 1,3-fenileno, diacrilato y dimetacrilato de poli(etilenglicol), diacrilato y dimetacrilato de poli(propileno), diacrilato y dimetacrilato de trietilenglicol, éter divinílico de trietilenglicol, diacrilato o dimetacrilato de tripropilenglicol, carbonato de dialildiglicol, éter divinílico de poli(etilenglicol), N,N'-dimetacriloilpiperazina, divinilglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, N,N'-metilenbisacrilamida, trimetacrilato de 1,1,1-trimetiloletano, triacrilato de 1,1,1-trimetiloipropano, trimetacrilato de 1,1,1-trimetiloipropano (TRIM-M), acrilato de vinilo, diacrilato y dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,3-butilenglicol, diacrilato de ciclohexano dimetanol alcoxilado, diacrilato de hexanodiol alcoxilado, diacrilato de neopentilglicol alcoxilado, dimetacrilato aromático, diacrilato de neopentilglicol hidroxipivalato modificado con caprolactona, diacrilato y dimetacrilato de ciclohexano dimetanol, diacrilato y dimetacrilato de bisfenol etoxilado, diacrilato y dimetacrilato de neopentilglicol, triacrilato de trimetiloipropano etoxilado, triacrilato de trimetiloipropano propoxilado, triacrilato de glicerilo propoxilado, triacrilato de pentaeritritol, triacrilato de tris(2-hidroxi)isocianurato, tetraacrilato de ditrimetiloipropano, pentaacrilato de dipentaeritritol, tetraacrilato de pentaeritritol etoxilado, éster de pentaacrilato, tetraacrilato de pentaeritritol, hexaacrilato de dipentaeritritol modificado con caprolactona, N,N'-metilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de dietilenglicol, triacrilato de trimetiloipropano, diacrilato y dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de tetra(etilenglicol), diacrilato de 1,6-hexanodiol, divinilbenceno, dimetacrilato de 1,3-butanodiol, diacrilato de poli(etilenglicol), 1,3,5-triacriloilhexahidro-1,3,5-triazina, éter dialílico de trimetiloipropano, 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-

45 50 55 60 65

triazina, 1,3,5-trialil-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H,3H,5H)-triona, N,N'-hexametilenbis(metacrilamida) y gioxal bis(dialilacetal).

- 5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el agente de reticulación es diacrilato 1,3-diglicerolato de glicerol.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol o metacrilato de 3-(acrioloíxi)-2-hidroxipropilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol y metacrilato de 3-(acrioloíxi)-2-hidroxipropilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol y metacrilato de 3-(acrioloíxi)-2-hidroxipropilo en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,9.
- 15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es triacrilato de propoxilato de glicerol.
- 20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el agente de reticulación es triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano o trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano.
- 25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es N,N-metilenbisacrilamida.
- 30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es N,N'-hexametilenbis(metacrilamida).
- 35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es 1,3,5-triacrilohexahidro-1,3,5-triazina.
- 40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el agente de reticulación es 1,3,5-trialil-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H,3H, 5H)-triona.
- 45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es N,N'-hexametilenbis(metacrilamida).
- 50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende macroporos; el gel reticulado macroporoso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 30 % a aproximadamente 80 %; y los macroporos tienen un diámetro promedio de poro de alrededor de 10 nm a aproximadamente 3000 nm.
- 55 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende macroporos; el gel reticulado macroporoso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 %. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende macroporos; el gel reticulado macroporoso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 % o aproximadamente 70 %.
- 60 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 1500 nm.
- 65 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1000 nm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 200 nm,

aproximadamente 250 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 450 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 650 nm, o aproximadamente 700 nm.

5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el diámetro promedio de los poros de los macroporos es de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm.

10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es una membrana.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el miembro de soporte tiene un volumen vacío; y el volumen vacío del miembro de soporte es llenado con sustancialmente con el gel reticulado macroporoso.

15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende un polímero; el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 500 µm; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 25 µm; y el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 1000 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 500 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 30 µm a aproximadamente 300 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 30 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 100 µm, aproximadamente 150 µm, aproximadamente 200 µm, aproximadamente 250 µm o aproximadamente 300 µm.

25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 25 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 15 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 2 µm, aproximadamente 3 µm, aproximadamente 4 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 6 µm, aproximadamente 7 µm, aproximadamente 8 µm, aproximadamente 9 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 11 µm, aproximadamente 12 µm, aproximadamente 13 µm, aproximadamente 14 µm o aproximadamente 15 µm.

30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 %.

35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende una poliolefina.

40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en polisulfonas, polietersulfonas, polifenilenóxidos, policarbonatos, poliésteres, celulosa y derivados de celulosa.

45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos antes mencionados, en donde el miembro de soporte comprende una tela fibrosa tejida o no tejida que comprende un polímero; el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 2000 µm; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 25 µm; y el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

Métodos ilustrativos

- En un aspecto, la invención se refiere a un método que comprende la etapa de:
 poner en contacto a una primera tasa de flujo un primer fluido que comprende una sustancia con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para de esta manera adsorber o absorber una porción de la sustancia sobre el material compuesto.
- 5 En ciertas modalidades, el primer fluido comprende además un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina, o un virus.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de:
- 15 poner en contacto a una segunda tasa de flujo un segundo fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, para liberar de esta manera una primera porción de la sustancia del material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la ruta del flujo de fluido del segundo fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.
- 20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de:
 poner en contacto a una tercera tasa de flujo un tercer fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, lo que libera de esta manera una segunda porción de la sustancia del material compuesto.
- 25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sustancia es una molécula biológica o ion biológico.
- 30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o el ion biológico se selecciona del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células, γ-globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen humano y animal, origen animal, proteínas de origen recombinante y natural, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobina, mioglobulina, α-quimotripsinógeno, interleucina humana recombinante, recombinante proteína de fusión, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético y natural, y ARN de origen sintético y natural.
- 35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o el ion biológico es lisozima, hlgG, mioglobina, albúmina de suero humano, inhibidor de tripsina de soja, transferrina, enolasa, ovoalbúmina, ribonucleasa, inhibidor de tripsina de huevo, citocromo c, anexina V o α-quimotripsinógeno.
- 40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido es un tampón. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración del tampón en el primer fluido es de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,11 M, aproximadamente 0,12 M, aproximadamente 0,13 M, aproximadamente 0,14 M, aproximadamente 0,15 M, aproximadamente 0,16 M, aproximadamente 0,17 M, aproximadamente de 0,18 M, aproximadamente de 0,19 M o aproximadamente de 0,2 M. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que el pH del primer fluido es aproximadamente de 2, aproximadamente de 2,5, aproximadamente de 3, aproximadamente de 3,5, aproximadamente de 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8 o aproximadamente 9.
- 45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende acetato de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende citrato de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende fosfato de sodio.
- 50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende una sal. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en glicina: HCl, NaCl y NH₄Cl. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende cloruro de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende cloruro de sodio en una concentración
- 55 60 65

- de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende cloruro de sodio en una concentración aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 225 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 275 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 325 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 375 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 425 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 475 mM, aproximadamente 500 mM o aproximadamente 525 mM.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido es un sobrenadante de cultivo celular clarificado.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sustancia en el primer fluido es de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.
- 15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sustancia en el primer fluido es de aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente mg/ml, o aproximadamente de 10 mg/ml.
- 20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la primera tasa de flujo es de hasta aproximadamente 50 volúmenes de lecho/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que la primera tasa de flujo es de aproximadamente 5 volúmenes de lecho/min, aproximadamente 10 volúmenes de lecho/min, aproximadamente 20 volúmenes de lecho/min, aproximadamente 30 volúmenes de lecho/min, aproximadamente 40 volúmenes de lecho/min, o aproximadamente 50 volúmenes de lecho/min.
- 25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la primera tasa de flujo es de aproximadamente 0,5 ml/min a aproximadamente 2 ml/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la primera tasa de flujo es de aproximadamente 0,5 ml/min, aproximadamente 0,6 ml/min, aproximadamente 0,7 ml/min, aproximadamente 0,8 ml/min, aproximadamente 0,9 ml/min, aproximadamente 1 ml/min, aproximadamente 1,1 ml/min, aproximadamente 1,2 ml/min, aproximadamente 1,3 ml/min, aproximadamente 1,4 ml/min, aproximadamente 1,5 ml/min, aproximadamente 1,6 ml/min, aproximadamente 1,7 ml/min o aproximadamente 1,8 ml/min.
- 30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido es un tampón. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende 2-(N-ácido morfolino)etanosulfónico en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico en aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM o aproximadamente 150 mM.
- 35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del segundo fluido es de aproximadamente 4 a aproximadamente 8. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del segundo fluido es de aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6, aproximadamente de 6,2, o aproximadamente de 6,4.
- 40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende una sal. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en glicina: HCl, NaCl y NH₄Cl. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de sal en el segundo fluido es de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 200 mM. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de sal es de aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 115 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 135 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 145 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM o aproximadamente 200 mM.
- 45

- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tercero fluido es un tampón. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tercero fluido comprende 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol/HCl (TRIS/HCl). En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tercero fluido comprende 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol/HCl (TRIS/HCl) en una concentración de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tercero fluido comprende 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol/HCl (TRIS/HCl) en aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM o aproximadamente 40 mM.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del tercero fluido es de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del tercero fluido es de aproximadamente 7, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,8, aproximadamente 8, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente de 8,4, aproximadamente de 8,6, aproximadamente de 8,8 o aproximadamente de 9.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tercero fluido comprende una sal. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en glicina: HCl, NaCl y NH₄Cl. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de sal en el segundo fluido es de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 400 mM. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de sal es de aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 225 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 275 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 325 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 375 mM o aproximadamente 400 mM.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además las etapas de:
- limpiar el material compuesto; y
repitiendo las etapas mencionadas anteriormente.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde sustancialmente la totalidad de la sustancia se adsorbe o absorbe en el material compuesto.
- En un aspecto, la invención se refiere a un método que comprende la etapa de:
poner en contacto a una primera tasa de flujo un primer fluido que comprende una sustancia y un material no deseado con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para de esta manera adsorber o absorber una porción del material no deseado sobre el material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material no deseado comprende un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina, o un virus.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde sustancialmente la totalidad del material no deseado se adsorbe o absorbe en el material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sustancia es una molécula biológica o ion biológico.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o el ion biológico se selecciona del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células, γ-globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen humano y animal, origen animal, proteínas de origen recombinante y natural, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobina, mioglobulina, α-quimotripsinógeno, interleucina humana recombinante, recombinante proteína de fusión, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético y natural, y ARN de origen sintético y natural.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o el ion biológico es lisozima, hlgG, mioglobina, albúmina de suero humano, inhibidor de tripsina

de soja, transferrina, enolasa, ovoalbúmina, ribonucleasa, inhibidor de tripsina de huevo, citocromo c, anexina V o α -quimotripsinógeno.

- 5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido es un tampón. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración del tampón en el primer fluido es de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,11 M, aproximadamente 0,12 M, aproximadamente 0,13 M, aproximadamente 0,14 M, aproximadamente 0,15 M, aproximadamente 0,16 M, aproximadamente 0,17 M, aproximadamente 0,18 M, aproximadamente 0,19 M o aproximadamente 0,2 M.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende acetato de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende citrato de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende fosfato de sodio.
- 15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende una sal. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en glicina: HCl, NaCl y NH₄Cl. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende cloruro de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende cloruro de sodio en una concentración aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 225 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 275 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 325 mM, aproximadamente 350 mM, aproximadamente 375 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 425 mM, aproximadamente 450 mM, aproximadamente 475 mM, aproximadamente 500 mM o aproximadamente 525 mM.
- 20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la primera tasa de flujo es de aproximadamente 0,5 ml/min a aproximadamente 2 ml/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la primera tasa de flujo es de aproximadamente 0,5 ml/min, aproximadamente 0,6 ml/min, aproximadamente 0,7 ml/min, aproximadamente 0,8 ml/min, aproximadamente 0,9 ml/min, aproximadamente 1 ml/min, aproximadamente 1,1 ml/min, aproximadamente 1,2 ml/min, aproximadamente 1,3 ml/min, aproximadamente 1,4 ml/min, aproximadamente 1,5 ml/min, aproximadamente 1,6 ml/min, aproximadamente 1,7 ml/min o aproximadamente 1,8 ml/min.
- 25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido es un sobrenadante de cultivo celular clarificado.
- 30 En un aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar un material compuesto, que comprende las etapas de:
- 35 combinar ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y acrilato de 2-carboxietilo, un fotoiniciador, un agente de reticulación y un solvente, formando de esta manera una mezcla monomérica;
- 40 poner en contacto un miembro de soporte con la mezcla monomérica, formando de esta manera un miembro de soporte modificado; en donde el miembro de soporte comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte, y el diámetro promedio de poro de los poros es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 μ m;
- 45 recubrir el miembro de soporte modificado con una lámina polimérica, formando de esta manera un miembro de soporte recubierto; y
- 50 irradiar el miembro de soporte recubierto por un período de tiempo, formando de esta manera un material compuesto.
- 55 La mezcla monomérica comprende una pluralidad de diferentes monómeros. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla monomérica comprende además un cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo o noveno monómero.
- 60

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de lavar el material compuesto con un segundo solvente, formando de esta manera un material compuesto lavado. En ciertas modalidades, el segundo solvente es agua.

- 5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de poner en contacto el material compuesto o el material compuesto lavado con una solución salina.
- 10 En ciertas modalidades, la solución salina comprende sodio. En ciertas modalidades, la solución salina comprende hidróxido de sodio. En ciertas modalidades, la solución salina comprende hidróxido de sodio en una concentración de aproximadamente 0,05 N a aproximadamente 0,15 N. En ciertas modalidades, la solución salina comprende hidróxido de sodio a aproximadamente 0,06 N, aproximadamente 0,07 N, aproximadamente 0,08 N, aproximadamente 0,09 N, aproximadamente 0,1 N, aproximadamente 0,11 N, aproximadamente 0,12 N, aproximadamente 0,13 N o aproximadamente 0,14 N.
- 15 En ciertas modalidades, la solución salina comprende cloruro de sodio. En ciertas modalidades, la solución salina comprende cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 0,05 N a aproximadamente 0,5 N. En ciertas modalidades, la solución salina comprende cloruro de sodio en aproximadamente 0,06 N, aproximadamente 0,07 N, aproximadamente 0,08 N, aproximadamente 0,09 N, aproximadamente 0,1 N, aproximadamente 0,11 N, aproximadamente 0,12 N, aproximadamente 0,13 N, aproximadamente 0,14 N, aproximadamente 0,15 N, aproximadamente 0,18 N, aproximadamente 0,2 N, aproximadamente 0,22 N, aproximadamente 0,24 N, aproximadamente 0,26 N, aproximadamente 0,28 N, aproximadamente 0,3 N, aproximadamente 0,32 N, aproximadamente 0,34 N, aproximadamente 0,36 N, aproximadamente 0,38 N, aproximadamente 0,4 N, aproximadamente 0,42 N, aproximadamente 0,44 N, aproximadamente 0,46 N, aproximadamente 0,48 N o aproximadamente 0,5 N.

En ciertas modalidades, la solución salina comprende hidróxido de sodio y cloruro de sodio.

- 30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de eliminar cualquier exceso de mezcla monomérica del miembro de soporte recubierto.
- 35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende metacrilato de 2-(dietilamino)etilo, metacrilato de 2-aminoetilo, acrilato de 2-carboxietilo, metacrilato de 2-(metiltio)etilo, acrilamida, N-acriloxisuccinimida, acrilato o metacrilato de butilo, N,N-dietilacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, 2-(N,N-dimetilamino)ethylacrilato o metacrilato, N-[3-(N,N-dimetilamino)propil]metacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, n-acrilato de dodecilo, n-metacrilato de dodecilo, acrilato o metacrilato de etilo, 2-metacrilato de etilhexilo, metacrilato de hidroxipropilo, acrilato o metacrilato de glicidilo, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol, metacrilamida, anhídrido metacrílico, acrilato o metacrilato de propilo, N-isopropilacrilamida, estireno, 4-vinilpiridina, ácido vinilsulfónico, N-vinil-2-pirrolidinona (VP), ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido estrenosulfónico, ácido algínico, haluro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, haluro de dialildimetilamonio, haluro de 4-vinil-N-metilpiridinio, haluro de vinilbencil-N-trimetilamonio, haluro de metacriloxietiltrimetilamonio, 3-metacrilato de sulfopropilo, acrilato o metacrilato de 2-(2-metoxi)etilo, hidroxietilacrilamida, N-(3-metoxipropilacrilamida), N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida, N-fenilacrilamida, N-terc-butilacrilamida o diacetonaacrilamida.

La invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende más de un monómero. La invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende además un segundo monómero.

- 50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de 2-(metiltio)etilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de 2-(metiltio)etilo en una relación molar de aproximadamente 1: aproximadamente 0,2: aproximadamente 0,1: aproximadamente 0,06. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de 2-(metiltio)etilo en una relación molar de aproximadamente 1: aproximadamente 0,22: aproximadamente 0,14: aproximadamente 0,06.

- 65 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de hidroxipropilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de etilenglicol, fenil éter y metacrilato de

- hidroxipropilo en una relación molar de aproximadamente 1: aproximadamente 0,2: aproximadamente 0,2: aproximadamente 0,1. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y metacrilato de hidroxipropilo en una relación molar de 5 aproximadamente 1: aproximadamente 0,25: aproximadamente 0,15: aproximadamente 0,14.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los 10 métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de aproximadamente 1: aproximadamente 0,3: aproximadamente 0,1. En ciertas modalidades, la invención se refiere a 15 cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla de monómeros comprende acrilato de 2-carboxietilo, ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de aproximadamente 1: aproximadamente 0,26: aproximadamente 0,15.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde los monómeros están presentes en el solvente en aproximadamente un 6 % a aproximadamente un 38 % (p/p), colectivamente. 20
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde los monómeros están presentes en el solvente en una cantidad de aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, 25 aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, 30 aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37%, o aproximadamente 38 % (p/p), colectivamente.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el fotoiniciador está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente el 0,4 % (p/p) a 35 aproximadamente el 2,5 % (p/p) con relación a el peso total de monómero.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el fotoiniciador está presente en la mezcla monomérica en aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,8 %, 40 aproximadamente un 1,0 %, aproximadamente un 1,2 % o aproximadamente un 1,4 % (p/p) con relación a el peso total de monómero.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el fotoiniciador se selecciona del grupo que consiste en 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-uno,2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, benzofenona, benzoína y éteres de benzoína, dialcoxiacetofenonas, hidroxialquilfenonas y ésteres sulfónicos de α-hidroximetilbenzoína. 45
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,3-butanodiol, éter propílico de di(propilenglicol), N,N-dimetilacetamida, éter dimetílico de di(propilenglicol), 1,2-propanodiol, acetato de éter metílico de di(propilenglicol) (DPMA), agua, dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona, etanol, N-metilpirrolidona (NMP), tetrahidrofurano (THF), 50 acetato de etilo, acetonitrilo, N-metilacetamida, propanol, éter propílico de tri(propilenglicol) o metanol.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende N,N-dimetilacetamida, éter dimetílico de di(propilenglicol), 1,2-propanodiol y agua. 55
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende N,N-dimetilacetamida. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende N,N-dimetilacetamida en una cantidad de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 40 % en peso. En ciertas modalidades, la invención se refiere a 60 cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende N,N-dimetilacetamida en aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 % o aproximadamente 35 % en peso.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende éter dimetílico de di(propilenglicol). En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera 65

de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende éter dimetílico de di(propilenglicol) en una cantidad de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 90 % en peso. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende éter dimetílico de di(propilenglicol) en aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 42 %, aproximadamente un 44 %, aproximadamente un 46 %, aproximadamente un 48 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente 54 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 58 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 62 %, aproximadamente 64 %, aproximadamente 66 %, aproximadamente 68 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 72 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 78 % o aproximadamente 80 % en peso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,2-propanodiol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,2-propanodiol en una cantidad de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 75 % en peso. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,2-propanodiol en aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 % en peso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende agua. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende agua en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 9 % en peso. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende agua en aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 % o aproximadamente 9 % en peso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende acetato de éter metílico de di(propilenglicol). En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende acetato de éter metílico de di(propilenglicol) en una cantidad de aproximadamente el 24 % a aproximadamente el 72 % en peso. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende acetato de éter metílico de di(propilenglicol) en aproximadamente 30 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente un 54 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 58 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 62 %, aproximadamente 64 %, o aproximadamente 66 % en peso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,3-butanodiol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,3-butanodiol en una cantidad de aproximadamente el 35 % a aproximadamente el 95 % en peso. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el solvente comprende 1,3-butanodiol en aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 % o aproximadamente 90 % en peso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación está presente en el solvente en aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 25 % (p/p).

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación está presente en el solvente en una cantidad de aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 % o aproximadamente 25 % (p/p).

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en diacrilato de 1,3-diglicerolato de glicerol, dimetacrilato de glicerol, metacrilato de 3-(acrioloxy)-2-hidroxipropilo, triacrilato de propoxilato de glicerol, ácido bisacrilamidoacético, 2,2-bis[4-(2-acriloxietoxi)fenil]propano, 2,2-bis(4-metacriloxifenil)propano, diacrilato y dimetacrilato de butanodiol, éter divinílico de 1,4-butanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,4-ciclohexanodiol,

diacrilato y dimetacrilato de 1,10-dodecanodiol, 1,4-diacriloipiperazina, dialiftalato, diacrilato y dimetacrilato de 2,2-dimetilpropanodiol, pentaacrilato de dipentaeritritol, diacrilato y dimetacrilato de dipropilenglicol, N,N'-dodecametilenbisacrilamida, divinilbenceno, trimetacrilato de glicerol, éter tris(acriloxipropílico) de glicerol, N,N'-hexametilenbisacrilamida, N,N'-octametilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de 1,5-pantanodiol, diacrilato de 1,3-fenileno, diacrilato y dimetacrilato de polí(etilenglicol), diacrilato y dimetacrilato de poli(propileno), diacrilato y dimetacrilato de trietilenglicol, éter divinílico de trietilenglicol, diacrilato o dimetacrilato de tripropilenglicol, carbonato de dialildiglicol, éter divinílico de polí(etilenglicol), N,N'-dimetacriloiipiperazina, divinilglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, N,N'-metilenbisacrilamida, trimetacrilato de 1,1,1-trimetiloletano, triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano, trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano (TRIM-M), acrilato de vinilo, diacrilato y dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,3-butilenglicol, diacrilato de ciclohexano dimetanol alcoxilado, diacrilato de hexanodiol alcoxilado, diacrilato de neopentilglicol alcoxilado, dimetacrilato aromático, diacrilato de neopentilglicol hidroxipivalato modificado con caprolactona, diacrilato y dimetacrilato de ciclohexano dimetanol, diacrilato y dimetacrilato de bisfenol etoxilado, diacrilato y dimetacrilato de neopentilglicol, triacrilato de trimetilolpropano etoxilado, triacrilato de trimetilolpropano propoxilado, triacrilato de glicerilo propoxilado, triacrilato de pentaeritritol, triacrilato de tris(2-hidroxi)isocianurato, tetraacrilato de ditrimetilopropano, pentaacrilato de dipentaeritritol, tetraacrilato de pentaeritritol etoxilado, éster de pentaacrilato, tetraacrilato de pentaeritritol, hexaacrilato de dipentaeritritol modificado con caprolactona, N,N'-metilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de dietilenglicol, triacrilato de trimetilolpropano, diacrilato y dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de tetra(etilenglicol), diacrilato de 1,6-hexanodiol, divinilbenceno, diacrilato de polí(etilenglicol), 1,3,5-triacriloilhexahidro-1,3,5-triazina, éter dialílico de trimetilolpropano, 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina, 1,3,5-trialil-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H,3H,5H)-triona, N,N'-hexametilenbis(metacrilamida) y gioxal bis(dialilacetato).

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es diacrilato 1,3-diglicerolato de glicerol.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol o metacrilato de 3-(acriloxi)-2-hidroxipropilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol y metacrilato de 3-(acriloxi)-2-hidroxipropilo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol y metacrilato de 3-(acriloxi)-2-hidroxipropilo en una relación molar de aproximadamente 1:aproximadamente 0,9.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es triacrilato de propoxilato de glicerol.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano o trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es dimetacrilato de etilenglicol.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente de reticulación es N,N'-metilenbisacrilamida.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte recubierto se irradia a aproximadamente 350 nm.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el período de tiempo es de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente 1 hora.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende macroporos.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es menor que el diámetro promedio de poro de los poros.

60 EJEMPLIFICACIÓN

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención. Sin embargo, se entenderá que los detalles específicos dados en cada ejemplo se han seleccionado con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En general, los experimentos se realizaron en condiciones similares a menos que se señale lo contrario.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

- 5 Se preparó una solución al 20 % en peso disolviendo acrilato de 2-carboxietilo, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol, metacrilato de 2-(metiltio)etilo en una relación molar de 1:0,22:0,14:0,06, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 27,0 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 61,0 % en peso de éter dimetílico de di(propilenglicol), 7,15 % en peso de 1,2-propanodiol y 10 4,85 % en peso de agua. Se usó diacrilato de 1,3-diglicerolato de glicerol como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 8 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.
- 15 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el siguiente procedimiento general. Se colocó un miembro de soporte pesado sobre una lámina de polí(étileno) (PE) y se aplicó a la muestra una solución de monómero o 20 polímero. Subsecuentemente, la muestra se cubrió con otra lámina de PE y se pasó un rodillo de goma sobre el emparedado para eliminar el exceso de solución. La formación de gel in situ en la muestra se indujo por polimerización iniciada por radiación con una longitud de onda de 350 nm durante un período de 10 minutos. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y luego se colocó en una solución que contiene hidróxido de sodio 0,1 N y cloruro de sodio 0,1 N para transferir la membrana a Na⁺-forma. Posteriormente, la membrana se lavó con agua RO y se secó a temperatura ambiente.
- 25 Las membranas se caracterizaron en términos de flujo de soluto, hlgG y capacidad de unión a lisozima, hlgG y recuperación de lisozima.
- 30 Las mediciones del flujo de soluto a través de los materiales compuestos se llevaron a cabo después de que las muestras se humedecieran con agua RO. Como procedimiento estándar, se montó una muestra en forma de disco de 7,8 cm de diámetro sobre una rejilla sinterizada de 3-5 mm de grosor y se montó en una celda alimentada con nitrógeno comprimido a presión controlada. La celda fue rellenada con tampón de acetato de sodio 85 mM que 35 contiene NaCl 250 mM, pH 4,5 y se aplicó una presión de 100 kPa. La solución tampón que atravesó el material compuesto en un tiempo específico se recogió en un contenedor previamente pesado y se pesó. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ya presión atmosférica en la salida del permeado. Cada medición se repitió tres o más veces para lograr una reproducibilidad de ±5 %.
- 35 Los experimentos de adsorción de proteínas se llevaron a cabo mediante el siguiente procedimiento. En la etapa de adsorción, se instaló una muestra de material compuesto en forma de disco de membrana simple de 25 mm de diámetro en el soporte de membrana Natrix. Se usó el sistema Waters 600E HPLC para llevar a cabo los estudios cromatográficos de membrana. La célula y la muestra de membrana se cebaron pasando tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5 y conductividad 30 mS/cm (tampón A). Se registraron continuamente la absorbancia UV (a 280 nm) de la corriente efluente del soporte de la membrana Natrix y la presión del sistema. La proteína se disolvió en tampón A para preparar una solución de 0,5 mg/ml. El tampón A se denominó 40 tampón de unión. El tampón de elución, que contiene TRIS/HCl 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8,2, se denominó tampón B. Todos los tampones y las soluciones de proteína se filtraron a través de una membrana microporosa de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,2 µm (Nalgene).
- 45 En los experimentos cromatográficos, se pasó el tampón A a través de la membrana hasta que se estableció una línea base de absorbancia UV estable. El método desarrollado para el experimento de unión-elución incluyó las siguientes etapas: en la primera etapa, la membrana se preacondicionó con el tampón de unión A; en la segunda etapa, la proteína disuelta en un tampón A atravesó la membrana para alcanzar un 20-30 % de ruptura, en la tercera etapa, la membrana se lavó con tampón A y en una etapa final, la proteína se eluyó de la membrana mediante el uso de un tampón B que atravesó la membrana. Los experimentos cromatográficos se realizaron a una tasa de flujo de 1 ml/min.
- 50 55 La recuperación de proteína se calculó como la cantidad de sustancia desorbida comparada con la cantidad de sustancia aplicada a la membrana en la etapa de adsorción/unión.
- 60 65 El material compuesto producido por este método tenía un flujo de soluto de 2950 kg/m²h a una presión aplicada de 100 kPa. La capacidad de unión dinámica con un avance del 10 % fue de 220,1 mg/ml para hlgG y de 135,0 mg/ml para lisozima. La recuperación de hlgG y lisozima superó el 95 %.

La figura 1 muestra la curva de unión-elución de hlgG obtenida en el experimento descrito anteriormente.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

Se preparó una solución al 23 % en peso disolviendo acrilato de 2-carboxietilo, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol, metacrilato de hidroxipropilo en una relación molar de 1:0,25:0,15:0,14, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 26,3 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 59,6 % en peso de éter dimetílico de di(propilenglicol), 7,3 % en peso de 1,2-propanodiol y 6,8 % en peso de agua. Fueron usados dimetacrilato de glicerol (GDA) y metacrilato de 3-(acrioloxi)-2-hidroxipropilo (AHM) como agentes de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 10,6 % (mol/mol). Se añadieron los agentes reticulantes GDA y AHM en una relación molar de 1:0,9, respectivamente. El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y luego se colocó en una solución que contiene hidróxido de sodio 0,1 N y cloruro de sodio 0,1 N para transferir la membrana a Na⁺-forma. Posteriormente, la membrana se lavó con agua RO y se secó a temperatura ambiente.

La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto, capacidad de unión de hIgG y recuperación de hIgG como se describió en el Ejemplo 1.

El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 4150,00 kg/m²h y capacidad de unión de hIgG de 175,8 mg/ml con un avance del 10 %. La recuperación de hIgG superó el 95 %.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

Se preparó una solución al 20,6 % en peso disolviendo acrilato de 2-carboxietilo, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de 1:0,26:0,15, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 27,0 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 60,0 % en peso de éter dimetílico de di(propilenglicol), 6,5 % en peso de 1,2-propanodiol y 6,5 % en peso de agua. Se usó triacrilato de propoxilato de glicerol (1PO/OH) como agentes de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 7,7 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y luego se colocó en una solución que contiene 0. Hidróxido de sodio 1 N y cloruro de sodio 0,1 N para transferir la membrana a Na⁺-forma. Posteriormente, la membrana se lavó con agua RO y se secó a temperatura ambiente.

La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto, capacidad de unión de hIgG y recuperación de hIgG como se describió en el Ejemplo 1.

El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 2740,00 kg/m²h y capacidad de unión de hIgG de 144 mg/ml con un avance del 10 %. La recuperación de hIgG superó el 95 %.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de unión de hIgG de un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

Una de las características más importantes de los medios de modo mixto es la tolerancia a la sal. Debido a la funcionalidad dual de los medios de modo mixto, que contienen elementos hidrófobos e iónicos, el aumento de la fuerza iónica interrumpirá los enlaces iónicos, pero el aumento de la concentración de sal promoverá la adsorción hidrófoba, lo que conducirá a un rendimiento independiente de la sal.

Se usó una membrana de intercambio catiónico multimodal preparada como se describe en el Ejemplo 1 para examinar el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de unión de hIgG. Se usó como tampón de unión tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio en el intervalo de 0 a 400 mM, pH 4,5. Se disolvió hIgG en tampón de unión con varias fuerzas iónicas para preparar una solución de 0,5 mg/ml. Los experimentos de unión se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. La figura 2 ilustra la capacidad de unión dinámica de hIgG con un avance del 10 % en función del contenido de sal en un tampón de unión. La membrana de intercambio catiónico débil Natrix (Natrix C) y la membrana de intercambio catiónico fuerte Natrix (Natrix S) también se examinaron en el estudio de tolerancia a la sal (Figura 2). Como se puede ver en la figura 2, la incorporación de varias funcionalidades

en la membrana de modo mixto permite no solo mantener el rendimiento de tolerancia a la sal, como también se ve en el caso de la membrana de intercambio catiónico débil (Natrix C), sino también mejorar la capacidad de unión. La membrana multimodal de la presente invención puede ser usado con éxito en un intervalo operativo mucho mayor en términos de conductividad del material de partida que los intercambiadores de cationes tradicionales. En segundo lugar, la membrana de modo mixto se puede emplear para la carga directa de materias primas clarificadas, sin dilución previa para reducir la conductividad del material de partida.

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra el efecto del pH sobre la capacidad de unión de hIgG de un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

la unión dependiente del pH es una de las características de los medios de modo mixto. Este último permite usar el pH como una herramienta efectiva para la elución de proteínas sin ningún cambio en la conductividad de la fase móvil. Debido a que los adsorbentes de modo mixto operan mediante una combinación de interacciones hidrófobas y electrostáticas, el pH de la fase móvil es en gran parte responsable del cambio de un tipo de interacción a otro.

Se usó una membrana de intercambio catiónico multimodal preparada como se describe en el ejemplo 1 para examinar el efecto del pH sobre la capacidad de unión de hIgG. Se usó tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM como tampón de unión. El pH se varió de 4,0 a 6,0. Se disolvió hIgG en tampón de unión con varios pH para preparar una solución de 0,5 mg/ml. Los experimentos de unión se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. La figura 3 ilustra la capacidad de unión dinámica de hIgG con un avance del 10 % en función del pH.

A medida que aumenta el pH, disminuye la capacidad de unión, lo que es consistente con el mecanismo fundamental.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra el uso de una membrana de modo mixto en el modo de unión y elución para purificar anticuerpos monoclonales.

La eliminación mejorada de los agregados de anticuerpos de una preparación o proteína A, un anticuerpo monoclonal purificado se puede lograr con éxito mediante el uso de medios de modo mixto en el modo de unión y elución. El modo "Unir-eluir" es un enfoque operativo de la cromatografía en el que las condiciones del tampón se establecen de modo que tanto una proteína objetivo (por ejemplo, un anticuerpo no agregado) como los contaminantes no deseados (por ejemplo, un anticuerpo agregado) se unan al soporte de cromatografía de modo mixto. El fraccionamiento de la proteína intacta no agregada se logra subsecuentemente cambiando las condiciones de manera que el objetivo de interés se eluya del soporte mientras los contaminantes permanecen unidos. Estos contaminantes pueden eliminarse de manera óptima mediante un tampón de limpieza apropiado.

Se usó una membrana de intercambio catiónico multimodal preparada como se describe en el ejemplo 1 para examinar el rendimiento de la membrana en el modo de elución de unión para purificar los anticuerpos monoclonales. Se usó tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5 como tampón de unión A. Se disolvió el anticuerpo monoclonal purificado de proteína A (mAb) en tampón de unión A para preparar una solución de 0,5 mg/ml. La membrana se equilibró a una velocidad de tasa de flujo de 1 ml/min con el tampón A como se describe en el ejemplo 1. Se aplicó una solución de mAb a la membrana para alcanzar el 80 % del 10 % de capacidad de unión dinámica de penetración, se lavó con el tampón de equilibrio A y luego se eluyó en dos etapas. La primera etapa incluyó el uso de tampón MES 100 mM que contiene NaCl 135 mM, pH 5,7 como tampón de elución B, mientras que el tampón TRIS/HCl 25 mM que contiene NaCl 250 mM, pH 8,2 fue usado en una segunda etapa como tampón de elución C (Figura 4). Los eluyentes se analizaron en la columna SEC TSKgel G3000SW_{XL} (Tosoh Bioscience). Se usó como fase móvil tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene sulfato de sodio 100 mM, pH 6,7. Se aplicaron 800 µl de muestra en la columna a 0,80 ml/min.

La figura 4 presenta el rendimiento de la membrana de modo mixto en el modo de unión y elución. La elución en dos etapas permite separar los mAb no agregados de los agregados (Figura 5-7).

Como se puede ver en la Figura 6, la primera fracción de mAb eluidos con el tampón B contiene una cantidad significativamente menor de agregados en comparación con la solución de alimentación. Esta membrana de modo mixto redujo selectivamente la cantidad de agregados del 1,51 % al 0,11 % o en un 93 %. La segunda fracción de mAb eluidos con tampón C mostró una cantidad significativa de agregados (Figura 7).

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra el uso de multiciclos de membrana de modo mixto en el modo de unión-elución.

- Se usó una membrana de intercambio catiónico multimodal preparada como se describe en el Ejemplo 1 para examinar el rendimiento de la membrana en multiciclos. Los experimentos de unión-elución se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. La membrana se equilibró con tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 4,5, conductividad: 21,9 mS/cm. Se usó el mismo tampón como tampón de unión A. El anticuerpo monoclonal (mAb) purificado de proteína A se disolvió en tampón de unión para preparar una solución de 0,5 mg/ml. Se aplicó una solución de mAb a la membrana para lograr una capacidad de unión dinámica de avance del 20 %, se lavó con tampón de equilibrio A y luego se eluyó en dos etapas como se describe en el Ejemplo 6. La primera etapa incluyó el uso de tampón MES 100 mM que contiene NaCl 135 mM, pH 5,7 como tampón de elución B, mientras que el tampón TRIS/HCl 25 mM que contiene NaCl 250 mM fue usado en una segunda etapa como tampón de elución C. Se analizaron la solución de alimentación de mAb y los eluyentes en columna SEC TSKgel G3000SW_{XL}(Tosoh Bioscience). Se usó como fase móvil tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene sulfato de sodio 100 mM, pH 6,7. Se aplicaron 800 µl de muestra en la columna a 0,80 ml/min.
- Se controló la absorbancia UV del efluente a 280 nm para caracterizar la capacidad de unión de la membrana. A continuación, la membrana se limpió con NaCl 0,1 M/NaCl 0,1 M y se equilibró con tampón A para la segunda ejecución. La corrida se repitió como se describió anteriormente. A continuación, la membrana se limpió con NaCl 0,1 M/NaCl 0,1 M y se equilibró con tampón A para el tercer ciclo como se describe anteriormente. La corrida se repitió como se describió anteriormente. La figura 8 presenta el rendimiento de una membrana multimodal en múltiples ciclos.
- El análisis de la columna SEC mostró agregados del 1,5 % en la solución de alimentación de mAb.
- Como puede verse en la figura 8, la membrana multimodal Natrix mostró un rendimiento idéntico en tres corridas en términos de capacidad de unión dinámica y eliminación selectiva de agregados. La concentración de agregados en mAb después de la proteína A se redujo del 1,51 % al 0,11 % o en un 93 %.
- Ejemplo de referencia 8**
- Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.
- Un medio de intercambio aniónico fuerte multimodal tiene un gran potencial para usarse en la purificación posterior a la proteína A de anticuerpos monoclonales (mAb) a escala de proceso. El objetivo es eliminar contaminantes clave como el ADN, las proteínas de la célula huésped (HCP), la proteína A lixiviada, los agregados y los virus en una sola etapa.
- Se preparó una solución al 12,6% en peso disolviendo cloruro de (ar-vinilbencil)trimetilamonio como monómero y triacrilato de trimetilolpropano (TRIM-A) como reticulante en una mezcla de solvente que contiene 52,0 % en peso de 1,2-propanodiol y 48,0 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol). Se añadió el agente de reticulación TRIM-A para lograr una densidad de reticulación del 13 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.
- Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1).
- La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y se secó a temperatura ambiente.
- La membrana así obtenida se caracterizó en términos de agua, flujo de soluto (tampón de fosfato de sodio 100 mM, que contiene cloruro de sodio 150 mM, pH 7,0) y capacidad de unión a proteína A como se describe en el Ejemplo 1.
- La proteína A se disolvió en tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene cloruro de sodio 150 mM, pH 7,0
- El material compuesto producido por este método mostró un flujo de agua de 1850,00 kg/m²h a 100 kPa, flujo de soluto de 2270,00 kg/m²h y capacidad de unión a proteína A de 85,8 mg/ml con un avance del 10 %.
- Ejemplo de referencia 9**
- Este ejemplo ilustra el uso de membrana de modo mixto en modo de flujo continuo para purificar anticuerpos monoclonales.
- Eliminación de agregados de anticuerpos de una preparación o proteína se puede lograr con éxito un anticuerpo monoclonal purificado mediante el uso de medios de modo mixto en un modo de flujo continuo. El último se refiere a un enfoque operativo de la cromatografía en el que las condiciones del tampón se establecen de modo que la proteína no agregada intacta que se va a purificar fluya a través del soporte de cromatografía de modo mixto tras la aplicación, mientras que los agregados y otras moléculas grandes (incluidos los virus) se retienen selectivamente logrando así su eliminación.

Se usó una membrana de intercambio de aniones multimodal preparada como se describe en el Ejemplo 8 para examinar el rendimiento de la membrana en modo de flujo continuo para purificar anticuerpos monoclonales. La membrana se equilibró a una tasa de flujo de 1 ml/min con tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM (tampón A) como se describe en el Ejemplo 1. El anticuerpo monoclonal (mAb) purificado de proteína A se disolvió en tampón A y se aplicaron 300 mg de mAb/ml a la membrana a una velocidad de tasa de flujo de 1 mg/ml. La fracción de flujo continuo y alimentación de mAb se analizó en la columna SEC TSKgel G3000SW_{xl}(Tosoh Bioscience). Se usó como fase móvil tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene sulfato de sodio 100 mM, pH 6,7. Se aplicaron 800 µl de muestra en la columna a 0,80 ml/min. El nivel agregado se redujo de 1,51 % a 0,32 %.

10 Ejemplo de referencia 10

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal. Se preparó una solución al 25 % en peso disolviendo metacrilato de 2-(diethylamino)etilo, cloruro de (ar-vinilbencil)trimetilamonio, éter fenílico de etilenglicol metacrilato y metacrilato de 2-aminoetilo en una relación molar de 1:0,36:0,52:0,1, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 72,5 % en peso de 1,3-butanodiol y 27,5 % en peso de N,N'-dimetilacetamida. Se usó dimetacrilato de etilenglicol como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 12,2 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

20 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y se secó a temperatura ambiente.

25 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de agua, flujo de soluto (tampón de fosfato de sodio 100 mM, que contiene cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0) como se describe en el Ejemplo 1 y eliminación de agregados de anticuerpos monoclonales en modo de flujo continuo como se describe en el Ejemplo 9. El anticuerpo monoclonal (mAb) purificado de proteína A se disolvió en tampón A y se aplicaron 400 mg/ml a la membrana a una tasa de flujo de 1 mg/ml. La fracción de flujo continuo y alimentación de mAb se analizó en la columna SEC TSKgel G3000SW_{xl}(Tosoh Bioscience). Se usó como fase móvil tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene sulfato de sodio 100 mM, pH 6,7. Se aplicaron 800 µl de muestra en la columna a 0,80 ml/min.

35 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de agua de 3750,00 kg/m²h y flujo de soluto de 4050,00 kg/m²h. El nivel agregado se redujo de 1,51 % a 0,47 %.

Ejemplo 11

40 Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

Se preparó una solución al 19,3 % en peso disolviendo acrilato de 2-carboxietilo, 2-ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de 2-(metiltio)etilo, clorhidrato de metacrilato de 2-aminoetilo y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de 1:0,34:0,05:0,05:0,22, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 26,7% en peso de N,N'-dimetilacetamida, 61,5 % en peso de éter dimetílico de di(propilenglicol), 7,1 % en peso de 1,2-propanodiol y 4,7 % en peso agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida como agentes de reticulación para conseguir una densidad de reticulación del 5,4 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

50 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y luego se colocó en una solución que contiene hidróxido de sodio 0,1 N y cloruro de sodio 0,1 N para transferir la membrana a Na⁺-forma. Posteriormente, la membrana se lavó con agua RO y se secó a temperatura ambiente.

55 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (tampón de acetato de sodio 85 mM/NaCl 250 mM, pH 4,5), capacidad de unión de hIgG y recuperación de hIgG como se describe en el Ejemplo 1.

60 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 2744,00 kg/m²h y capacidad de unión de hIgG de 181 mg/ml con un avance del 10 %. La recuperación de hIgG superó el 95 %.

Ejemplo 12

65 Este ejemplo ilustra la selectividad de un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

La selectividad es el factor más importante en una separación. Los medios de modo mixto combinan características hidrófobas y de intercambio iónico para que su selectividad se pueda manipular a fin de ajustar la magnitud de retención de cada modo de retención cambiando la fuerza iónica de la fase móvil, el pH y el contenido de solvente orgánico, ya sea individualmente o simultáneamente.

- 5 La membrana de modo mixto preparada en el Ejemplo 11 fue usada en el estudio de selectividad. La membrana se probó mediante el uso de una sola capa insertada en un soporte de disco de acero inoxidable conectado a un equipo típico de HPLC. El estudio cromatográfico de separación selectiva de lisozima y citocromo C se llevó a cabo mediante el uso del tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,5 como fase móvil (Tampón A). Se realizó una elución en gradiente lineal desde el tampón A al tampón B, mediante el uso de tampón de fosfato de sodio 20 mM que contiene cloruro de sodio 1,0 M como tampón de elución B. Se usó el sistema Waters 600E HPLC para llevar a cabo el estudio cromatográfico de membrana. Se usó un asa de 100 µl para inyectar una muestra de 50 µl de mezcla de proteínas (5 mg/ml de lisozima y 3 mg/ml de citocromo C). Se registraron continuamente la absorbancia UV (a 280 nm) de la corriente efluente del soporte de la membrana y la presión del sistema. La tasa de flujo fue de 2 ml/min. Todos los estudios cromatográficos se realizaron a 25 °C. La figura 10 muestra la separación selectiva de proteínas en la membrana de modo mixto de la presente invención.

Ejemplo 13

- 20 Este ejemplo ilustra la estabilidad cáustica de un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.
- 25 El hidróxido de sodio es ampliamente aceptado para limpiar, desinfectar y almacenar medios y sistemas de cromatografía. Los beneficios de su uso incluyen eficacia, bajo costo, facilidad de detección, desecharable y eliminación
- 30 Se ha demostrado que el hidróxido de sodio es efectivo para retirar proteínas y ácidos nucleicos. También es efectivo para inactivar la mayoría de los virus, bacterias, levaduras y endotoxinas
- 35 Para mantener la selectividad y la capacidad de unión, los medios y sistemas de cromatografía deben limpiarse y típicamente se limpian en condiciones alcalinas, por ejemplo, con hidróxido de sodio. Por ejemplo, un proceso estándar que se usa para limpiar y restaurar los medios es un protocolo alcalino de limpieza en el lugar (CIP), que típicamente implica el tratamiento de las membranas con NaOH 0,5 M. Por lo tanto, las membranas desarrolladas para aplicaciones de cromatografía DEBEN ser capaces de resistir la limpieza alcalina convencional durante un período de tiempo prolongado.

- 40 Se usó una membrana de intercambio de cationes multimodal preparada como se describe en el Ejemplo 11 para examinar el efecto de la exposición de la membrana a hidróxido de sodio 0,5 M sobre su rendimiento. La membrana se colocó en hidróxido de sodio 0,5 M que contiene NaCl 0,1 M durante un período de tiempo que oscilaba entre 30 minutos y 24 h. A continuación, la membrana se lavó con agua RO y se equilibró con tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5. Luego, se midieron el flujo de soluto y la capacidad de unión de hlgG como se describe en el Ejemplo 1. La figura 11 ilustra el efecto de la exposición de la membrana a hidróxido de sodio 0,5 M que contiene cloruro de sodio 0,1 M sobre su flujo de soluto y capacidad de unión de hlgG.
- 45 Como puede verse en la Figura 11, la membrana mostró una gran estabilidad cáustica. No se observaron cambios significativos en el rendimiento de la membrana después de la exposición a NaOH 0,5 M/NaCl 0,1 M durante un máximo de 24 horas.

Ejemplo 14

- 50 Este ejemplo ilustra el uso de una membrana de modo mixto en el modo de unión y elución para purificar anticuerpos monoclonales.
- 55 Se usó una membrana de intercambio catiónico multimodal preparada como se describe en el Ejemplo 11 para ilustrar el uso de una membrana de modo mixto en el modo de unión-elución para purificar anticuerpos monoclonales.
- 60 Los experimentos de cromatografía de membrana se llevaron a cabo mediante el uso de un sistema de cromatografía líquida AKTA™ Purifier (GE Life Sciences). La absorbancia UV, el pH y la conductividad de la corriente efluente del soporte de la membrana y la presión del sistema se monitorearon continuamente. La solución de alimentación se preparó añadiendo 1 mg/ml de anticuerpos monoclonales (mAb) purificados de proteína A con 5,2 µg/ml de proteína de la célula huésped (HCP) y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque disuelto en tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5 (tampón A). La alimentación se cargó mediante el uso de una bomba de muestra. Antes de inyectar la solución de alimentación en el soporte de la membrana, se pasó el tampón A a través de la membrana hasta que se obtuvieron lecturas estables. Se eluyeron mAb diana en dos etapas. En una primera etapa fue usado el tampón de fosfato de sodio 30 mM que contiene

cloruro de sodio 15 mM, pH 6,5 como tampón de elución (tampón B) y en la segunda etapa se usó tampón TRIS/HCl 25 mM que contiene cloruro de sodio 1,0 M como tampón de elución (tampón C). El eluyente de la primera etapa de elución (tampón B) se recogió en 8 fracciones (A1-A8). Los niveles de HCP y las concentraciones de ADN se midieron en fracciones combinadas (A1-A5) y (A6-A8) y en la fracción de alimentación.

- 5 Los niveles de HCP se determinaron con un kit ELISA HCP de ovario de hámster chino (CHO) ampliamente reactivo (Cygnus Technologies F550). La calibración se realizó con el HCP usado en los experimentos cromatográficos. Los calibradores y las muestras se diluyeron con Sample Diluent (Cygnus 1028). Las mediciones se realizaron en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan Ascent®.
- 10 Las concentraciones de ADN se midieron con un ensayo de ADN (Kit de ensayo de ADNbc de Life Technologies Quant-iT™ PicoGreen® P11496). El estándar de ADN λ y las muestras se diluyeron con tampón de acetato de sodio 85 mM que contiene cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5. Las mediciones se realizaron en un lector de placas Thermo Scientific Fluoroskan Ascent®.
- 15 Las muestras de la solución de alimentación y la fracción de flujo continuo también se analizaron mediante el uso de espectrofotometría de absorción. Se tomaron medidas de absorción a longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros (nm). UN₂₆₀/A₂₈₀ las relaciones de absorción se calcularon a partir de las mediciones. Una A₂₆₀/A₂₈₀ de mayor que igual a 1,8 se interpretó para indicar que la muestra analizada allí estaba relativamente libre de proteína.
- 20 20 las fracciones A6-A8 de alimentación y elución de mAb también se analizaron en la columna SEC TSKgel G3000SW_{x1}(Tosoh Bioscience) (Figura 13). Se usó como fase móvil tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene sulfato de sodio 100 mM, pH 6,7. Se aplicaron 800 µl de muestra en la columna a 0,75 ml/min.
- 25 En la Figura 14 se presenta un resumen de los datos de eliminación de HCP/DNA.

Como puede verse en la Figura 13 y la Figura 14, la membrana de modo mixto descrita en el Ejemplo 11 mostró un rendimiento superior en términos de eliminación de HCP/ADN, así como también la eliminación de agregados. La membrana puede usarse en una etapa de captura en procesos de anticuerpos.

- 30 Ejemplo de referencia 15
- Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.
- 35 Se preparó una solución al 13,7 % en peso disolviendo cloruro de (ar-vinilbencil)trimetilamonio, clorhidrato de metacrilato de 2-aminoetilo y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de 1:0,46:0,085, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 52,7 % en peso de 1,2-propanodiol, 41,9 % en peso de éter propílico de tri(propilenglicol) y 5,4 % en peso de agua. Se usó trimetacrilato de trimetilolpropano como agentes de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 9,4 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

- 40 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y se secó a temperatura ambiente.

- 45 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de agua, flujo de soluto (tampón de fosfato de sodio 100 mM, que contiene cloruro de sodio 150 mM, pH 7,0), proteína A y capacidades de unión a ADN de esperma de arenque como se describe en el Ejemplo 1. La proteína A se disolvió en tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene cloruro de sodio 150 mM, pH 7,0 y ADN de esperma de arenque en tampón de fosfato de sodio 20 mM que contiene cloruro de sodio 150 mM, pH 6,5.

- 50 55 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de agua de 3735,00 kg/m²hr a 100 kPa, flujo de soluto de 4330,00 kg/m²hr y capacidad de unión a proteína A de 125,5 mg/ml y capacidad de unión a ADN de esperma de arenque de 20 mg/ml con un avance del 10 %.

- Ejemplo de referencia 16
- 60 65 Este ejemplo ilustra el uso de membrana de modo mixto en modo de flujo continuo para purificar hlgG.

- Se usó una membrana de intercambio de aniones multimodal preparada como se describe en el ejemplo de referencia 15 para examinar el rendimiento de la membrana en el modo de flujo continuo para purificar hlgG de los agregados. La membrana se equilibró a una tasa de flujo de 1 ml/min con tampón de fosfato de sodio 20 mM que contiene cloruro de sodio 150 mM (tampón A) como se describe en el Ejemplo 1. Se disolvió hlgG en el tampón A y se aplicaron 300 mg de hlgG/ml a la membrana a una tasa de flujo de 1 mg/ml. Los agregados se eluyeron con

tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 4,2 (Figura 12). La alimentación de hlgG y la fracción de flujo continuo se analizaron en la columna SEC TSKgel G3000SW_{x1}(Tosoh Bioscience). Se usó como fase móvil tampón de fosfato de sodio 100 mM que contiene sulfato de sodio 100 mM, pH 6,7. Se aplicaron 800 µl de muestra en la columna a 0,80 ml/min. El nivel agregado se redujo del 15,1 % al 8,3 %.

- 5 Ejemplo de referencia 17
- Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio catiónico fuerte de la presente invención con funcionalidad multimodal.
- 10 Se preparó una solución al 13,2 % en peso disolviendo la sal sódica del ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, N-isopropilacrilamida y N-fenilacrilamida en una relación molar de 1:0,18:0,1, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 17,8 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 54,1 % en peso de éter dimetílico de di(propilenglicol), 17,2 % en peso de 1,2-propanodiol y 10,9% en peso de agua. N,N'-Se usó hexametilenbis(metacrilamida) como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 12 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.
- 15 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y se secó a temperatura ambiente.
- 20 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO y se secó a temperatura ambiente.
- 25 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (tampón de acetato de sodio 85 mM/NaCl 250 mM, pH 4,5), capacidad de unión de hlgG (hlgG se disolvió en tampón de acetato de sodio 85 mM/NaCl, pH 4,5 y conductividad de 15 mS/cm) y recuperación de hlgG como se describe en el Ejemplo 1.
- 30 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 1564,00 kg/m²hr y capacidad de unión de hlgG de 91,5 mg/ml con un avance del 10 %. La recuperación de hlgG superó el 95 %.
- 35 Ejemplo de referencia 18
- Este ejemplo ilustra la selectividad de un material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.
- 40 La membrana de modo mixto preparada en el Ejemplo de referencia 17 fue usado en el estudio de selectividad. La membrana se probó mediante el uso de una sola capa insertada en un soporte de disco de acero inoxidable conectado a un equipo de HPLC típico. El estudio cromatográfico de separación selectiva de mioglobina, ribonucleasa A y lisozima se realizó mediante el uso de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,5 como fase móvil (Tampón A). Se realizó una elución en gradiente lineal desde el tampón A al tampón B, mediante el uso de tampón de fosfato de sodio 20 mM que contiene cloruro de sodio 1,0 M como tampón de elución B. Se usó el sistema Waters 600E HPLC para llevar a cabo el estudio cromatográfico de membrana. Se usó un asa de 100 µl para inyectar una muestra de 50 µl de mezcla de proteínas (5,4 mg/ml de ribonucleasa A, 3,3 mg/ml de mioglobina y 7 mg/ml de lisozima en una relación de volumen de 1:0,25:0,15). Se registraron continuamente la absorbancia UV (a 280 nm) de la corriente efluente del soporte de la membrana y la presión del sistema. La tasa de flujo fue de 3 ml/min. Todos los estudios cromatográficos se realizaron a 25 °C. La figura 15 muestra la separación selectiva de proteínas en la membrana de modo mixto de la presente invención.
- 45 Ejemplo de referencia 19
- 50 Este ejemplo ilustra el efecto de la naturaleza del comonómero usado sobre el rendimiento de un material de intercambio catiónico fuerte de la presente invención con funcionalidad multimodal.
- 55 Se prepararon una serie de membranas multimodales de intercambio de cationes fuertes como se describe en el Ejemplo 17 mediante el uso de varios comonómeros. Por lo tanto, se preparó una solución al 13,2 % en peso disolviendo la sal sódica del ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, N-isopropilacrilamida (NIPAM) (o N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida (THMAAm) o N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida (THMAAm) o N-(3-metoxipropil)acrilamida (MPAAm) o N,N'-dimetilacrilamida (DMAAm)) y N-fenilacrilamida en una relación molar de 1:0,18:0,1, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 17,8 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 54,1 % en peso de éter dimetílico de di(propilenglicol), 17,2 % en peso de 1,2-propanodiol y 10,9 % en peso de agua. N,N'-Se usó hexametilenbis(metacrilamida) como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 12 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.
- 60 Se prepararon materiales compuestos a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente
- 65 Se prepararon materiales compuestos a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente

(Ejemplo 1). Las muestras se irradiaron durante 10 min a 350 nm. Los materiales compuestos resultantes se lavaron a fondo con RO y se secaron a temperatura ambiente.

5 Las membranas así obtenidas se caracterizaron en términos de flujo (tampón de acetato de sodio 85 mM/NaCl 250 mM, pH 4,5 y TRIS/HCl 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8,21), capacidad de unión de hlgG y recuperación de hlgG como se describe en el Ejemplo 1.

Las Figuras 16 y 17 ilustran el efecto del comonómero natural usado en el rendimiento de la membrana.

10 La recuperación de hlgG superó el 95 % para todas las membranas examinadas.

Mediante el uso de N-isopropilacrilamida como comonómero en la formulación de modo mixto de intercambio catiónico fuerte dio como resultado una membrana con buenas características de permeabilidad y capacidad de unión.

15 Ejemplo de referencia 20

Este ejemplo ilustra el efecto de la naturaleza del agente de reticulación usado en el rendimiento de un material de intercambio catiónico fuerte de la presente invención con funcionalidad multimodal.

20 Se prepararon una serie de membranas multimodales de intercambio de cationes fuertes mediante el uso de varios agentes de reticulación. Por lo tanto, se preparó una solución al 14,5 % en peso disolviendo sal sódica del ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, N-isopropilacrilamida y metacrilato de éter fenílico de etilenglicol en una relación molar de 1:0,1:0,15, respectivamente, en una mezcla de solventes que contiene 23,7 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 55,5 % en peso de éter metílico de tri(propilenglicol), 8,7 % en peso de 1,2-propanodiol y 12,1 % en peso de agua. N,N'-metilenbisacrilamida (BIS) (o N,N'-hexametilenbis(metacrilamida) (Hexa-BIS) o 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina (T-XL-1) o 1,3,5-trialil-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H,3H,5H)-triona (T-XL-2) o 1,3,5-triacriloilhexahidro-1,3,5-triazina (T-XL-3) o gioxal bis(dialilacetal) (GBDA o GBDE)) es usado como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 10 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

30 Se prepararon materiales compuestos a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las muestras se irradiaron durante 10 min a 350 nm. Los materiales compuestos resultantes se lavaron a fondo con RO y se secaron a temperatura ambiente.

35 Las membranas así obtenidas se caracterizaron en términos de flujo (tampón de acetato de sodio 85 mM/NaCl 250 mM, pH 4,5 y TRIS/HCl 25 mM, NaCl 250 mM, pH 8,2), capacidad de unión de hlgG y recuperación de hlgG como se describió en el Ejemplo 1.

40 Las Figuras 18 y 19 ilustran el efecto de la naturaleza del reticulante usado sobre el rendimiento de la membrana.

La recuperación de hlgG superó el 95 % para todas las membranas examinadas.

45 Como puede verse a partir de los datos presentados anteriormente, en la Figura 18 y la Figura 19, la naturaleza del agente de reticulación usado juega un papel importante en el control del tamaño de los poros de la membrana, la fracción de volumen de los poros y las interconexiones. Empleando el reticulante trifuncional 1,3,5-triacriloilhexahidro-1,3,5-triazina, se obtuvo una membrana con buenas características de permeabilidad.

50 Ejemplo de referencia 21

Este ejemplo ilustra una morfología de gel del material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal preparado de acuerdo con el Ejemplo 8.

55 La morfología del gel de la membrana de modo mixto preparada de acuerdo con el Ejemplo 8 se examinó con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM, Philips Electroscan, modelo E-2020, Electroscan Corp., EE.UU.). Se empapó una pequeña muestra de la membrana (3 mm x 3 mm) en agua desionizada, se eliminó el agua superficial con papel de filtro húmedo y se colocó la membrana húmeda en la cámara de muestras. Es usada una tensión de aceleración de 20 kV junto con un tamaño de punto grande y aumentos inferiores a 1500x, para limitar los efectos de calentamiento y el daño de la muestra. Se empleó una distancia de trabajo de 9-13 mm para minimizar la dispersión del haz. En la cámara de muestra, la presión se mantuvo entre 1 y 4 Torr y la temperatura se mantuvo a $3 \pm 0,5$ °C mediante el uso de una etapa de muestra enfriada por Peltier. La cámara de muestra se enjuagó periódicamente con vapor de agua para mantener una presión parcial de agua satisfactoria, asegurando una hidratación constante de la membrana y evitando cualquier secado de la muestra que potencialmente puede conducir a algunos cambios en la morfología del gel de la membrana. La micrografía ESEM mostró una estructura macroporosa en desarrollo de la membrana de modo mixto de intercambio aniónico (Figura 20).

Ejemplo 22

Este ejemplo ilustra una morfología de gel del material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal preparado de acuerdo con el Ejemplo 11.

La morfología del gel de la membrana de modo mixto preparada de acuerdo con el Ejemplo 11 se examinó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido ambiental como se describe en el Ejemplo 21 (Figura 21).

Como puede verse en la figura 21, una membrana de modo mixto de intercambio catiónico preparada de acuerdo con el Ejemplo 11 tiene una estructura macroporosa.

Ejemplo de referencia 23

Este ejemplo ilustra una morfología de gel del material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal preparado de acuerdo con el Ejemplo de referencia 17.

La morfología del gel de la membrana de modo mixto preparada de acuerdo con el ejemplo de referencia 17 se examinó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido ambiental como se describe en el Ejemplo 21 (figura 22).

Como se puede ver en la Figura 22, la micrografía ESEM demuestra una estructura macroporosa de un modo mixto de intercambio catiónico preparado de acuerdo con el Ejemplo de referencia 17.

Ejemplo de referencia 24

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

Se preparó una solución al 15,5 % en peso disolviendo cloruro de (3-acrilamidopropil) trimetilamonio (solución al 75 % en peso en agua) y N-(3-N,N-dimetilaminopropil)metacrilamida en una relación molar de 1:1,17, respectivamente, en una mezcla de solventes que contiene 44,04 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 43,71 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol) y 12,25 % en peso de agua. Es usado N,N'-metilenbisacrilamida como agente de reticulación para conseguir una densidad de reticulación del 6,71 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con agua RO al menos tres veces.

La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 3970,00 kg/m²h y capacidad de unión a BSA de 87,4 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso del Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

El análisis del tamaño de los poros de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar totalmente automatizado - CFP - 1500 - AE (Porous Materials Inc., PMI). Se cortó un cupón de membrana (25 mm de diámetro) de la muestra. Se eliminó el exceso de agua con papel de filtro humedecido y se registró el grosor húmedo promedio mediante el uso del micrómetro. A partir de entonces, el cupón de membrana se colocó en una pantalla de soporte y se instaló en la etapa de muestra sobre el aeropuerto en la máquina CFP. La prueba automática se ejecutó de acuerdo con un procedimiento CFP estándar. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,71 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 1,81 µm.

Ejemplo de referencia 25

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

Se preparó una solución al 13,6 % en peso disolviendo cloruro de (3-acrilamidopropil) trimetilamonio (solución al 75 % en peso en agua), N-(3-N,N-dimetilaminopropil) metacrilamida y N-terc-butilacrilamida en una relación molar de 1:0,53:0,1, respectivamente, en una mezcla de solventes que contiene 60,32 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 29,01 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol) y 10,67 % en peso de agua. Es usado N,N'-metilenbisacrilamida como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación del 9,91 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO al menos tres veces.

La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

10 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 1826,00 kg/m²h y capacidad de unión a BSA de 151,5 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso de Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

15 El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado - CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo 24. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,59 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 1,74 µm.

Ejemplo de referencia 26

20 Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

25 Se preparó una solución al 11,8 % en peso disolviendo cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio (solución al 75 % en peso en agua) y N-terc-butilacrilamida en una relación molar de 1:0,09, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 60,64 % en peso % N,N'-dimetilacetamida, 28,87 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol) y 10,49 % en peso de agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida como agente de reticulación para conseguir una densidad de reticulación del 7,25 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

30 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO al menos tres veces.

35 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 1235,00 kg/m²h y capacidad de unión a BSA de 196,8 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

40 El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado - CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo 24. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,31 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 1,50 µm.

Ejemplo de referencia 27

45 Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

50 Se preparó una solución al 12,2 % en peso disolviendo cloruro de (3-acrilamidopropil) trimetilamonio (solución al 75 % en peso en agua), N-terc-butilacrilamida y diacetona acrilamida en una relación molar de 1:0,1:0,1, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 61,11 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 30,15 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol) y 8,75 % en peso de agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida como agente de reticulación para conseguir una densidad de reticulación del 7,25 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

55 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO al menos tres veces.

60 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

65 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 1075,00 kg/m²h y capacidad de unión a BSA de 184,2 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado-CFP-1500-AE (Porous Materials, Inc.) como se describió en el Ejemplo 24. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,21 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 0,95 µm.

5 Ejemplo de referencia 28

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

- 10 Se preparó una solución al 12,8 % en peso disolviendo cloruro de (3-acrilamido propil) trimetilamonio (solución al 75 % en peso en agua), N-fenil acrilamida y diacetona acrilamida en una relación molar de 1:0,08:0,16, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 61,89 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 29,97 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol) y 8,14 % en peso de agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida como agente de reticulación para conseguir una densidad de reticulación del 10,43 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

15 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO al menos tres veces.

20 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

- 25 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 1135,00 kg/m²h y capacidad de unión a BSA de 187,9 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso de Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

30 El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado - CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo 24. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,29 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 1,15 µm.

Ejemplo de referencia 29

- 35 Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

40 Se preparó una solución al 13,2% en peso disolviendo cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio (solución al 75% en peso en agua), N-(3-N,N-dimetilaminopropil)metacrilamida y N-fenilacrilamida en una relación molar de 1: 0,51:0,09, respectivamente, en una mezcla de solvente que contiene 62,18 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 29,55 % en peso de di(propilenglicol) metil éter acetato y 11,33 % en peso de agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida como agente de reticulación para conseguir una densidad de reticulación del 10,43 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

- 45 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO al menos tres veces.

50 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

55 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 2810,00 kg/m²h y capacidad de unión a BSA de 122,4 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso de Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado - CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo 24. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,65 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 1,69 µm.

60 Ejemplo de referencia 30

Este ejemplo ilustra un método para preparar un material de intercambio aniónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

- 65 Se preparó una solución al 12,2 % en peso disolviendo cloruro de trimetilamonio (3-acrilamido propil) (solución al 75 % en peso en agua) y ácido acrílico en una relación molar de 1:1,19, respectivamente, en una mezcla de solvente

que contiene 60,27 % en peso de N,N'-dimetilacetamida, 29,73 % en peso de acetato de éter metílico de di(propilenglicol) y 10,00 % en peso de agua. Se usó N,N'-metilenbis-acrilamida como agente de reticulación para lograr una densidad de reticulación de 7,25 % (mol/mol). El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros.

5 Se preparó un material compuesto a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). La muestra se irradió durante 10 min a 350 nm. El material compuesto resultante se lavó a fondo con RO al menos tres veces.

10 La membrana así obtenida se caracterizó en términos de flujo de soluto (Tris/HCl 25 mM, pH 8,2) y capacidad de unión a BSA mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1.

15 El material compuesto producido por este método mostró un flujo de soluto de 1850,00 kg/m²h y una capacidad de unión de BSA de 150,5 mg/ml con un avance del 10 % mediante el uso de Tris/HCl 25 mM pH 8,2 como tampón de unión.

20 El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado - CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo 24. La prueba mostró un diámetro de poro de flujo medio de 0,57 µm y un diámetro de poro de punto de burbuja de 1,44 µm.

Ejemplo de referencia 31

25 Este ejemplo ilustra el efecto de la hidrofobicidad sobre el rendimiento de la membrana del material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

30 Se prepararon soluciones al 10,5 % en peso disolviendo ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS), N-fenilacrilamida (PhAAm) o N-terc-butilacrilamida (BuAAm) (los monómeros PhAAm y BuAAm se denominan como Hm en la Figura 23 más abajo) y N-hidroxietilacrilamida (HEAAm) en una mezcla de solvente que contiene N,N'-dimetilacetamida (DMAc), di(propilenglicol) metilo (DPM), éter dimetílico de di(propilenglicol) (DMM), carbonato de propileno (PrCarb), 1,2-propanodiol (Prdiol) y agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida (BIS) como agente de reticulación. El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros. Las características de las formulaciones se presentan en la Figura 23 más abajo.

35 Se prepararon materiales compuestos a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las muestras se irradiaron durante 10 min a 350 nm. Los materiales compuestos resultantes se colocaron en una solución que contiene NaOH 0,25 M y NaCl 0,5 M durante 10 min, y luego las membranas se lavaron a fondo con RO al menos tres veces y se secaron a temperatura ambiente.

40 45 Las membranas así obtenidas se caracterizaron en términos de flujo de soluto (NaAc/NaCl 85 mM, conductividad 15 mS/cm, pH 4,4), capacidad de unión a hIgG (BC) y recuperación de proteína mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1. Se usó una solución A de NaAc/NaCl 85 mM, conductividad 15 mS/cm y pH 4,4 como tampón de unión y tampón Tris/HCl 25 mM que contiene NaCl 250 mM, pH 8,2 como tampón de elución.

50 El hinchartamiento en agua se midió como porcentaje de aumento en el grosor después de que la membrana se remojara en agua durante 15 min.

55 60 El análisis del tamaño de poro de la membrana se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado - CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo 24.

Las características de rendimiento de las membranas de modo mixto de intercambio catiónico con varios componentes hidrófobo se presentan en la Figura 24 más abajo.

Como se puede ver en la Figura 24, la membrana que contiene fenilo mostró un flujo de tampón más bajo y una capacidad de unión dinámica más alta. Esto último es coherente con la naturaleza más hidrófila de la membrana basada en fenilo en comparación con la membrana basada en butilo.

Ejemplo de referencia 32

Este ejemplo ilustra un efecto de la naturaleza de los comonomeros sobre el rendimiento del material de intercambio catiónico de la presente invención con funcionalidad multimodal.

65 Se prepararon soluciones al 10,5 % en peso disolviendo ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS), N-terc-butilacrilamida (BuAAm) y N-isopropilacrilamida (NIPAM) o N,N'-dimetil acrilamida (DMAAm) o diacetona

- acrilamida (DAAm) o N-hidroxietil acrilamida (HEAAM) (los comonómeros se denominan CM en la Figura 25 más abajo) en una mezcla de solvente que contiene N,N'-dimetilacetamida (DMAc), di(propilenglicol) metilo (DPM), éter dimetílico de di(propilenglicol) (DMM), carbonato de propileno (PrCarb), 1,2-propanodiol (Prdiol) y agua. Se usó N,N'-metilenbisacrilamida (BIS) como agente de reticulación. El fotoiniciador Irgacure 2959 se añadió en una cantidad del 5 1 % en peso con respecto a la masa de los monómeros. Las características de las formulaciones se presentan en la Figura 25 más abajo.
- Los materiales compuestos se prepararon a partir de la solución y el soporte TR0671 B50 (Hollingsworth & Vose) mediante el uso de la polimerización fotoiniciada de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente 10 (Ejemplo 1). Las muestras se irradiaron durante 4 minutos y 10 minutos a 350 nm. Los materiales compuestos resultantes se colocaron en una solución que contiene NaOH 0,25 M y NaCl 0,5 M durante 10 min, y luego las membranas se lavaron a fondo con RO al menos tres veces y se secaron a temperatura ambiente.
- Las membranas irradiadas durante 15 min se caracterizaron en términos de flujo de soluto (NaAc/NaCl 85 mM, conductividad 15 mS/cm, pH 4,4), capacidad de unión de hlgG (BC) y recuperación de proteína mediante el uso del procedimiento general como se describió en el Ejemplo 1. Se usó una solución de NaAc 85 mM, conductividad de 15 mS/cm y pH 4,4 como tampón de unión y tampón Tris/HCl 25 mM que contiene NaCl 250 mM, pH 8,2 como tampón de elución. El hinchamiento en agua se midió como porcentaje de aumento en el grosor después de que las membranas secas se remojaran en agua durante 15 min.
- Ambas membranas irradiadas durante 4 min y 10 min se caracterizaron en términos de tamaño de poro de flujo medio y tamaño de poro de punto de burbujeo. El análisis del tamaño de poro de las membranas se realizó mediante el uso de un porómetro de flujo capilar completamente automatizado-CFP-1500-AE (Porous Materials Inc.) como se describió en el Ejemplo de referencia 24.
- Las características de rendimiento de las membranas de modo mixto de intercambio catiónico con varios componentes hidrófobos se presentan en la Figura 26 más abajo.
- Todos los comonómeros seleccionados usados en este Ejemplo son hidrófilos, total/o parcialmente solubles en agua 30 y muy compatibles con el monómero AMPS en términos de velocidad de polimerización. Como se puede ver en la Figura 26, la alteración del tipo de comonómero da como resultado membranas con diferentes flujos de tampón, capacidad de unión dinámica de hlgG, tamaño de poro e hinchamiento. Las membranas basadas en NIPAM, DAAm y HEAAM preparadas a 4 min y 10 min de tiempo de polimerización tenían un tamaño medio de poro de flujo y un tamaño de poro de punto de burbujeo similares. Este último indica la alta velocidad de polimerización que se produjo 35 en estos casos.

REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto, que comprende:
 5 un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y
 un gel reticulado, en donde el gel reticulado comprende un copolímero formado a partir de una reacción de: ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y acrilato de 2-carboxietilo; y
 10 el gel reticulado está ubicado en los poros del miembro de soporte.
2. El material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gel reticulado es macroporoso.
3. El material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el copolímero está formado por ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol, acrilato de 2-carboxietilo y
 15 metacrilato de 2-(metiltio)etilo.
4. El material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el copolímero está formado por ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol, acrilato de 2-carboxietilo y
 20 metacrilato de hidroxipropilo.
5. El material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la reacción para formar el gel reticulado incluye como agente de reticulación:
 25 A) triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano; o
 B) dimetacrilato de etilenglicol.
6. El material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el material compuesto es una membrana; y/o
 30 en donde el grosor del miembro de soporte es de 10 µm a 500 µm; y/o en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de 0,1 µm a 25 µm.
7. Un método que comprende la etapa de:
 35 poner en contacto a una primera tasa de flujo un primer fluido que comprende una sustancia con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para de esta manera adsorber o absorber una porción de la sustancia sobre el material compuesto.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el primer fluido comprende además un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina o un virus; y/o
 40 en donde la trayectoria de flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto; y/o el método que comprende además una o más etapas seleccionadas de A y B:
 45 A) poner en contacto a una segunda tasa de flujo un segundo fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, para liberar de esta manera una primera porción de la sustancia del material compuesto; opcionalmente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del segundo fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto; y/o
 B) poner en contacto a una tercera tasa de flujo un tercer fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, para liberar de esta manera una segunda porción de la sustancia del material
 50 compuesto.
9. Un método que comprende la etapa de:
 55 poner en contacto a una primera tasa de flujo un primer fluido que comprende una sustancia y un material no deseado con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para de esta manera adsorber o absorber una porción del material no deseado sobre el material compuesto.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el material no deseado comprende un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina o un virus; y/o
 60 sustancialmente todo el material no deseado se adsorbe o absorbe sobre el material compuesto; y/o la trayectoria de flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.
- 65 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde la sustancia es una molécula biológica o un ion biológico; opcionalmente

- en donde la molécula biológica o el ion biológico se selecciona del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células, γ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen humano y animal, proteínas de origen recombinante y natural, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobina, mioglobulina, α -quimotripsinógeno, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, productos derivados del ácido nucleico, ADN de origen sintético y natural, y ARN de origen sintético y natural; o en donde la molécula biológica o el ion biológico es lisozima, hIgG, mioglobina, albúmina sérica humana, inhibidor de tripsina de soja, transferrina, enolasa, ovoalbúmina, ribonucleasa, inhibidor de tripsina de huevo, citocromo c, anexina V o α -quimotripsinógeno.
12. Un método para fabricar un material compuesto, que comprende las etapas de:
- combinar
 ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, metacrilato de éter fenílico de etilenglicol y acrilato de 2-carboxietilo;
 un fotoiniciador; un agente de reticulación; y un solvente; para formar de esta manera una mezcla monomérica;
 poner en contacto un miembro de soporte con la mezcla monomérica, para formar de esta manera un miembro de soporte modificado; en donde el miembro de soporte comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte, y el diámetro promedio de poro de los poros es de 0,1 a 25 μm ; recubrir el miembro de soporte modificado con una lámina polimérica, formando de esta manera un miembro de soporte recubierto; y
 irradiar el miembro de soporte cubierto durante un período de tiempo, de esta manera se forma un material compuesto; en donde
 el gel reticulado está ubicado en los poros del miembro de soporte.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende además la etapa de lavar el material compuesto con un segundo solvente, para formar de esta manera un material compuesto lavado; opcionalmente en donde el segundo solvente es agua; y/o
 que comprende además la etapa de poner en contacto el material compuesto o el material compuesto lavado con una solución salina; opcionalmente en donde la solución salina comprende hidróxido de sodio; y/o
 la solución salina comprende cloruro de sodio; y/o
 que comprende además la etapa de retirar cualquier exceso de mezcla monomérica del miembro de soporte cubierto;
 opcionalmente
 en donde el miembro de soporte cubierto se irradia a aproximadamente 350 nm.
14. El método de la reivindicación 12 o 13, que comprende una característica seleccionada de A o B, en donde:
- A) la mezcla monomérica comprende (a) ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico; (b) metacrilato de éter fenílico de etilenglicol; (c) acrilato de 2-carboxietilo; y (d) metacrilato de 2-(metiltio)etilo o metacrilato de hidroxipropilo; o
 B) la mezcla monomérica comprende (a) ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico; (b) metacrilato de éter fenílico de etilenglicol; y (c) acrilato de 2-carboxietilo.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el fotoiniciador está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0,4 % (p/p) a aproximadamente 2,5 % (p/p) con relación al peso total de monómero; y/o
 en donde el fotoiniciador se selecciona del grupo que consiste en 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propan-1-ona, 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, benzofenona, benzoína y éteres de benzoína, dialcoxiacetofenonas, hidroxialquilfenonas y ésteres sulfónicos de α -hidroximetilbenzoína; y/o
 en donde el solvente comprende:
 A) 1,3-butanodiol, éter propílico de di(propilenglicol), N,N-dimetilacetamida, éter dimetílico de di(propilenglicol), 1,2-propanodiol, acetato de éter metílico de di(propilenglicol) (DPMA), agua, dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona, etanol, N-metilpirrolidona (NMP), tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, acetonitrilo, N-metilacetamida, propanol, éter propílico de tri(propilenglicol) o metanol; o
 B) N,N-dimetilacetamida, éter dimetílico de di(propilenglicol), 1,2-propanodiol y agua; o
 C) N,N-dimetilacetamida; o
 D) éter dimetílico de di(propilenglicol); o
 E) 1,2-propanodiol; o
 F) agua; o
 G) acetato de éter metílico de di(propilenglicol); o

1,3-butanodiol o éter propílico de tri(propilenglicol); y/o en donde el agente de reticulación está presente en el solvente en aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 25 % (p/p).

- 5 16. El material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el método de la reivindicación 12, en donde:
- 10 A) la reacción para formar el gel reticulado incluye un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en diacrilato de 1,3-diglicerolato de glicerol, dimetacrilato de glicerol, metacrilato de 3-(acrioloíxi)-2-hidroxipropilo, triacrilato de propoxilato de glicerol, ácido bisacrilamidoacético, 2,2-bis[4-(2-acrioloíxi)fenil]propano, 2,2-bis(4-metacriloxifenil)propano, diacrilato y dimetacrilato de butanodiol, éter divinílico de 1,4-butanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,4-ciclohexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,10-dodecanodiol, 1,4-diacriloipiperazina, dialiftalato, diacrilato y dimetacrilato de 2,2-dimetilpropanodiol, pentaacrilato de dipentaeritritol, diacrilato y dimetacrilato de dipropilenglicol, N,N-dodecametilenbisacrilamida, divinilbenceno, trimetacrilato de glicerol, éter tris(acrioloíxi) de glicerol, N,N'-hexametilenbisacrilamida, N,N'-octametilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de 1,5-pantanodiol, diacrilato de 1,3-fenileno, diacrilato y dimetacrilato de poli(etilenglicol), diacrilato y dimetacrilato de poli(propileno), diacrilato y dimetacrilato de trietylenglicol, éter divinílico de trietylenglicol, diacrilato o dimetacrilato de tripropilenglicol, carbonato de dialildiglicol, éter divinílico de poli(etilenglicol), N,N'-dimetacriloipiperazina, divinilglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, N,N'-metilenbisacrilamida, trimetacrilato de 1,1,1-trimetiloletano, triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano, trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano (TRIM-M), acrilato de vinilo, diacrilato y dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,3-butilenglicol, diacrilato de ciclohexano dimetanol alcoxilado, diacrilato de hexanodiol alcoxilado, diacrilato de neopentilglicol alcoxilado, dimetacrilato aromático, diacrilato de neopentilglicol hidroxipivalato modificado con caprolactona, diacrilato y dimetacrilato de ciclohexano dimetanol, diacrilato y dimetacrilato de bisfenol etoxilado, diacrilato y dimetacrilato de neopentilglicol, triacrilato de trimetilolpropano etoxilado, triacrilato de trimetilolpropano propoxilado, triacrilato de glicerilo propoxilado, triacrilato de pentaeritritol, triacrilato de tris(2-hidroxi)isocianurato, tetraacrilato de ditrimetilolpropano, pentaacrilato de dipentaeritritol, tetraacrilato de pentaeritritol etoxilado, éster de pentaacrilato, tetraacrilato de pentaeritritol, hexaacrilato de dipentaeritritol modificado con caprolactona, N,N'-metilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de dietilenglicol, triacrilato de trimetilolpropano, diacrilato y dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de tetra(etilenglicol), diacrilato de 1,6-hexanodiol, divinilbenceno, diacrilato de poli(etilenglicol), 1,3,5-triacriloilhexahidro-1,3,5-triazina, éter dialílico de trimetilolpropano, 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina, 1,3,5-trialil-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H,3H,5H)-triona, N,N'-hexametilenbis(metacrilamida) y gioxal bis(dialilacetato); o
- 15 B) el agente de reticulación es diacrilato de 1,3-diglicerolato de glicerol; o
- 20 C) el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol o metacrilato de 3-(acrioloíxi)-2-hidroxipropilo; o
- 25 D) el agente de reticulación comprende dimetacrilato de glicerol y metacrilato de 3-(acrioloíxi)-2-hidroxipropilo; o
- 30 E) el agente de reticulación es triacrilato de propoxilato de glicerol; o
- 35 F) el agente de reticulación es triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano o trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano; o
- 40 G) el agente de reticulación es dimetacrilato de etilenglicol o N,N'-metilenbisacrilamida.

Figura 1

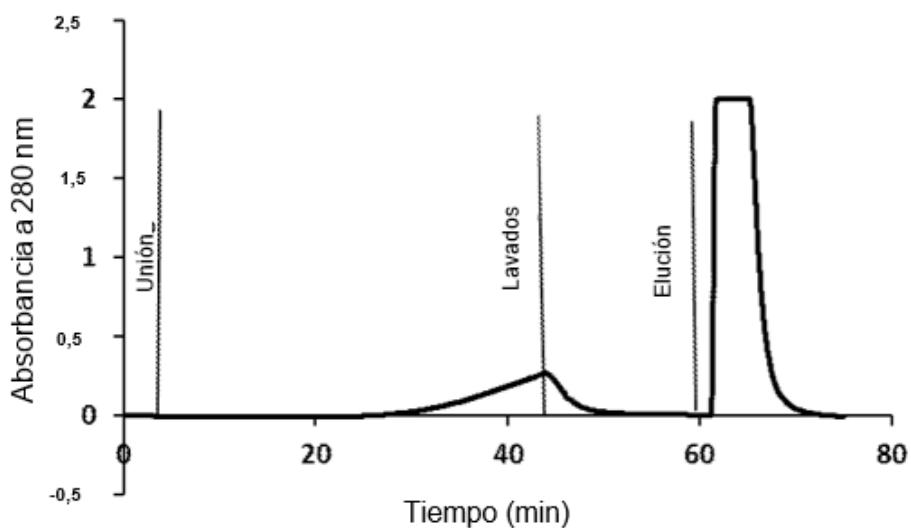
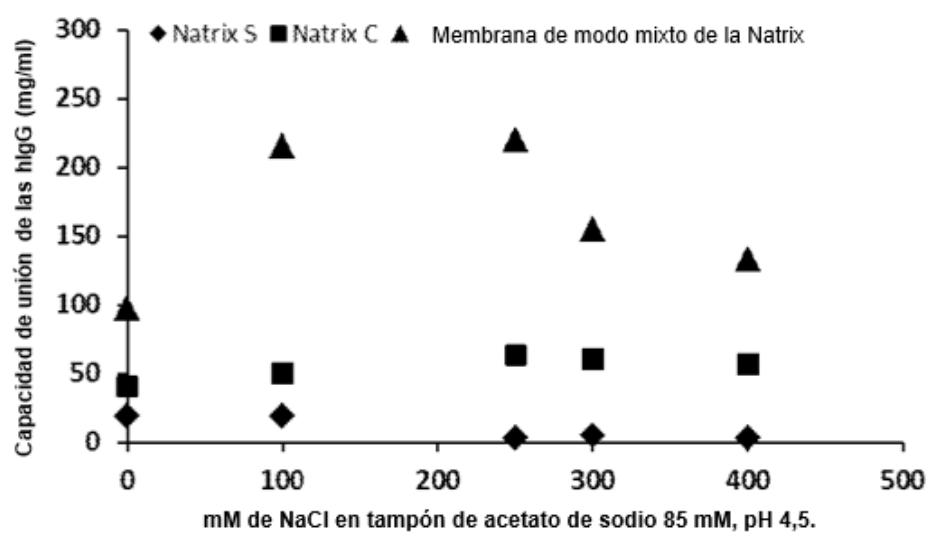


Figura 2



ES 2 912 930 T3

Figura 3

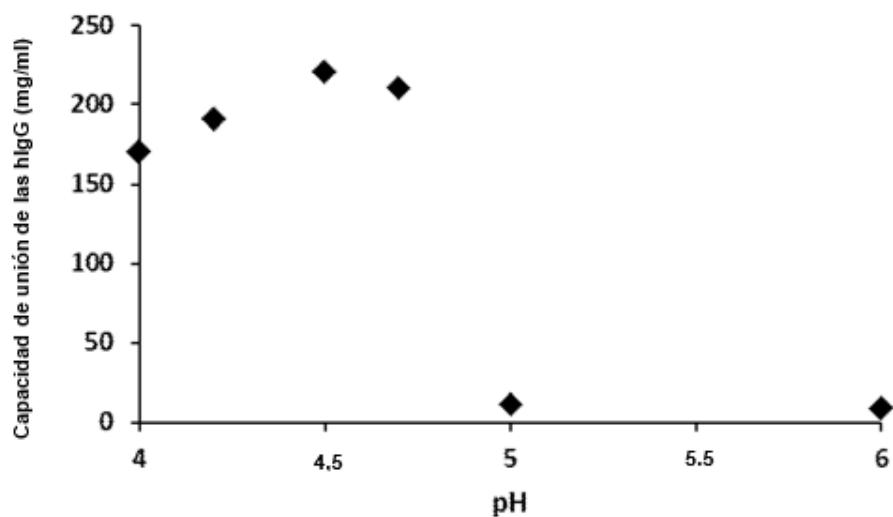
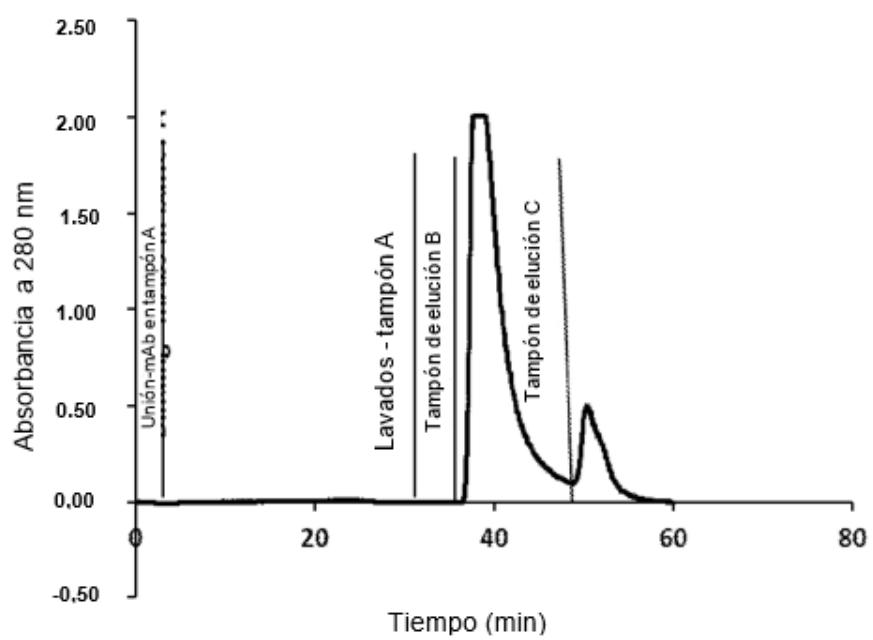


Figura 4



ES 2 912 930 T3

Figura 5

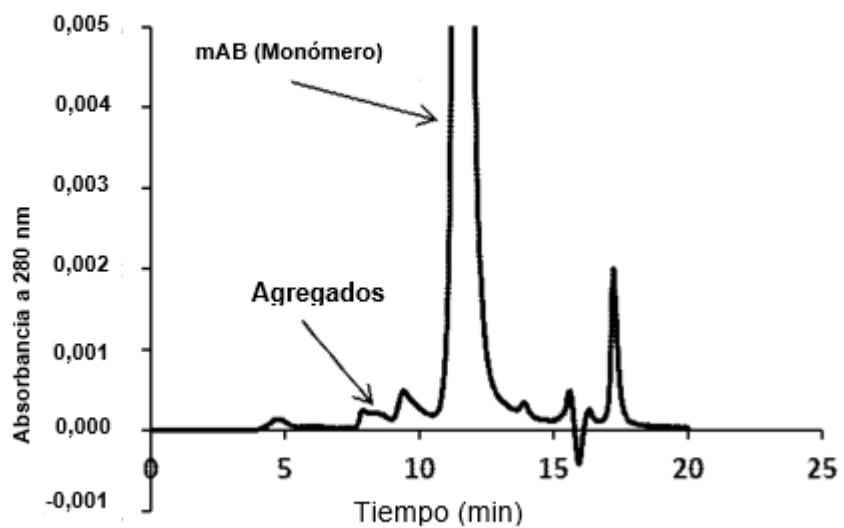
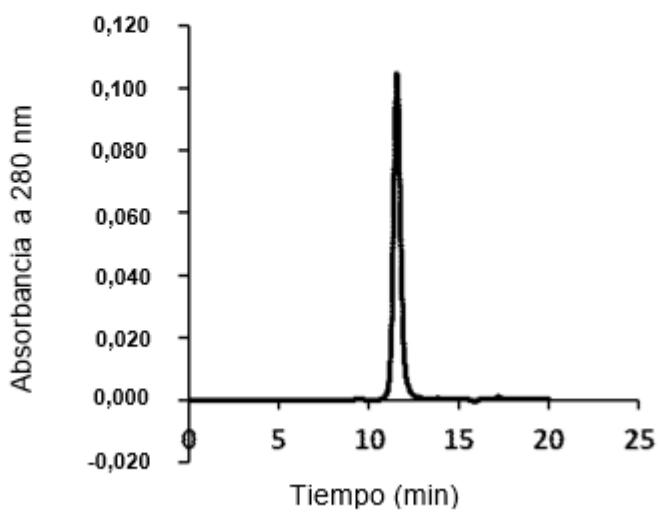


Figura 6



ES 2 912 930 T3

Figura 7

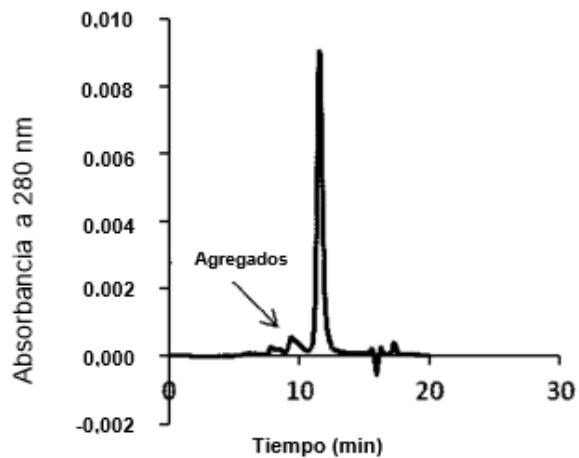


Figura 8

Número de ciclos	Capacidad de unión dinámica a mAb (mg/ml)	% de Agregados en el eluente B	% de Mab en el eluente B	% de Fragmentos en el eluente B
1	185,0	0,11	99,84	0,05
2	186,2	0,12	99,87	0,01
3	184,3	0,11	99,88	0,01

Figura 9

Proteínas/mAb	Toyopearl MX-Trp-650M (Tosoh Biosciences)	Capto MMC (GE Health care)	Membrana de modo mixto (Natrix)
Lisozima	-	55,0	135,0
mAb/IgG	90,0	-	220,1

Figura 10

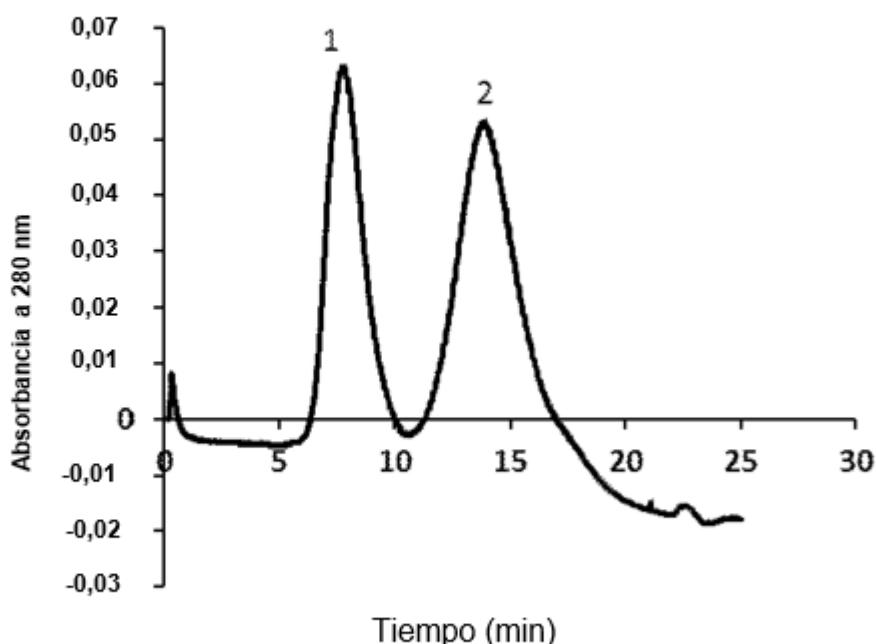
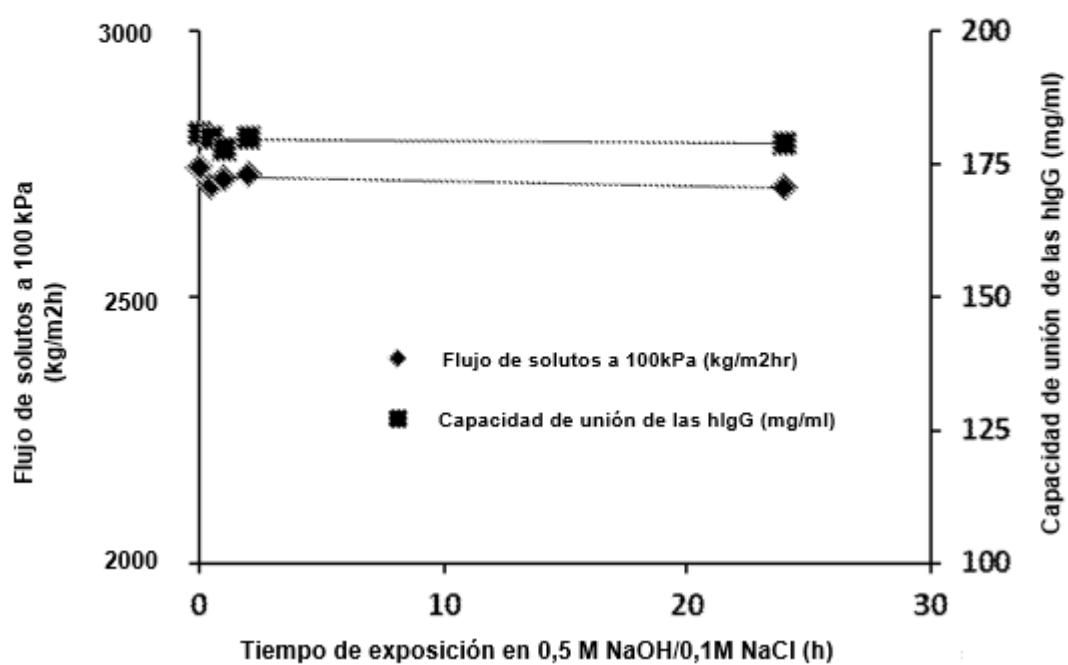


Figura 11



ES 2 912 930 T3

Figura 12

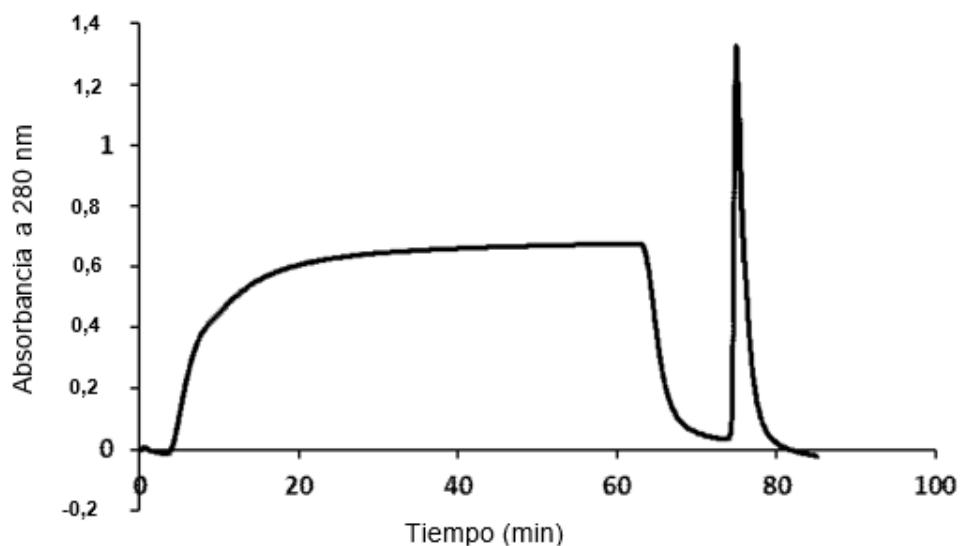


Figura 13

Ejemplo	% Área del pico			Eliminación de los agregados (%)
	Agregados (10,2 min)	Monómeros de mAb (12,5 min)	Fragmentos (17,6 min)	
Alimentación	1,79	98,14	0,07	-
Fracción A6	0	100	0	100
Fracción A7	0	100	0	100
Fracción A8	0,16	99,84	0	91,0

ES 2 912 930 T3

Figura 14

Ejemplo	HCP (ppm)	Eliminación de HCP (%)	Absorbancia A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ADN (ng/ml)	Eliminación de ADN (%)	Rendimiento (%)
Alimentación	3720,00	-	-	7740,00	-	-
Fracción ΣA1-A5	360,00	90,3	-	83,00	98,9	
Fracción ΣA6-A8	410,00	89,0	-	10,00	99,8	> 90,0
Fracción de Flujo continuo	-	-	1,81	-	-	-

Figura 15

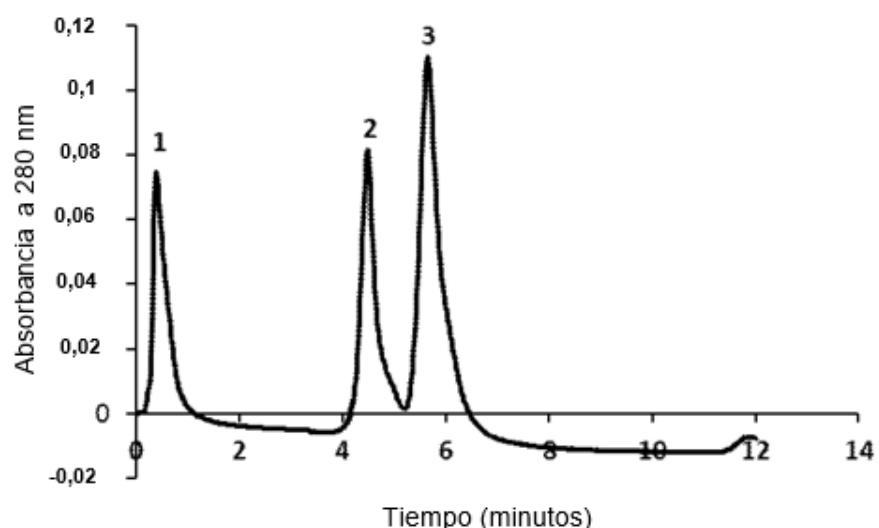


Figura 16

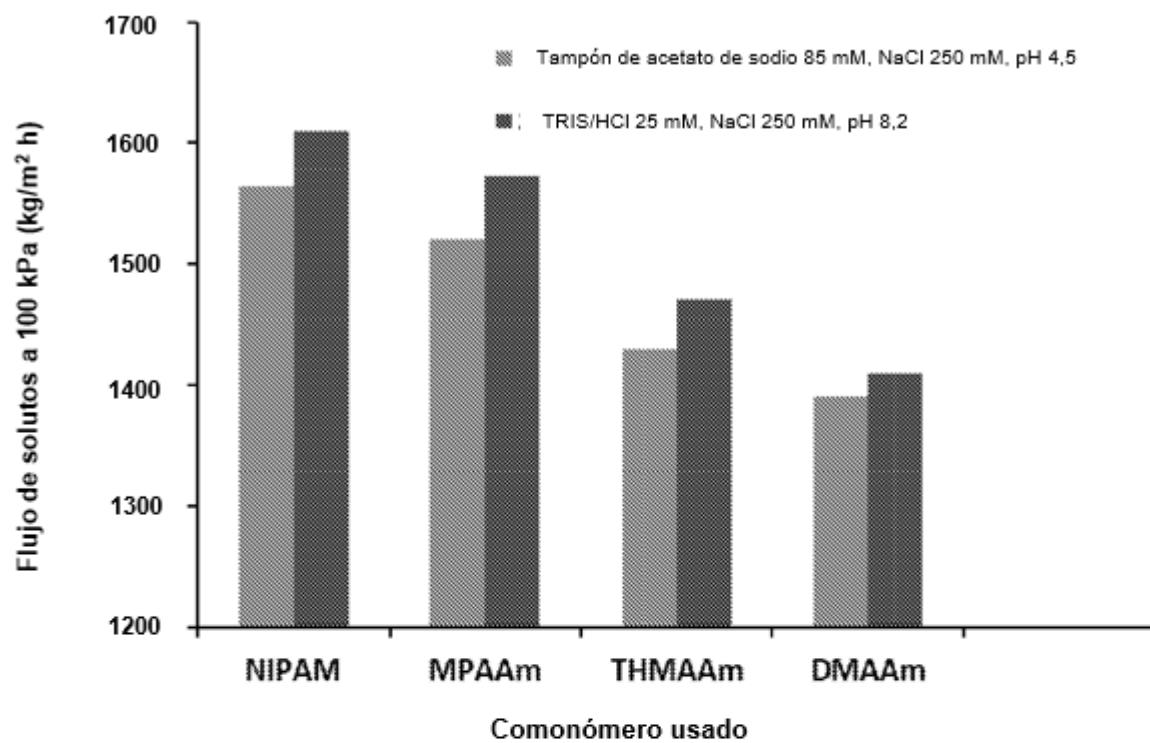
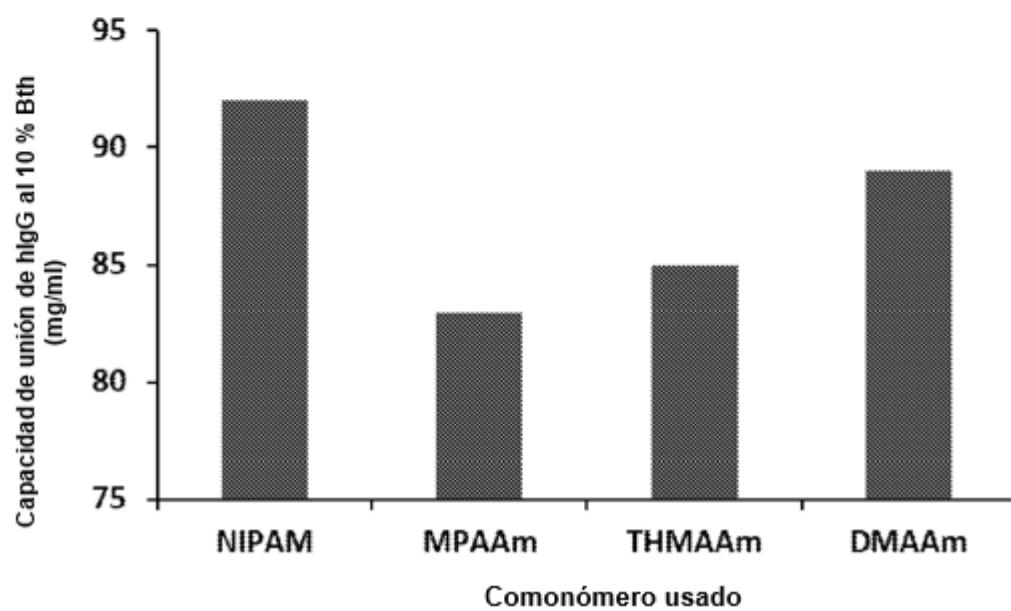


Figura 17



ES 2 912 930 T3

Figura 18

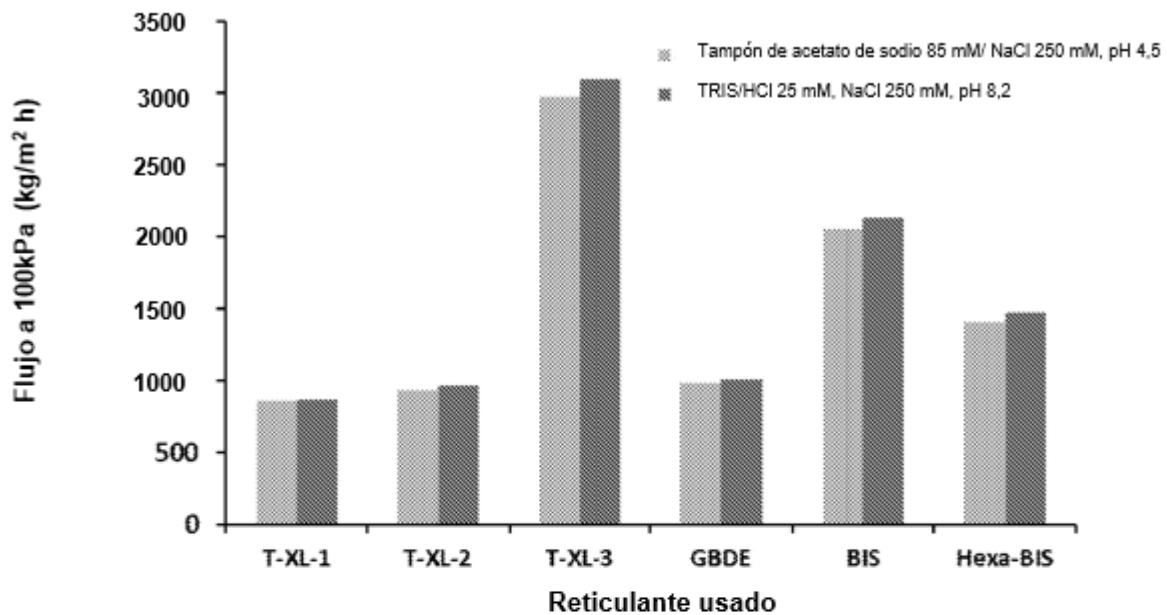
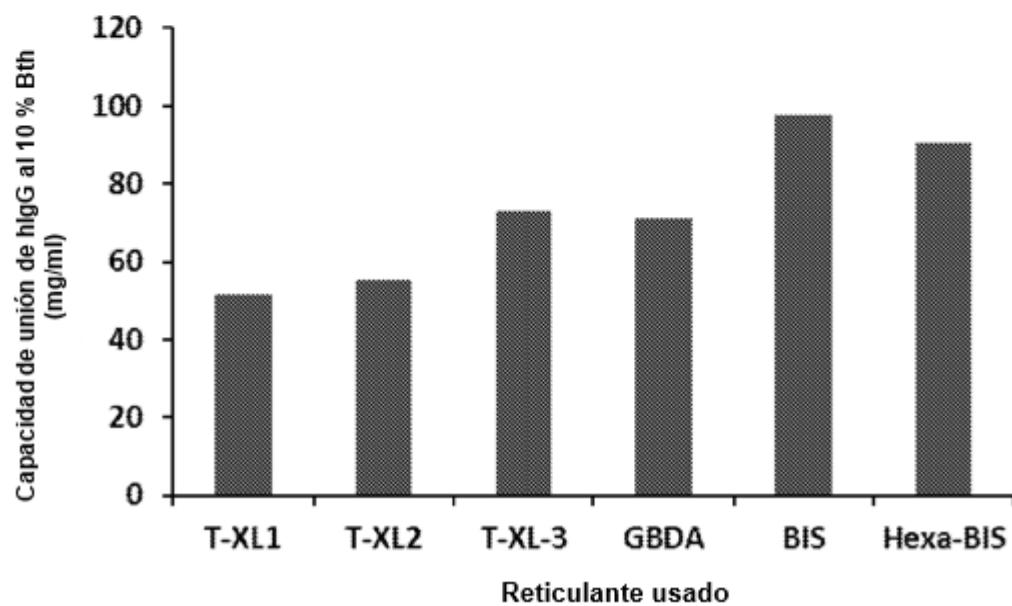
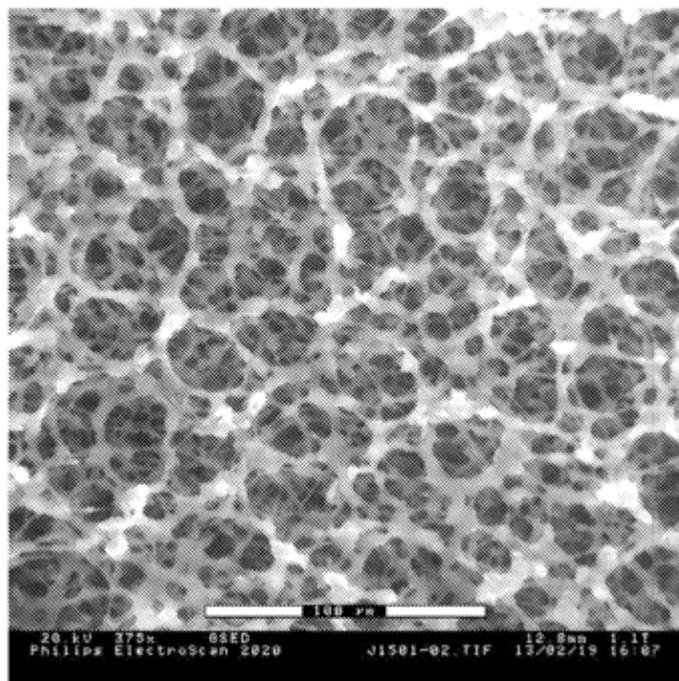


Figura 19



ES 2 912 930 T3

Figura 20



ES 2 912 930 T3

Figura 21

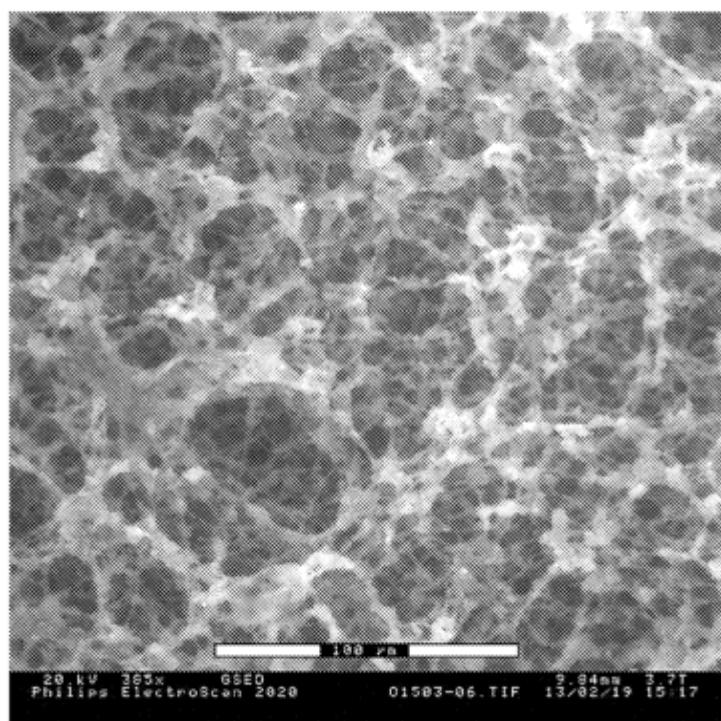


Figura 22

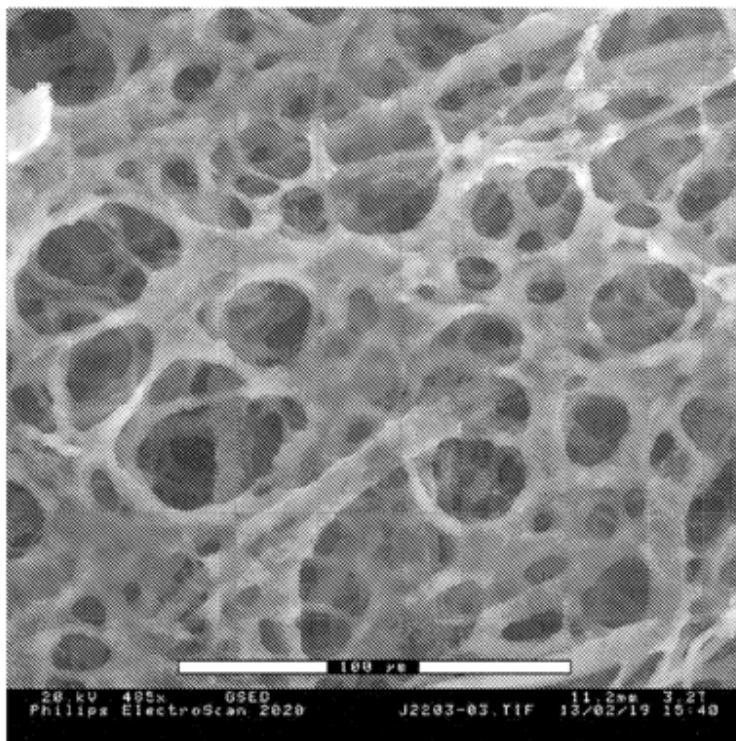


Figura 23

Membrana	Monómeros y XL (mol %)				Solvente usado (% en peso)					
	AMPS	Hm	HEAAm	BIS	DMAc	DPM	DMM	PrCarb	Prdiol	Aqua
M-PhAAm	69,25	5,18	12,25	13,32	23,12	34,75	20,65	6,14	4,61	10,72
M-BuAAm	68,56	5,82	12,92	12,71	23,13	34,43	21,05	5,61	5,46	10,32

Figura 24

Membrana	Flujo del Tampón (kg/m ² h)	BC (mg/ml)	Recuperación (%)	Hinchamiento (%)	Tamaño Promedio de Poro (μm)	Punto de Burbuja, Tamaño de Poro (μm)
M-PhAAm	2090,00	112,3	> 90	12,1	0,65	1,47
M-BuAAm	2410,00	107,7	> 90	12,4	0,54	1,57

ES 2 912 930 T3

Figura 25

Membrana	Monómeros y XL (mol %)				Solvente usado (% en peso)					
	AMPS	BuAAm	CM	BIS	DMAc	DPM	DMM	PrCarb	Prdiol	Agua
M-NIPAM	67,98	6,57	11,29	14,16	23,69	34,60	20,76	5,77	4,66	10,52
M-DMAAm	65,24	6,09	15,75	12,92	23,03	34,28	20,83	5,76	5,60	10,51
M-DAAm	68,44	5,84	10,46	15,27	23,12	34,39	20,37	6,30	5,20	10,63
M-HEAAm	68,56	5,82	12,92	12,71	23,13	34,43	21,05	5,61	5,46	10,32

Figura 26

Membrana	Flujo del tampón (kg/m ² h)	BC (mg/ml)	Recuperación (%)	Hinchamiento (%)	Tamaño Promedio de Poro (μm)		Punto de Burbuja, Tamaño de Poro (μm)	
					4 min	10 min	4 min	10 min
M-NIPAM	2870,00	104,1	> 90	10,5	0,52	0,47	1,46	1,38
M-DMAAm	2390,00	112,1	> 90	11,9	0,61	0,54	1,70	1,25
M-DAAm	2770,00	110,1	> 90	11,7	0,50	0,55	1,40	1,52
M-HEAAm	2410,00	107,7	> 90	12,4	0,53	0,54	1,46	1,57