

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 748**

51 Int. Cl.:

F26B 3/00	(2006.01)
B01J 20/26	(2006.01)
B01J 20/28	(2006.01)
B01J 20/291	(2006.01)
C07K 1/16	(2006.01)
F26B 21/14	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2020 PCT/IB2020/000832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2021 WO21048633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2020 E 20807103 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 4028704**

54 Título: **Secado supercrítico de medios cromatográficos**

30 Prioridad:

13.09.2019 US 201962900155 P
16.09.2019 US 201962900798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BOYLE, JOHN;
SKARJA, GARY y
RAGHEB, AMRO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 977 748 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

Secado supercrítico de medios cromatográficos

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad a la Solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/900,798, presentada el 16 de septiembre de 2019; y Solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/900,155, presentada el 13 de septiembre de 2019.

Antecedentes

10 La tecnología de fluidos supercríticos (SCF) ha encontrado muchos usos en una variedad de campos, especialmente en aplicaciones farmacéuticas, como la ingeniería de partículas y cristales, donde es muy deseable un gran control sobre las propiedades fisicoquímicas de las partículas producidas y el control de la formación de cristales. Otras aplicaciones, como la formación de partículas compuestas, la extracción, el recubrimiento y la preparación de liposomas, han encontrado un gran interés en la tecnología SCF.

15 El uso del secado de puntos críticos (CPD) también ha generado interés en varios campos que requieren la preservación de la estructura durante el secado, como el secado de muestras biológicas para procesos de microscopía electrónica de barrido. En general, CPD, especialmente de CO₂, se encontró que mantiene una alta superficie de materiales porosos, como el aerogel de sílice, en comparación con el secado regular.

Además, los avances recientes en la tecnología exploraron la síntesis de materiales porosos mediante el desarrollo de procesos reactivos en CO₂ supercrítico fluido para sintetizar estructuras organometálicas (MOF) tridimensionales de poros vacíos, así como para procesar materiales porosos desordenados, como polímeros, aerogeles y hormigón.

20 La tecnología de fluidos supercríticos también se utiliza con éxito para la micronización de proteínas, la encapsulación en partículas, la fabricación de espuma microporosa biopolimérica (utilizando espuma supercrítica) y la impregnación supercrítica para el desarrollo de formulaciones o dispositivos biomédicos y farmacéuticos. Para secar proteínas con polímeros, el SCF se puede utilizar de diversas formas para producir el biopolímero. La elección del método depende en gran medida de: la interacción del fluido supercrítico (por ejemplo, CO₂) con el ingrediente activo (por ejemplo, proteína), el disolvente y el material de recubrimiento de interés o el polímero, donde la interacción del polímero con el fluido supercrítico (por ejemplo, CO₂) cumple una función importante.

25 Otros métodos de secado sólo pueden conservar las propiedades de la membrana durante un tiempo de almacenamiento limitado en estado seco. Existe una necesidad de métodos que produzcan materiales de composite secos que muestren propiedades consistentes con el almacenamiento, post-CPD, en estado seco.

30 Resumen

35 Se divulgan métodos para secar materiales de composite en puntos críticos que pueden usarse para una variedad de aplicaciones, incluida la separación y purificación de biomoléculas. Específicamente, se utilizó la técnica CPD para mantener o casi mantener la estructura de los poros húmedos, el área superficial y la permeabilidad de la membrana en estado seco. Después de exponer el material de composite a un fluido supercrítico, el material de composite se seca a medida que el fluido supercrítico se evapora a presión reducida.

En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos de secado en el punto crítico de un material de composite, que comprenden las etapas de:

a. proporcionar un material de composite que comprende:

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

ii. un gel macroporoso reticulado, en el que el gel macroporoso reticulado comprende un polímero formado a partir de una reacción de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticulantes; el gel macroporoso reticulado está situado en los poros del miembro de soporte; y dichos macroporos del gel macroporoso reticulado son más pequeños que los poros del miembro de soporte;

45 en el que el material de composite se humedece con una solución acuosa;

b. intercambiar la solución acuosa con un disolvente orgánico polar, de manera que el material de composite se humedezca con el disolvente orgánico polar;

50 c. poner en contacto el material de composite con un fluido supercrítico a una temperatura y una presión superiores al punto crítico del fluido supercrítico, en el que las fases gaseosa y líquida son indistinguibles; y el disolvente orgánico polar es miscible con el fluido supercrítico; y

d. reducir la presión;

de este modo se seca el punto crítico del material de composite.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos de secado en el punto crítico de un material de composite, que comprenden las etapas de:

5 a. proporcionar un material de composite que comprende:

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

10 ii. un gel macroporoso reticulado, en el que el gel macroporoso reticulado comprende un polímero formado a partir de una reacción de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticulantes; el gel macroporoso reticulado comprende una pluralidad de ligandos que son moléculas biológicas o iones biológicos; el gel macroporoso reticulado está situado en los poros del miembro de soporte; y dichos macroporos del gel macroporoso reticulado son más pequeños que los poros del miembro de soporte;

en el que el material de composite se humedece con una solución acuosa;

15 b. intercambiar la solución acuosa con un disolvente orgánico polar, de manera que el material de composite se humedezca con el disolvente orgánico polar;

c. poner en contacto el material de composite con un fluido supercrítico a una temperatura y una presión superiores al punto crítico del fluido supercrítico, en el que las fases gaseosa y líquida son indistinguibles; y el disolvente orgánico polar es miscible con el fluido supercrítico; y

d. reducir la presión;

20 de este modo se seca el punto crítico del material de composite.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A muestra un material de composite ejemplar con capas de lámina intermedia (por ejemplo, una malla) en un conjunto enrollado o enrollado en espiral.

25 Figura 1B muestra un material de composite ejemplar (por ejemplo, discos de membrana) con capas de lámina intermedia (por ejemplo, una malla) en un conjunto de pila de membranas en un soporte de CPD.

Figura 2 muestra la Tabla 3 con protocolos de intercambio con componentes de alcohol, tampón y sal.

Figura 3A muestra el efecto de secado de punto crítico (CPD) (círculos) sobre el flujo de la membrana en comparación con otros métodos de secado (sin estabilizador, diamantes; y con glicerina, triángulos).

30 Figura 3B muestra efecto de secado en punto crítico (círculos) sobre la capacidad aglomerante en comparación con otros métodos de secado (sin estabilizante, diamantes; y con glicerina, triángulos).

Figura 4A muestra las propiedades de la membrana después del almacenamiento de secado en el punto crítico con una relación de membrana a etanol de 3.3.

Figura 4B muestra las propiedades de la membrana después del almacenamiento de secado en el punto crítico con una relación membrana-etanol de 4.3.

35 Figura 4C muestra las propiedades de la membrana después del almacenamiento de secado en el punto crítico con una relación de membrana a etanol de 4.3.

Figura 4D muestra las propiedades de la membrana después del almacenamiento de secado en el punto crítico con una relación membrana-etanol de 5.6.

40 Figura 5A muestra el efecto de los protocolos de extracción sobre la capacidad de unión dinámica de IgG de la membrana epoxi después de la DPC.

Figura 5B muestra el efecto de los protocolos de extracción sobre el flujo de la membrana epoxi después de la DPC.

Figura 5C muestra el efecto de los protocolos de extracción sobre la capacidad de unión dinámica de IgG de la membrana epoxi después de la DPC.

Figura 5D muestra el efecto de los protocolos de extracción sobre el flujo de la membrana epoxi después de la DPC.

- Figura 6 muestra la Tabla 4 con los parámetros de secado del punto crítico y el volumen de extracción de etanol de membrana relacionado.
- figura 7 muestra la Tabla 5 con parámetros de secado de puntos críticos para membranas con diferentes capacidades de unión y permeabilidades.
- 5 Figura 8A muestra la estabilidad de varias membranas epoxi secas en puntos críticos basadas en fundente.
- Figura 8B muestra la estabilidad de varias membranas de proteína A secas en puntos críticos basadas en fundente.
- Figura 8C muestra la estabilidad de varias membranas epoxi secas en puntos críticos según la capacidad de unión dinámica de IgG.
- 10 Figura 9A muestra el cambio en la distribución del tamaño de los poros de la membrana epoxi en una muestra húmeda intercambiada.
- Figura 9B muestra el cambio en la distribución del tamaño de los poros de la membrana epoxi en una muestra de CPD después de 25 días.
- Figura 9C muestra el cambio en la distribución del tamaño de los poros de la membrana epoxi en una muestra secada a 50 °C durante 10 minutos en EtOH después de 1 día.
- 15 Figura 9D muestra el cambio en la distribución del tamaño de los poros de la membrana epoxi en una muestra secada a 50 °C durante 10 minutos en agua después de 1 día.
- Figura 10A muestra el efecto de CPD sobre el flujo de membrana y la capacidad de unión dinámica de IgG en comparación con el intercambio de disolventes y otros métodos de secado (es decir, a partir de agua y de etanol).
- 20 Figura 10B muestra el efecto de CPD sobre las propiedades del tamaño de poro de la membrana epoxi en comparación con el intercambio de disolventes y otros métodos de secado (a partir de agua y de etanol).
- Figura 11 muestra mediciones de área de superficie de membranas epoxi CPD y una membrana secada en horno.
- Figura 12 muestra la Tabla 6 con los parámetros clave de la ejecución de CPD y el volumen de extracción de alcohol de membrana relacionado.
- 25 Figura 13A muestra el efecto de CPD sobre la capacidad de unión dinámica de IgG de la membrana en comparación con el método de secado en horno.
- Figura 13B muestra el efecto de CPD sobre el flujo de la membrana en comparación con el método de secado en horno.
- Figura 14A muestra el efecto de los protocolos de intercambio con tampones sobre la capacidad de unión dinámica de IgG de membrana de proteína A con CPD.
- 30 Figura 14B muestra el efecto de los protocolos de intercambio con tampones sobre la capacidad de flujo de la membrana de proteína A con CPD.
- Figura 15 muestra la estabilidad a largo plazo de membranas de proteína A secas en puntos críticos intercambiadas con un protocolo de tampón ejemplar.
- 35 Figura 16A muestra el efecto de los protocolos de intercambio con sales sobre la capacidad de unión dinámica de IgG de membrana de proteína A con CPD.
- Figura 16B muestra el efecto de los protocolos de intercambio con sales sobre la capacidad de flujo de la membrana de proteína A con CPD.
- Figura 17 muestra la estabilidad a largo plazo de membranas de proteína A secas en puntos críticos intercambiadas con un protocolo de sal ejemplar.
- 40 Figura 18 muestra una comparación de los efectos de diferentes protocolos de intercambio sobre el rendimiento de la membrana de proteína A CPD.
- Figura 19A muestra datos de capacidad de unión para la membrana CPD del protocolo de intercambio AwB3.
- Figura 19B muestra datos de flujo para la membrana CPD del protocolo de intercambio AwB3.
- 45 Figura 20A muestra datos de capacidad de unión para la membrana CPD del protocolo de intercambio de alcohol limitado AwB3-SV.

Figura 20B muestra datos de flujo para la membrana CPD del protocolo de intercambio de alcohol limitado AwB3-SV.

Figura 21A muestra la prueba de envejecimiento de la capacidad de unión para la membrana de proteína A CPD intercambiada usando los protocolos TP1-AWOB1 y TP2-AWOB1 (con 1 día de almacenamiento en alcohol al 20 %).

5 Figura 21B muestra la prueba de envejecimiento por flujo para la membrana de proteína A de CPD intercambiada utilizando los protocolos TP1-AWOB1 y TP2-AWOB1 (con 1 día de almacenamiento en alcohol al 20 %).

Figura 22A muestra la prueba de envejecimiento de la capacidad de unión para la membrana de proteína A CPD intercambiada usando los protocolos TP1-AWOB1 y TP2-AWOB1 (con almacenamiento de 7 días en alcohol al 20 %).

Figura 22B muestra la prueba de envejecimiento por flujo para la membrana de proteína A de CPD intercambiada utilizando los protocolos TP1-AWOB1 y TP2-AWOB1 (con almacenamiento de 7 días en alcohol al 20 %).

10 Figura 23A muestra la prueba de envejecimiento de la capacidad de unión para la membrana de proteína A de CPD intercambiada usando los protocolos TP3-AWOB1 y TP4-AWOB1 (con almacenamiento de 7 días en alcohol al 16 % en fosfato 20 mM, pH 7.5).

15 Figura 23B muestra la prueba de envejecimiento por flujo para la membrana de proteína A de CPD intercambiada utilizando los protocolos TP3-AWOB1 y TP4-AWOB1 (con almacenamiento durante 7 días en alcohol al 16 % en fosfato 20 mM, pH 7.5).

Descripción detallada

Descripción general

20 Se divulgan métodos para secar materiales de composite en puntos críticos que pueden usarse para una variedad de aplicaciones, incluida la separación y purificación de biomoléculas. En algunas realizaciones, el material de composite es para cromatografía de bioafinidad. En algunas realizaciones, el material de composite es una membrana. En algunas realizaciones, el material de composite es una membrana de gel polimérico poroso. Específicamente, se utilizó la técnica CPD para mantener o casi mantener la estructura de los poros húmedos, el área superficial y la permeabilidad de la membrana en estado seco. Además, el método de secado de punto crítico produce membranas secas que muestran propiedades consistentes con el almacenamiento, post-CPD, en estado seco. En algunas realizaciones, el CPD se usa como método de secado para secar un medio de bioafinidad que tiene un bioligando unido a un gel poroso o a materiales de composite de gel poroso que se pueden usar, entre otras aplicaciones, como medio cromatográfico para bioseparación. Específicamente, la técnica CPD se utiliza para secar el material de proteína-polímero conjugado manteniendo la estructura y la funcionalidad de los medios de bioafinidad. Por el contrario, otros métodos de secado sólo pueden conservar las propiedades de la membrana durante un tiempo de almacenamiento limitado en estado seco.

Definiciones

35 Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se recopilan aquí ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones deben leerse a la luz del resto de la divulgación y entenderse como por una persona experta en la técnica. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos habituales en la técnica.

Al describir la presente invención, se utilizan diversos términos en la descripción. La terminología estándar se usa ampliamente en filtración, suministro de fluidos y procesamiento de fluidos en general.

40 Los artículos "un" y "una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Los términos "comprende" y "que comprende" se utilizan en el sentido abierto e incluyente, lo que significa que se pueden incluir elementos adicionales.

El término "incluido" se utiliza para significar "incluido, entre otros", "que incluye" y "incluido pero no limitado a" se utilizan indistintamente.

45 El término "polímero" se utiliza para referirse a una molécula grande formada por la unión de unidades repetidas (monómeros). El término polímero abarca también copolímeros.

El término "copolímero" se utiliza para referirse a un polímero de al menos dos o más monómeros diferentes. Un copolímero puede estar compuesto por un reticulante y un monómero, si el reticulante es un monómero difuncional.

50 El término "fluido supercrítico" (SCF) se utiliza para referirse a cualquier sustancia química que se coloca a una temperatura y presión superiores a su punto crítico, donde las fases gaseosa y líquida no son distinguibles. Una característica importante de los fluidos supercríticos es que en la región crítica los fluidos muestran densidad como

los líquidos, mientras que la viscosidad y la difusividad son similares a las de los gases. Por lo tanto, los fluidos supercríticos tienen buenas propiedades de mezcla y transferencia de masa, y no sorprende que su capacidad para solubilizar cualquier soluto sea sensible tanto a la temperatura como a la presión. Esta variación de solubilidad a diferentes temperaturas y presiones brinda la oportunidad de utilizar fluidos supercríticos en varias aplicaciones donde la solubilización y precipitación/separación del soluto se pueden controlar al cambiar las condiciones de la región crítica.

El término "Proteína A" o "PrA" se utiliza para referirse a una proteína bacteriana de *Staphylococcus aureus*, un derivado de la Proteína A, o una Proteína A recombinante con capacidad de unirse a anticuerpos de mamíferos de clase inmunoglobulina G (IgG) con alta afinidad. El gen de la proteína A ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli* permitiendo la producción de grandes cantidades de proteína A recombinante y derivados de proteína A. En algunas realizaciones, la proteína A es un ligando de afinidad. En algunas realizaciones, la proteína A es una proteína, péptido o proteína recombinante que comprende un ligando que se une a anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos IgG) y una fracción que puede formar un enlace covalente con un grupo funcional reactivo colgante (por ejemplo, tiol de Cys, o amina de Lys). En algunas realizaciones, la proteína A es una proteína, péptido o proteína recombinante que comprende un ligando que se une al dominio Fc de un anticuerpo y una fracción que puede formar un enlace covalente con un grupo funcional reactivo colgante. En algunas realizaciones la proteína A es una proteína, péptido o proteína recombinante que comprende un ligando que se une al dominio Fab de un anticuerpo y una fracción que puede formar un enlace covalente con un grupo funcional reactivo colgante.

Métodos de uso

Los materiales de composite que comprenden grupos funcionales reactivos colgantes se pueden injertar con ligandos mediante reacciones químicas. Por ejemplo, las membranas porosas que contienen grupos colgantes epoxi activos pueden injertarse con ligandos de bioafinidad mediante reacciones de conjugación nucleofílica con grupos adecuados presentes en los ligandos de bioafinidad. Las membranas conjugadas pueden servir como medios cromatográficos útiles para separaciones por bioafinidad de objetivos específicos, como anticuerpos monoclonales. Para tener un rendimiento de separación altamente productivo, la plataforma de membrana debe mantener una estructura porosa que produzca suficiente permeabilidad para fluir y la capacidad de unión al objetivo deseada, y estas características deben ser estables durante el almacenamiento.

En general, los medios cromatográficos de bioafinidad dependen de la especificidad del ligando inmovilizado que le permite unirse selectivamente a una diana específica entre otros analitos, que pueden liberarse en etapas posteriores, utilizando fases móviles que reducen las fuerzas de unión entre el ligando y la diana. Esta bioactividad del ligando depende en gran medida de la estructura geométrica y química del centro activo y, por lo tanto, es probable que cualquier cambio en la estructura química o en la estereoestructura afecte la capacidad de unión de los medios cromatográficos.

Uno de los principales desafíos en la fabricación de medios cromatográficos es inmovilizar ligandos específicos en la interfaz y mantener su bioactividad, especialmente en forma seca. En general, el secado de las moléculas de proteína expone la biomolécula a diversas fuerzas físicas debido a la eliminación de agua y a las fuerzas de interacción intramolecular que ejercen presión sobre la estructura tridimensional de la molécula grande, lo que probablemente resulta en cambios irreversibles en la estructura 3D.

Se examinaron muchas técnicas para el secado de proteínas, incluida la liofilización y la técnica emergente de secado SCF. Históricamente, el secado por congelamiento (también conocida como liofilización) es el método preferido para deshidratar proteínas. Sin embargo, existen tensiones asociadas con el proceso de congelación en sí, especialmente en la etapa de congelación, que pueden representar un riesgo de desnaturalización de proteínas. El secado con fluidos supercríticos es una técnica relativamente nueva que también conlleva diferentes tensiones en la estructura de la proteína, ya que la alta presión asociada con el proceso SCF podría influir en la estabilidad de la proteína y el uso de disolventes orgánicos puede provocar desnaturalización o agregación.

Para ligandos o biomoléculas inmovilizados, la tarea es más complicada ya que fuerzas adicionales debidas a diversas interacciones con la superficie del medio (interacciones hidrofóbicas e iónicas) amplifican los efectos de secado y probablemente reducen la bioactividad del ligando. Es esencial controlar el proceso de secado para mantener la bioactividad, especialmente si la superficie del medio también se ve afectada por el proceso de secado. Si bien la liofilización es eficaz para secar proteínas, una biomolécula inmovilizada puede requerir una técnica de secado que pueda secar tanto la molécula inmovilizada como la plataforma también, especialmente si esta última es un material sensible a la técnica de secado.

La plataforma de membrana generalmente se fabrica mediante polimerización in situ de monómeros de acrilato/acrilamida y reticulantes dentro de un sustrato de polímero fibroso no tejido para obtener un material poroso de gel reforzado. Por ejemplo, se fabricó una membrana que contenía epoxi usando monómeros de acrilato y acrilamida y reticulantes sobre un sustrato de polímero fibroso no tejido para obtener un material de gel poroso. La porosidad y la estructura del gel poroso de la membrana se ajustaron mediante un proceso de tratamiento térmico para producir las propiedades deseadas, como la permeabilidad y la capacidad de unión a proteínas.

- En algunas realizaciones, la membrana epoxi porosa tiene grupos epoxi activos y se puede injertar con ligandos de bioafinidad mediante una reacción de conjugación nucleofílica que utiliza grupos amino en la biomolécula. En algunas realizaciones, la membrana epoxi se conjugó con un bioligando a través de un proceso de dos etapas de acoplamiento de la biomolécula a través de una reacción de adición nucleofílica, seguido de una etapa de protección para reducir los grupos epoxi activos en la superficie. En algunas realizaciones, la membrana conjugada puede servir como plataforma cromatográfica para realizar la separación por bioafinidad de objetivos específicos, como anticuerpos monoclonales. Para tener un buen rendimiento de separación, la membrana conjugada debe tener una buena estructura porosa con una superficie elevada y buena permeabilidad, además de mantener la bioactividad del ligando inmovilizado.
- Secar la membrana conjugada puede aumentar la estabilidad del ligando, aumentar la vida útil del biopolímero, facilitar la manipulación del material y reducir el riesgo de contaminación. Se deben considerar dos componentes al secar los medios de bioafinidad: la estabilidad del ligando inmovilizado y la estabilidad del portador polimérico.
- Sin embargo, se descubrió que las propiedades de dicha estructura obtenida en estado seco cambian con el tiempo. Sin estar limitado por ninguna teoría, la sensibilidad del gel de membrana al proceso de secado puede estar relacionada con la estructura de poros del gel, que puede alterarse irreversiblemente durante los procesos de secado. En particular, secar el gel de membrana a partir de una fase humectante acuosa, que tiene una tensión superficial relativamente alta, puede exponer la estructura del gel a fuerzas de cizallamiento elevadas durante la eliminación del agua en la etapa de secado.
- Por ejemplo, el secado de la membrana de bioafinidad conjugada resulta desafiante ya que la funcionalidad y el rendimiento cromatográfico de la membrana cambian con el proceso de secado y continúan deteriorándose con el tiempo. Esto se ha observado en membranas que contienen grupos epoxi que han mostrado una estabilidad limitada cuando se secan a temperatura ambiente o a temperaturas más altas (40-50 °C). Además de la sensibilidad de la plataforma de la membrana, la susceptibilidad del ligando a las tensiones del proceso de secado no puede ignorarse y puede ser responsable de la pérdida de bioactividad.
- Sin limitarse a ninguna teoría, también se espera que el ligando pueda verse afectado por la eliminación de agua, lo que expone a la proteína a diversas fuerzas de interacción intra e intermoleculares, en las proximidades de la superficie de la membrana. Las fuerzas de interacción biomolécula-superficie pueden alterar la estructura espacial de la proteína, provocando su desnaturalización y pérdida de actividad.
- El secado en el punto crítico brinda la oportunidad de secar la membrana desde una fase de fluido supercrítico (por ejemplo, dióxido de carbono) en condiciones de tensión superficial muy baja que minimiza estas fuerzas sobre la estructura del gel de la membrana y, por lo tanto, mantiene las propiedades húmedas. Es decir, SCF proporciona un entorno de tensión superficial esencialmente nula para secar el material debido a las propiedades únicas del fluido en condiciones críticas, donde las fases gaseosa y líquida pueden ser indistinguibles.
- El dióxido de carbono es un buen candidato a fluido supercrítico para el secado en puntos críticos, ya que puede alcanzar un estado supercrítico en condiciones relativamente suaves, en comparación con otros líquidos o gases. Por ejemplo, el punto crítico del agua está a 374 °C y 228 bar, y estas condiciones pueden provocar cambios irreversibles en muchos materiales de interés. Es decir, el punto crítico del agua presenta un conjunto de condiciones más difíciles y extremas de alcanzar que pueden afectar al polímero y al ligando, no sólo físicamente sino posiblemente químicamente. Por el contrario, el punto crítico del dióxido de carbono está a 31.2 °C y 73.8 bar, que es mucho menos probable que alteren irreversiblemente las propiedades de la muestra y requieren controles y diseños de equipos menos estrictos. Además, el CO₂ No es tóxico y es rentable para procesos a gran escala.
- Sin embargo, debido a su inmiscibilidad con el agua, no es posible pasar de una fase acuosa directamente a una fase de secado de CO₂. Por lo tanto, el agua en el material de composite que se va a secar (por ejemplo, la membrana) debe intercambiarse primero con un disolvente orgánico polar (tal como un alcohol o una cetona) para desplazar el agua con el disolvente orgánico. Por lo tanto, el fluido de intercambio debe tener buena miscibilidad con agua para permitir el proceso de intercambio y ser miscible con CO₂ para permitir un intercambio final de la membrana en el fluido de secado CO₂. En algunas realizaciones, un obstáculo a superar es el efecto negativo esperado de exponer biomoléculas a estos disolventes orgánicos.
- En la etapa final, la temperatura de la cámara donde se encuentra el material de interés (membrana) y el CO₂ El fluido de secado está encerrado, aumenta más allá del punto crítico de temperatura y presión hasta la región supercrítica, después de lo cual tiene lugar la evaporación controlada reduciendo la presión y el secado se produce en ausencia de fuerzas de tensión superficial.
- Se sabe que algunas proteínas pueden ser estables en algunos disolventes orgánicos, siempre que el contenido de agua en el disolvente sea bajo (normalmente menos del 10-20 %). También se sabe que minimizar los cambios conformacionales durante un proceso de secado puede ayudar a estabilizar una proteína durante un proceso de secado. Por lo tanto, en algunas realizaciones, para tener un proceso de secado de CSF exitoso, el protocolo de intercambio debe incluir una etapa inicial de intercambio de tampón/sal para proporcionar suficientes iones (para

reducir las interacciones iónicas intramoléculas durante el secado de CSF), y usar estrictamente gradientes de disolvente orgánico que tiene bajo contenido de agua (<10 %).

En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos de secado en el punto crítico de un material de composite, que comprenden las etapas de:

- 5 a. proporcionar un material de composite que comprende:
- i. un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y
- 10 ii. un gel macroporoso reticulado, en el que el gel macroporoso reticulado comprende un polímero formado a partir de una reacción de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticulantes; el gel macroporoso reticulado está situado en los poros del miembro de soporte; y dichos macroporos del gel macroporoso reticulado son más pequeños que los poros del miembro de soporte;
- en el que el material de composite se humedece con una solución acuosa;
- b. intercambiar la solución acuosa con un disolvente orgánico polar, de manera que el material de composite se humedezca con el disolvente orgánico polar;
- 15 c. poner en contacto el material de composite con un fluido supercrítico a una temperatura y una presión superiores al punto crítico del fluido supercrítico, en el que las fases gaseosa y líquida son indistinguibles; y el disolvente orgánico polar es miscible con el fluido supercrítico; y
- d. reducir la presión;
- de este modo se seca el punto crítico del material de composite.

20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos de secado en el punto crítico de un material de composite, que comprenden las etapas de:

- a. proporcionar un material de composite que comprende:
- i. un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y
- 25 ii. un gel macroporoso reticulado, en el que el gel macroporoso reticulado comprende un polímero formado a partir de una reacción de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticulantes; el gel macroporoso reticulado comprende una pluralidad de ligandos que son moléculas biológicas o iones biológicos; el gel macroporoso reticulado está situado en los poros del miembro de soporte; y dichos macroporos del gel macroporoso reticulado son más pequeños que los poros del miembro de soporte;
- 30 en el que el material de composite se humedece con una solución acuosa;
- b. intercambiar la solución acuosa con un disolvente orgánico polar, de manera que el material de composite se humedezca con el disolvente orgánico polar;
- c. poner en contacto el material de composite con un fluido supercrítico a una temperatura y una presión superiores al punto crítico del fluido supercrítico, en el que las fases gaseosa y líquida son indistinguibles; y el disolvente orgánico polar es miscible con el fluido supercrítico; y
- 35 d. reducir la presión;
- de este modo se seca el punto crítico del material de composite.

40 En algunas realizaciones, el fluido supercrítico se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono, agua, metano, etano, propano, etileno, propileno, metanol, etanol, acetona y óxido nitroso. En algunas realizaciones, el fluido supercrítico no es agua. En algunas realizaciones, el fluido supercrítico se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono, metano, etano, propano, etileno, propileno, metanol, etanol, acetona y óxido nitroso. En algunas realizaciones, el fluido supercrítico es dióxido de carbono.

45 En algunas realizaciones, uno o más de los siguientes parámetros seleccionados del grupo que consiste en cantidad total de fluido supercrítico con respecto al volumen de muestra, número de ciclos de purga, temperatura durante el contacto con el fluido supercrítico, la tasa de intercambio con el fluido supercrítico, la temperatura Durante la etapa de evaporación, la tasa de calentamiento para aumentar la temperatura y la velocidad de reducción de presión se pueden variar en los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los parámetros que pueden variarse para afectar el proceso de secado incluyen: 1) la cantidad total de CO₂ líquido (o número de ciclos de purga) en relación con el volumen de muestra, 2) la temperatura de la cámara durante el intercambio de CO₂, la tasa de intercambio de CO₂ líquido, 3) la temperatura establecida para la etapa de secado (normalmente superior a T_c), 4) la tasa de

50

calentamiento a la que aumenta la temperatura de la cámara, y 5) la tasa de disminución de presión de CO₂ durante la etapa de evaporación.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico polar se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, amoníaco, t-butanol, n-propanol, etanol, metanol y ácido acético.

- 5 En algunas realizaciones, el miembro de soporte comprende un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en polisulfonas, polietersulfonas, polifenilenoóxidos, policarbonatos, poliésteres, celulosa y derivados de celulosa.

En algunas realizaciones, el material de composite es una membrana.

- 10 En algunas realizaciones, el material de composite está en contacto con una o más capas intercaladas. En algunas realizaciones, la una o más capas intercaladas se seleccionan del grupo que consiste en malla, polipropileno, polietileno y papel.

En algunas realizaciones, el gel reticulado es un hidrogel neutro, un hidrogel cargado, un gel de polielectrolito, un gel hidrófobo, un gel neutro o un gel que comprende grupos funcionales.

- 15 En ciertas realizaciones, los materiales de composite utilizados como membranas en la presente invención se describen en Patentes de EE. UU. Nos. 7,316,919; 8,206,958; 8,187,880; 8,211,682; 8,652,849; 8,192,971; 8,206,982; 8,367,809; 8,383,782; 8,133,840; 9,962,691; y 10,357,766; y números de serie de solicitudes de patente de EE. UU. 14/190,650, 16/055,786, y 16/516,500.

En algunas realizaciones, el gel macroporoso reticulado comprende macroporos que tienen un tamaño promedio de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 3000 nm.

- 20 En algunas realizaciones, los poros del miembro de soporte tienen un diámetro de poro promedio de aproximadamente 0.1 µm a aproximadamente 50 µm.

En algunas realizaciones, el gel reticulado comprende grupos funcionales reactivos colgantes. En algunas realizaciones, los grupos funcionales reactivos colgantes se seleccionan del grupo que consiste en aldehídos, aminas, dobles enlaces carbono-carbono, triples enlaces carbono-carbono, epóxidos, hidroxilos, tioles, anhídridos, azidas, halógenos reactivos, cloruros de ácido y una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, los grupos funcionales reactivos colgantes son epóxidos. En algunas realizaciones, uno o más monómeros que comprenden un grupo funcional reactivo colgante se seleccionan del grupo que consiste en metacrilato de glicidilo, acrilamidoxima, anhídrido acrílico, anhídrido azelaico, anhídrido maleico, hidrazida, cloruro de acrililo, metacrilato de 2-bromoetil y vinil metil cetona.

- 30 En algunas realizaciones, el gel reticulado comprende una pluralidad de ligandos. En algunas realizaciones, el gel reticulado comprende una pluralidad de ligandos que comprenden una funcionalidad. En algunas realizaciones, la funcionalidad se selecciona del grupo que consiste en catiónica, aniónica, hidrófoba, hidrófila, tiófila, donadora de enlaces de hidrógeno, receptora de enlaces de hidrógeno, donadora de enlaces pi-pi, receptora de enlaces pi-pi, quelante de metales, una molécula biológica, y un ion biológico.

- 35 En algunas realizaciones, la pluralidad de ligandos son moléculas biológicas o iones biológicos seleccionados del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células, γ-globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen tanto humano como animal, proteínas de origen recombinante u origen natural que incluyen polipéptidos de origen sintético o natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, antígenos, lectinas, proteínas de unión a inmunoglobulinas bacterianas, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobulina, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, Proteína A, Proteína G, Proteína L, Péptido H, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético o natural y ARN de origen sintético o natural. En algunas realizaciones, la pluralidad de ligandos son moléculas biológicas o iones biológicos seleccionados del grupo que consiste en γ-globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen tanto humano como animal, proteínas de origen recombinante o natural que incluyen polipéptidos de origen sintético u origen natural, anticuerpos monoclonales, proteínas de unión a inmunoglobulinas bacterianas, proteína de fusión recombinante, Proteína A, Proteína G y Proteína L. En algunas realizaciones, la pluralidad de ligandos son moléculas biológicas o iones biológicos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido, una proteína, una proteína recombinante, una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana, una proteína de fusión recombinante, Proteína A, Proteína G, Proteína L y Péptido H. En algunas realizaciones, la pluralidad de ligandos es Proteína A.

- 50 En algunas realizaciones, los materiales de composite (por ejemplo, membranas) comprenden polímeros que contienen diversos ligandos útiles para la cromatografía de afinidad. Por ejemplo, separación cromatográfica de biomoléculas (por ejemplo, proteínas). Por ejemplo, este enfoque se puede utilizar para introducir en los materiales de composite (por ejemplo, membrana) funcionalidades de intercambio iónico (por ejemplo, carboxilato, sulfonato, amonio cuaternario, amina), fracciones de interacción hidrófobas (tales como un grupo octilo mediante el uso de 1-octanotiol o 1-octeno) y biomoléculas para cromatografía de bioafinidad (como la cisteína-proteína A para la purificación de anticuerpos monoclonales).

- 5 En algunas realizaciones, los materiales de composite demuestran inestabilidad durante y después de los procesos de secado convencionales. En algunas realizaciones, el secado en el punto crítico permite la eliminación del agua sin dañar el material de composite. En algunas realizaciones, el secado en el punto crítico permite la eliminación de agua sin dañar la membrana que comprende ligandos. En algunas realizaciones, la invención se refiere a métodos de secado en puntos críticos de materiales de composite de manera que los materiales de composite muestren propiedades equivalentes a los materiales de composite inicialmente mojados con agua.
- En algunas realizaciones, los métodos de secado en puntos críticos de materiales de composite mejoran el almacenamiento del material de composite, el ensamblaje de una membrana en el dispositivo final y el envío estable con una carga biológica reducida.
- 10 Ejemplificación
- Los siguientes ejemplos se proporcionan como ilustraciones. Se entenderá, sin embargo, que los detalles específicos proporcionados en cada ejemplo se han seleccionado con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la divulgación. Generalmente, los experimentos se realizaron en condiciones similares a menos que se indique lo contrario.
- 15 Ejemplo 1: materiales y métodos generales
- Productos químicos
- El dióxido de carbono licuado (grado médico 99.99 %) se obtuvo de PraxAir Canada Inc., el reactivo de alcohol anhidro (<0.005 % de agua) y el cloruro de calcio se obtuvieron de MilliporeSigma, y la solución tampón concentrada líquida de PBS 10X (Grow Cells) se adquirió de VWR.
- 20 Proteína
- La IgG humana, purificada por afinidad, se obtuvo de Innovative Research Inc. (Novi, MI, EE. UU.).
- Material de la membrana
- 25 Las membranas epoxi se fabricaron polimerizando monómeros de acrilato y/o acrilamida y reticulantes dentro de un material de malla de soporte en una reacción iniciada por UV. Se pueden producir varias membranas funcionales que contienen grupos de unión a proteínas (por ejemplo, intercambio iónico, interacción hidrófoba e interacción hidrófila) en una única etapa de polimerización introduciendo grupos polimerizables funcionales adecuados en la solución de polimerización en gel. Las membranas lavadas en húmedo también pueden someterse a una etapa de tratamiento térmico adicional para ajustar su rendimiento, estructura de poros final y permeabilidad.
- 30 Posteriormente, la membrana epoxi se conjugó con el ligando de proteína A mediante una reacción de adición nucleofílica en la que principalmente un grupo nucleofílico en la molécula del ligando (grupos amino o tiol) abre el anillo de oxirano y une covalentemente el bioligando al gel de la membrana.
- También se pueden conjugar otros ligandos para apuntar a otras biomoléculas o entidades como virus.
- En un protocolo de conjugación típico, se montó un disco de membrana (25 mm) en un soporte de acero inoxidable Natrix y luego se conectó a un instrumento de cromatografía AKTA, donde la membrana se equilibró con PBS y luego se extrajo la solución del ligando (Proteína A) en una solución tampón de fosfato fue pasada a través de la membrana bajo caudal(es) seleccionado(s) durante un período de tiempo apropiado. A esto le siguió una etapa de lavado con tampón, luego los grupos epoxi sin reaccionar de la membrana se pasivaron haciendo fluir una solución de extinción a través de la membrana, seguido de una etapa de lavado con tampón para eliminar la solución de extinción residual.
- Pruebas de rendimiento de membranas
- 40 Se evaluaron las membranas por su permeabilidad (tanto en el estado pre como posconjugado cuando los ligandos se conjugaban con membranas que contenían grupos reactivos colgantes) y por su capacidad de unión a una biomolécula objetivo específica.
- Para la permeabilidad, la prueba de flujo se llevó a cabo a una presión definida (100 kPa), normalmente se utiliza agua como fluido de prueba, para estimar la cantidad de fluido que pasa a través del área superficial específica de la membrana, y los resultados finales de permeabilidad se expresaron en kg/m²h.
- 45 La capacidad de unión a membrana se midió determinando la cantidad de proteína seleccionada capturada por una membrana de volumen de prueba en condiciones de flujo definidas (es decir, capacidad de unión dinámica, dBC) y se expresó como mg de proteína unida/ml de membrana.
- Para la bioafinidad de la membrana, la capacidad de unión se midió al determinar la cantidad de proteína IgG capturada por el volumen de membrana activa al 10 % de la absorbancia de avance, pasando la solución de prueba del
- 50

compuesto objetivo en un tampón (IgG en este caso). La capacidad de unión dinámica (dBC) se expresa como mg del compuesto objetivo/ml de volumen de membrana.

Formato de membrana

Formato A

5 Las muestras de membrana generalmente se intercambiaron con disolvente y se secaron en el punto crítico en formato de rollo. Las tiras de membrana se colocaron en capas con tiras de malla de polipropileno de ancho similar y longitud ligeramente más larga (2-3 cm más larga) y luego se enrollaron (Fig. 1A). Los rollos se fabricaron en dimensiones que encajan en el soporte de muestra de la cámara de secado de punto crítico (CPD) (principalmente 4 cm de ancho y OD de ~ 4.5 cm) o, en algunos casos, caben directamente en la propia cámara del instrumento (ancho <5.5 cm y OD por debajo de 5.8 cm).

Formato A'

15 Las muestras de membrana se intercambiaron y secaron en formato de rollo hecho a mano. Se colocaron capas de tiras de membrana de proteína A (~ 4x36 cm) con mallas de PP de ancho similar y tiras ligeramente más largas (2-3 cm más largas) y luego se enrollaron (Fig. 1A). Las mallas se utilizaron para mejorar el proceso de intercambio y la coherencia del proceso. Los rollos se fabricaron en dimensiones que se ajustan al soporte del instrumento (principalmente 4 cm de ancho y OD de ~ 4.5 cm) o, en algunos casos, caben directamente en la propia cámara del instrumento (ancho <5.5 cm y OD inferior a 5.8 cm). Se usó un alambre para mantener unido el rollo intercalado durante el proceso de intercambio, que se llevó a cabo en un vaso de precipitados de 200 ml, luego se retiró justo antes de colocar el rollo en el soporte (o la cámara para la configuración del rollo más grande).

20 Formato B

25 Las muestras de membrana se secaron en el punto crítico como una pila intercambiable de membrana y discos de criba del mismo diámetro. Después de intercambiarlos completamente en un recipiente separado con el volumen de solución apropiado en cada etapa de acuerdo con el protocolo, los discos de membrana (25 mm) se apilaron en un bloque de muestra modificado (con un diámetro interior de 25 mm) con discos de malla del mismo diámetro de forma intercambiable, como se muestra en la Fig. 1B. Los discos de criba sirven como separadores para promover una mejor mezcla y accesibilidad durante la etapa de intercambio de solventes, así como el proceso de secado CPD en el que se intercambia alcohol con CO₂ es crucial para un secado exitoso. La pila se empapó brevemente en una nueva cantidad de alcohol anhidro antes de montarla en la cámara de intercambio del instrumento CPD.

Agua/Protocolo de intercambio de etanol

30 La presión y temperatura críticas del dióxido de carbono son 73.8 bar y 31.2 °C, respectivamente. Estas condiciones suaves para alcanzar el estado de fluido supercrítico hacen que el dióxido de carbono sea una opción adecuada para realizar el secado en puntos críticos y al mismo tiempo preservar las estructuras frágiles durante el proceso. Sin embargo, la mala miscibilidad del agua en CO₂ hace necesario intercambiar el agua con etanol, una mayor cantidad de CO₂ Fase líquida intermedia miscible que se puede reemplazar fácilmente con dióxido de carbono líquido antes del proceso de secado.

35 Generalmente se transfirió un rollo de membrana al fluido de intercambio de etanol a través de un gradiente de agua y etanol para finalmente reemplazar la fase acuosa en la membrana con alcohol anhidro que posee un contenido de agua muy bajo. Se examinaron varios protocolos que tienen diferente número de pasos, contenido de alcohol variable y tiempo(s) de residencia. Principalmente se examinaron dos protocolos: Protocolo A con cinco pasos cortos con disminución gradual del contenido de agua (Tabla 1) y protocolo B con ocho pasos (Tabla 2).

Tabla 1. Protocolo de intercambio de disolventes A

Etapa	% de solución alcohólica	Tiempo de remojo (min)
1	30	10
2	70	10
3	90	10
4	100	10
5	100	10

Tabla 2. Protocolo de intercambio de disolventes B

Etapa	% de solución alcohólica	Tiempo de remojo (min)
1	30	10
2	70	10
3	70	10
4	90	10
5	90	10
6	100	10
7	100	10
8	100	10

A pesar del CO₂ al ser la opción más adecuada para el proceso CPD, su escasa miscibilidad con agua hace necesario sustituir la fase acuosa (tampón en este caso) por alcohol, una fase líquida más miscible que puede sustituirse fácilmente por dióxido de carbono líquido. Normalmente, el protocolo de intercambio para CPD implica intercambiar al sujeto en una solución de gradiente ascendente de alcohol en agua, terminando con un remojo/intercambio con alcohol anhidro para eliminar toda el agua antes de pasar a la etapa SCF y eventualmente evaporar el CO₂ reduciendo la presión para realizar la transición de fase supercrítica a fase gaseosa.

Sin embargo, debido a que la forma conjugada tiene un ligando unido a la membrana, el protocolo de intercambio se modificó para minimizar o mitigar los efectos negativos esperados de la exposición de la molécula del ligando a soluciones orgánicas. En primer lugar, la etapa inicial del protocolo de intercambio está diseñado para promover el enriquecimiento de la membrana y el ligando con contraiones mediante la realización de un remojo prolongado en una solución tampón. En segundo lugar, en lugar de hacer la transición de la membrana gradualmente a la fase de alcohol anhidro, la membrana pasó de una fase 100 % acuosa directamente a una fase con un contenido de alcohol del 90 % para evitar exponer la proteína a mezclas de alcohol con alto contenido de agua que pueden promover la desnaturalización. Finalmente, los tiempos de espera del intercambio se limitaron para evitar una exposición prolongada a la(s) solución(es) de alcohol.

Se examinaron varios protocolos con diferentes pasos y soluciones de alcohol variables y se detallarán en la sección de ejemplos. Para demostrar la importancia del protocolo de intercambio modificado, también se probó un protocolo típico que se usó en CPD de membrana epoxi (Protocolo C - Tabla 3; Fig. 2) en membrana conjugada con proteína A, como se detallará en el siguiente ejemplo.

Como se describió anteriormente, los discos de 25 mm se intercambiaron en un recipiente separado con la solución/volumen apropiado de acuerdo con el protocolo de intercambio especificado. Cuando finalizaron las etapas de intercambio, los cupones de membrana se apilaron con separadores de malla y todo el soporte se colocó en un vaso de precipitados de 200 ml con una solución fresca de alcohol anhidro y finalmente se transfirió a la cámara del instrumento.

Secado en punto crítico

El proceso de secado en punto crítico (CPD) se llevó a cabo utilizando un Leica EM CPD300 equipado con un tanque de dióxido de carbono líquido que tiene un tubo sifón para descarga de CO₂ líquido (~55 bar) y una botella separadora para recoger el etanol extraído de la mezcla de CO₂/alcohol de salida. En un funcionamiento típico en modo automático, el rollo de membrana se colocó en el soporte cilíndrico dentro de la cámara y se añadió una solución de etanol anhidro hasta que la muestra estuvo cubierta en su mayor parte con etanol, luego se apretó la tapa para sellar la cámara. Alternativamente, la cámara podría enfriarse primero hasta la temperatura establecida y luego cargarse el rollo de membrana como se describió anteriormente.

El programa del instrumento inició el proceso automáticamente enfriando la cámara a la temperatura de llenado designada (10 o 15 °C), luego alimentando el CO₂ líquido para llenar la cámara. Después de un período de retraso predefinido, que se estableció para permitir la mezcla inicial de alcohol con dióxido de carbono líquido, el proceso de purga de alcohol comienza inyectando CO₂ líquido durante múltiples ciclos (12-99 ciclos) donde el CO₂ fresco reemplaza una porción de la mezcla de solución en la cámara en cada ciclo y de manera continua, manteniendo la presión en la cámara dentro de un cierto rango (manteniendo CO₂ en estado líquido). Además de configurar el número de ciclos de intercambio, también es posible configurar la velocidad a la que CO₂ se alimenta a través de la cámara.

Cuando se completó el proceso de purga, el instrumento cambió a una etapa de calentamiento donde la temperatura de la cámara aumentó más allá de la temperatura crítica (34-36 °C) y la presión se ajustó por encima de la presión crítica (> 74 bar), por lo que la membrana ahora se sumergió en CO₂ supercrítico líquido. En la etapa final, se llevó a

cabo el proceso de evaporación liberando el CO₂ lentamente y reduciendo la presión manteniendo la temperatura, lo que permitió la transición de la fase supercrítica a la fase gaseosa en ausencia de fuerzas de tensión superficial significativas. El proceso finalizó llevando la presión final a 1 bar a la que se retiraría la membrana seca de la cámara. El instrumento permite cierto control sobre la etapa de calentamiento/evaporación ya que la velocidad se puede configurar en tres niveles diferentes.

Se pueden variar varios parámetros para afectar el proceso de secado, entre ellos: 1) la cantidad total de CO₂ líquido (o número de ciclos de purga) en relación con el volumen de muestra, 2) la temperatura de la cámara durante el intercambio de CO₂, la tasa de intercambio de CO₂ líquido, 3) la temperatura establecida para la etapa de secado (normalmente superior a T_c), 4) la tasa de calentamiento a la que aumenta la temperatura de la cámara, y 5) la tasa de disminución de presión de CO₂ durante la etapa de evaporación. Sin implicar limitaciones o restricciones sobre ninguno de los parámetros del proceso CPD, solo se exploraron protocolos seleccionados, únicamente para demostrar el concepto de utilizar un proceso CPD para obtener una membrana seca estable en almacenamiento.

Medidas del tamaño de los poros

El tamaño de los poros de la membrana (diámetro) se midió usando 3G Porometer, un porómetro de flujo capilar (Quantochrome Instruments, Boynton Beach, FL), operado por el software 3GWin (V2.2). Se empapó un pequeño disco de membrana seca (1.8 cm de diámetro) en líquido humectante Porofil (Quantochrome Corp.), tensión superficial = 16 dinas/cm durante 10 minutos, luego se apretó suavemente entre dos discos de papel de filtro previamente humedecidos (Whatman 5-70 mm) para eliminar el exceso de solución, y el espesor de la membrana humedecida se determinó usando un micrómetro. El disco de membrana se colocó sobre un disco de soporte de malla de acero inoxidable dentro del soporte designado, con la membrana hacia arriba. Luego se colocó suavemente la cubierta metálica sobre el soporte y se cerró, luego se llevó a cabo la prueba dentro del rango de presión de entre 0 y 200 psi.

Ejemplo 2: Comparación del secado en el punto crítico de membranas que contienen epoxi con otros métodos de secado y su efecto sobre el rendimiento durante el almacenamiento

Se secaron varios lotes de membranas epoxi que tenían permeabilidades similares y sus formas derivadas de bioligando que tenían capacidades de unión a proteínas comparables mediante un proceso de secado de punto crítico de dos pasos. En la primera etapa, las membranas en formato de rollo se sometieron a un proceso de intercambio de agua/etanol, donde se colocó el rollo de membrana en el disolvente de intercambio con cierto contenido de alcohol durante un tiempo especificado, luego el reactivo fue decantado y se agregó una cantidad especificada de la solución de alcohol fresco de la siguiente etapa, según se describe en el protocolo de intercambio B (Tabla 2). En la siguiente etapa, el rollo de membrana húmeda con etanol se colocó en la cámara del instrumento de secado del punto crítico (Leica CPD300) y se sometió a un proceso de purga para reemplazar el etanol con CO₂ líquido, seguido de transferir las condiciones de la cámara de secado al estado supercrítico (34 °C y 79 bar), y finalmente liberar la presión para evaporar el CO₂ fluido supercrítico.

Para ilustrar el impacto del proceso CPD en la estabilidad en comparación con otros métodos, se secó una membrana que contenía epoxi en un horno (50 °C - 15 min) y en otro experimento se empapó en una solución de glicerina al 50 % durante 30 min y luego se secó en el horno (50 °C - 15 min). Los resultados (Fig. 3A y Fig. 3B) demuestran la eficacia del método CPD para preservar el rendimiento de la membrana húmeda, en comparación con los métodos de secado en horno (con o sin estabilizador de glicerina). Hubo una pequeña caída inicial en la capacidad de unión (5-10 %) de la membrana seca del punto crítico, en comparación con la membrana húmeda (Fig. 3B). Sin embargo, las características de la membrana se mantuvieron esencialmente sin cambios durante el siguiente período de prueba de almacenamiento.

Las pruebas de almacenamiento a largo plazo, como se muestra en las Fig. 4A - 4D, demostraron que la permeabilidad (flujo) de la membrana seca (forma epoxi) en el punto crítico no cambió significativamente durante el período de prueba de 90 días examinado. Además, se demostró que las membranas secas en el punto crítico producían una membrana de proteína A derivada con un rendimiento similar (flujo y capacidad de unión) durante el mismo período de almacenamiento de 90 días. Esto es sorprendentemente diferente del comportamiento de la membrana secada en horno incluso durante un tiempo de almacenamiento corto.

Ejemplo 3: secado del punto crítico de membranas que contienen epoxi usando diferentes protocolos de intercambio

Para tener un proceso de secado exitoso con fluido supercrítico, se debe eliminar el agua y reemplazarla con etanol. Se espera que varios factores afecten el proceso de eliminación de agua: el contenido de agua en la solución de intercambio de etanol, el tiempo de intercambio, el número de etapas de intercambio, el material del cribado interhoja y, finalmente, la relación membrana-solución.

Se examinaron dos protocolos de intercambio diferentes, con gradiente de contenido de etanol. En el Protocolo A, la membrana se intercambia con soluciones de etanol para reemplazar el agua en la membrana con alcohol a través de un protocolo de intercambio de cinco etapas que utiliza soluciones de disminución gradual del contenido de agua para eventualmente alcanzar etapas de intercambio con reactivo de etanol anhidro. En el protocolo B, el proceso de intercambio se lleva a cabo en ocho etapas de intercambio minucioso para reemplazar el agua en la membrana con etanol. Los dos protocolos A y B se describen en la Tabla 1 y la Tabla 2, respectivamente.

Los resultados, como se muestran en las figuras 5A - 5D, revelan que cuando se extrajo el agua de las membranas (con una proporción fija de solución de membrana a etanol (1: 9.5) que se enumera en la Fig. 6, Tabla 4), ambos protocolos fueron eficientes para eliminar el agua y dieron como resultado membranas secas con propiedades consistentes durante una prueba de almacenamiento de 90 días.

- 5 Ejemplo 4: secado en el punto crítico de membranas que contienen epoxi que se intercambiaron con diferentes proporciones de membrana a solución de alcohol

10 Idealmente, es preferible minimizar la cantidad de alcohol necesaria para una extracción eficiente de agua, de modo que se puedan mitigar los costos asociados, el manejo y los problemas de desperdicio, especialmente para operaciones a gran escala. Para demostrar la flexibilidad del método CPD para secar membranas que contienen epoxi y al mismo tiempo preservar sus características de estado húmedo, se extrajeron varias membranas en formato de rollo siguiendo el protocolo B mientras se usaban diferentes proporciones de membrana a solución (Fig. 6, Tabla 4: CPD190404, CPD190409-1 y CPD190411-1).

15 Los resultados (Fig. 4A - 4D) indican que es posible preparar con éxito membranas para el secado en puntos críticos si se intercambian con soluciones de alcohol en gradiente y en proporciones de membrana a solución que pueden oscilar entre 5.6 y a tan solo de 3.3. De hecho, la proporción de 9.5 también se incluye en el rango efectivo ya que los resultados de los primeros experimentos (que exploraron los protocolos A y B, Fig. 5A - 5D) mostraron que el secado en el punto crítico efectivamente produjo membranas epóxicas estables al almacenamiento en esa proporción, que continúan teniendo las mismas características de rendimiento, mucho después de haber sido secados.

Ejemplo 5: secado en el punto crítico de varias membranas que contienen epoxi de diversas permeabilidades

20 Para cualquier aplicación específica, y particularmente para la bioseparación, adaptar la estructura, la porosidad y la permeabilidad de la membrana es una parte importante del desarrollo de una plataforma cromatográfica exitosa, y es importante demostrar la capacidad de la técnica de secado en puntos críticos para preservar el rendimiento del estado húmedo de varias membranas con diferentes características. En este ejemplo, se intercambiaron varias membranas que contienen epoxi de diferente permeabilidad y diferentes capacidades de unión (cuando están conjugadas) (protocolo B, Tabla 2) y se secaron en el punto crítico, utilizando los parámetros del proceso enumerados en la Tabla 5 (Fig. 7).

25 Nuevamente, los resultados (Fig. 8A - 8C) mostraron que el proceso de CPD conservó las propiedades de la membrana durante tiempos de almacenamiento prolongados (las capacidades de unión se midieron después de una etapa posterior de conjugación con Pro A). A pesar de las diferencias en sus características de rendimiento, todas las membranas secas en puntos críticos mantuvieron sus niveles iniciales de permeabilidad y capacidad de unión (después de la conjugación) durante el almacenamiento.

Ejemplo 6: Efecto del secado en el punto crítico sobre la porosidad de la membrana en comparación con otros métodos de secado

35 Para demostrar el efecto del método CPD sobre el tamaño y la distribución de los poros de la membrana, en comparación con el secado en horno, las muestras de membrana se secaron siguiendo varios métodos y se llevaron a cabo pruebas de porometría para seguir los cambios en el tamaño de los poros.

40 Las muestras de membrana epoxi se intercambiaron con etanol, usando el protocolo B (Tabla 2), luego las membranas se secaron usando los siguientes métodos: A) Secado en punto crítico; B) La membrana se empapó en agua y luego se secó en un horno a 50 °C durante 10 min; y finalmente C) La membrana se secó directamente con etanol en un horno a 50 °C durante 10 min.

45 Para la muestra de intercambio humedecida con etanol que sirve como referencia no seca, el cupón de membrana se intercambió en 5-10 ml de solución de Porofil en un vaso de precipitados durante aproximadamente 10-15 minutos para intercambiar el etanol con el fluido de prueba Porofil antes de la prueba. Para todas las demás muestras secas (A, B y C), se empapó un pequeño disco de cada membrana (18 mm de diámetro) en solución de Porofil durante al menos 10 minutos antes de la prueba (como se describe en la sección de método).

50 Los resultados muestran que la membrana de control humedecida con etanol tiene una distribución de tamaño de poro relativamente más estrecha, en comparación con todas las muestras secas. Sin embargo, los cambios en el tamaño de los poros y la distribución del tamaño de los poros fueron mucho menos significativos para la muestra de membrana CPD en comparación con las muestras secadas en horno, ya sea de agua o etanol (Fig. 9A - 9D). La diferencia observada en las características del tamaño de los poros de la membrana generalmente se correlaciona con las características de rendimiento de la membrana, es decir, tamaños de poro más pequeños se correlacionan con un flujo de membrana más bajo y una mayor capacidad de unión de la forma conjugada de proteína A (Fig. 10A y 10B).

Ejemplo 7: Área de superficie de una membrana epóxica secada en el punto crítico en comparación con el secado en horno

El área de superficie de cualquier membrana cumple una función importante a la hora de determinar su grado de interacción con las moléculas objetivo en la fase móvil, ya que la mayoría de los procesos de adsorción, especialmente en la bioseparación, tienen lugar en la interfaz. Una mayor superficie accesible en general significa una mayor capacidad de unión donde las posibilidades de que las biomoléculas interactúen con superficies funcionales, ya sea a través de interacciones iónicas, hidrofóbicas o de bioafinidad, aumentan proporcionalmente con el aumento del área de superficie.

En este ejemplo, se analizó el área de superficie total de varias muestras de membranas que contienen epoxi que se secaron utilizando el método de secado de punto crítico mediante la prueba BET. Además, también se examinó una muestra secada en horno para comparar el área de superficie de ambos tipos de membranas y el efecto del proceso de secado.

Las áreas de superficie (Fig. 11) de varias membranas de CPD fueron sustancialmente mayores que las de la muestra secada en horno, con áreas de superficie de membrana de CPD que oscilaron entre 22 y 25 m²/g, en comparación con sólo 4.3 m²/g para la membrana secada al horno. Esto demuestra que el proceso CPD produce una superficie total significativamente mayor que el secado en horno, lo que muy probablemente da como resultado una capacidad de unión a proteínas significativamente mayor (un proceso de superficie limitada). Presumiblemente, el colapso del gel con un simple secado en horno reduce significativamente la superficie total de la membrana y la capacidad de unión relacionada.

Secado en punto crítico (de CO₂ líquido) ha demostrado ser un proceso adecuado para secar membranas con el fin de preservar sus propiedades en estado húmedo y mantener las propiedades de la membrana durante largos tiempos de almacenamiento. Si bien la permeabilidad y la capacidad de unión de la forma conjugada de tales membranas cambian drásticamente cuando se secan con agua o etanol, incluso a temperaturas relativamente suaves, sus contrapartes que se secan usando un secado de punto crítico poseían permeabilidades y capacidades de unión similares a las de su forma húmeda. Se demostró a través de varios ejemplos que la técnica de secado de punto crítico puede reducir el efecto de secado sobre el tamaño de los poros del gel de la membrana y dar como resultado membranas con una alta área superficial, en comparación con otros métodos.

Ejemplo 8: Secado en el punto crítico de la membrana de proteína A en comparación con el secado normal

En este ejemplo, se utilizó el método CPD típico para secar una membrana conjugada con proteína A y los materiales resultantes se compararon con otros métodos de secado para membranas de proteína A (secado en horno a 40 °C durante 20 min).

La membrana de proteína A se preparó conjugando el ligando de proteína A con membrana(s) que contienen epoxi (en formato de disco), siguiendo el método de conjugación descrito en el Ejemplo 1, sección Material de la membrana. Los cupones de membrana se probaron antes del secado para determinar su capacidad de unión y su flujo para establecer una línea base sin secar.

En la segunda etapa, los discos de membrana se intercambiaron utilizando el protocolo C, un sistema de intercambio de gradiente típico que utiliza soluciones de alcohol, como se describe en la Tabla 3 (Fig. 2). En la tercera etapa, los discos de membrana se cargaron en el soporte utilizando discos de cribado del mismo diámetro que los separadores, para promover una mejor eficiencia de mezcla e intercambio, luego el soporte con los discos de membrana/pila de cribas se cargó en el instrumento CPD y se procedió al proceso de CPD como se describe en la sección experimental (Fig. 12; Tabla 6).

Para demostrar el contraste entre un enfoque de CPD y el método de secado típico en la membrana de Proteína A y el efecto de ambos procesos sobre la estabilidad de la membrana, se secaron muestras adicionales de la membrana de Proteína A en el horno a 40 °C durante 20 minutos. Se examinaron ambos materiales (secados en punto crítico y secados en horno) y se determinaron y compararon su capacidad de unión (dBC) y permeabilidad (flujo).

Los resultados (Fig. 13A y 13B) muestran claramente cómo el método CPD conservó la permeabilidad de la membrana ya que el flujo de la membrana mostró solo cambios menores, mientras que el flujo de la muestra secada en horno tiene un aumento notable durante 1 día después del secado. Por otro lado, los resultados también muestran la pérdida de capacidad de unión de la membrana de bioafinidad, lo que sugiere que si bien el protocolo de intercambio típico con solo gradiente de alcohol no afectó la estructura de la plataforma de la membrana, sí afectó negativamente al ligando y provocó una pérdida de bioactividad ya que el dBC de la membrana disminuyó significativamente.

Ejemplo 9: secado del punto crítico de la membrana de proteína A usando protocolos de intercambio de tampón/alcohol

En este ejemplo, la membrana de bioafinidad se secó usando un protocolo de intercambio modificado que incluía una larga etapa de remojo con una solución tampón con el objetivo de proporcionar contraiones a la proteína para aumentar la estabilidad de la proteína cuando se expone a las fases orgánicas (tanto la solución de alcohol como el CO₂ líquido), y la alta presión durante el proceso CPD. Se desarrollaron dos protocolos, a saber, Awb3 y Awb7, donde la primera etapa de ambos protocolos es un remojo relativamente largo de la membrana en una solución tampón con alto contenido de sal (5X y 10X de PBS, respectivamente), como se describe en la Tabla 3 (Fig. 2).

Además de la etapa de remojo en tampón, los protocolos desarrollados evitan exponer el ligando a soluciones orgánicas que tienen una cantidad relativamente grande de agua, ya que las mezclas intermedias de agua/soluciones orgánicas pueden aumentar el riesgo de desnaturalización del ligando y la consiguiente pérdida de bioactividad. Por lo tanto, la etapa de tampón en ambos protocolos fue seguido por fuertes aumentos en el contenido de fluido orgánico del 0 % al 90 % en las dos etapas siguientes. En general, las proteínas pueden ser más estables en soluciones orgánicas con bajo contenido de agua. El CPD procede como se describió anteriormente (Fig. 12; Tabla 6).

Los resultados (Fig. 14A y 14B) demostraron que ambos protocolos de intercambio fueron capaces de producir una membrana de CPD con propiedades comparables a las de la membrana húmeda, especialmente capacidad de unión. Este es un contraste obvio con el Protocolo C donde el dBC de la membrana seca ha disminuido significativamente.

Además, se examinó la estabilidad de la membrana de proteína A de CPD intercambiada con el protocolo AwB7 probando el rendimiento de la membrana después del almacenamiento en seco durante períodos seleccionados. Como se demuestra en la Fig. 15, la membrana seca tuvo un rendimiento generalmente estable durante el período de prueba.

Ejemplo 9A: secado del punto crítico de la membrana de proteína A usando el protocolo de intercambio de tampón/alcohol (AwB3)

El rollo de membrana intercalada se fabricó como se describe en la sección anterior, luego se intercambiò de una solución acuosa a una solución de etanol esencialmente pura utilizando el protocolo desarrollado AwB3 (Tabla 7) que incluye una etapa de intercambio de tampón al comienzo del proceso de intercambio. El rollo de membrana simplemente se colocó en la cantidad designada de solución en un vaso de precipitados de 200 ml y luego se intercambiò durante el tiempo designado con agitación cada 2-3 minutos. Al final de cada etapa, se decantó la solución y se añadió una nueva cantidad de solución, siguiendo la composición descrita en la tabla. Al final del proceso de intercambio, el rollo de membrana se transfirió a la cámara preenfriada del instrumento CPD y el proceso prosiguió siguiendo el programa designado en modo automático, con parámetros clave predefinidos, como se muestra en la (Tabla 8).

Tabla 7. Protocolo de intercambio de alcohol AwB3

Etapa	Disolvente	Disolvente %	Cosolvente o tampón	% cosolvente	Membrana Vol. (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	0	PBS 5X	100	30.2	4.6	20
2		90	H ₂ O	10	30.2	4.6	10
3		90	H ₂ O	10	30.2	4.6	10
4		100	-	0	30.2	4.6	10
5		100	-	0	30.2	4.6	10

Tabla 8. Parámetros clave de ejecución del CPD y volumen de extracción de alcohol de la membrana relacionado

Programa CPD	Agitador	Entrada CO2	Intercambio CO2	Salida CO2	Temperatura de Enfriamiento	Temperatura de calentamiento
--------------	----------	-------------	-----------------	------------	-----------------------------	------------------------------

	Velocidad %	Velocidad	Material de relleno %	Retardo (min)	velocidad	Ciclos	Calor	Velocidad		
10	100 %	Rápido	17	5	3	15	Medio	Rápido	10 °C	34 °C

Los resultados, como se muestran en las Fig. 19A y 19B, demuestran el éxito del proceso de secado en la preservación de la capacidad de unión de la membrana y la permeabilidad. También muestran claramente la estabilidad de la

membrana seca durante 90 días de almacenamiento, ya que la capacidad de unión y la permeabilidad de la membrana estaban dentro de la variabilidad habitual de la membrana y estaban cercanas al estado inicial de la membrana.

Ejemplo 9B - Secado del punto crítico de la membrana de Proteína A usando un protocolo de intercambio de tampón/alcohol modificado (AwB3-SV)

- 5 En este ejemplo, el rollo intercalado con membrana se intercambi6 usando un protocolo modificado (versi6n corta), como se describe en la Tabla 9 (AwB3-SV), donde la membrana se intercambi6 primero con tamp6n (5X PBS) y luego pas6 por un proceso de intercambio de alcohol limitado que se compone de 2 etapas, en lugar de las 4 etapas habituales en el protocolo AwB3 original.

Tabla 9. Protocolo de intercambio de alcohol limitado AwB3-SV

Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o Tamp6n	% de codisolvente	Membrana Vol. (ml)	Relaci6n soluci6n/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	0	PBS 5X	100	25.2	5.6	20
2		90	H ₂ O	10	25.2	5.6	10
3		100	-	0	25.2	5.6	10

- 10 Los resultados, como se muestran en las figuras 20A y 20B, mostraron que a pesar de utilizar un protocolo de intercambio limitado, a6n era posible producir una membrana secada con CP que fuera estable durante el almacenamiento en seco. Las membranas experimentaron cambios marginales en capacidad y flujo dentro de las primeras dos semanas y luego se estabilizaron durante el resto del per6odo de prueba.

- 15 Ejemplo 9C - Secado del punto cr6tico de la membrana de Prote6na A despu6s del almacenamiento en soluci6n biost6tica (alcohol al 20 % en agua)

- 20 Para ilustrar la flexibilidad de este enfoque de secado, se utiliz6 un protocolo que inclu6a un primer per6odo de almacenamiento en soluci6n(es) bioest6tica(s) antes de proceder a los procesos de intercambio de alcohol y secado de CP. En este caso, el protocolo se dividi6 en dos subprotocolos: 1) la etapa en el que la membrana se prepara y se transfiere a una soluci6n de almacenamiento biost6tica, y 2) la etapa de intercambio de alcohol donde se aplica un protocolo m6s corto y simplificado para intercambiar la soluci6n de almacenamiento por alcohol esencialmente puro en preparaci6n para el proceso de secado CP. Un protocolo, como se describe en (TP1-AWOB1, Tabla 10), muestra la etapa del proceso donde la membrana se transfiere e intercambia directamente en una soluci6n de alcohol al 20 %, luego se retira y se almacena en una bolsa de PP sellada durante 1 (o 7) d6as. En el protocolo alternativo (TP2-AWOB1, Tabla 11), el rollo de membrana se intercambia primero con una soluci6n tamp6n (5X PBS) para permitir una incorporaci6n suficiente de grupos i6nicos, despu6s de lo cual la membrana se intercambia en alcohol al 20 % (en agua) y luego se almacena durante un corto per6odo de tiempo (1 d6a para la primera serie o 7 d6as para la segunda serie). Al final de cada per6odo de almacenamiento del experimento, la membrana se somete a un protocolo de intercambio para reemplazar las soluciones de almacenamiento principalmente acuosas con alcohol en preparaci6n para el proceso de secado CP.

Tabla 10. Protocolo de intercambio con per6odo de almacenamiento bioest6tico TP1-AWOB1

Protocolo de preparaci6n para la transici6n: TP-1							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tamp6n	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relaci6n soluci6n/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	alcohol anhidro	20	H ₂ O	140	20.2	6.9	10
Periodo de almacenamiento: 1 o 7 d6as							
Protocolo de intercambio de alcohol-AWOB-1							

Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	alcohol anhidro	90	H ₂ O	10	20.2	6.9	10
3		100	-	0	20.2	6.9	10
4		100	-	0	20.2	6.9	10

Tabla 11. Protocolo de intercambio con intercambio de tampón y período de almacenamiento biostático TP2-AWOB1

Protocolo de preparación de transferencia: TP-2							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	0	PBS 5X	100	25.2	5.6	20
2		20	H ₂ O	80	25.2	5.6	10
Periodo de almacenamiento: 1 o 7 días							
Protocolo de intercambio de alcohol-AWOB-1							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	90	H ₂ O	10	25.2	5.6	10
3		100	-	0	25.2	5.6	10
4		100	-	0	25.2	5.6	10

5 Los resultados del primer conjunto (Fig. 21A y 21B), donde las membranas se almacenaron durante 1 día usando dos protocolos de intercambio de alcohol, muestran que el proceso de secado de CP produjo membranas que se parecen mucho a la forma húmeda original y que eran esencialmente estables con almacenamiento en seco durante el período de prueba.

10 Es de destacar que, aunque la presencia de la etapa de intercambio de tampón tiende a producir una membrana con un aumento marginal de la permeabilidad, la ausencia de la etapa de intercambio de tampón en el primer protocolo no afectó negativamente el resultado del proceso de secado. Esto puede deberse al corto tiempo de almacenamiento utilizado aquí (1 día) y a que el porcentaje de alcohol en la solución de intercambio era muy bajo (<20 %) o muy alto (90 y 100 %). Estas concentraciones se eligieron deliberadamente para evitar cambios estructurales en los ligandos, ya que las proteínas tienden a ser más estables en soluciones predominantemente acuosas o en disolventes orgánicos puros.

15 Por otro lado, los resultados del segundo conjunto (Fig. 22A y 22B), donde las membranas se almacenaron en una solución de alcohol al 20 % durante 7 días, muestran cómo la inclusión de la etapa de intercambio de tampón previo al almacenamiento en alcohol al 20 % (El protocolo TP2-AWOB 1) dio como resultado una mayor capacidad de unión a la membrana seca, pero no hubo un efecto claro sobre la permeabilidad de la membrana (medida por el flujo).

20 Ejemplo 9D - Secado del punto crítico de la membrana de Proteína A usando protocolos de intercambio con almacenamiento en alcohol al 16 % en tampón fosfato 20 mM (pH 7.5)

En este ejemplo, se usó otra solución de almacenamiento biostático (alcohol al 16 % en tampón fosfato 20 mM, pH 7.5) para almacenar las membranas durante 7 días antes del intercambio de alcohol y el secado de CP, como se muestra en la Tabla 12 que describe el protocolo TP3-AWOB1, y en Tabla 13 que describe el protocolo alternativo TP4-AWOB 1, que incluye una etapa de intercambio de buffer (5X PBS).

ES 2 977 748 T3

Tabla 12. Protocolo de intercambio con período de almacenamiento biostático en alcohol al 16 % en fosfato 20 mM (TP3-AWOB1)

Protocolo de preparación de transferencia: TP-3							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	16	Fosfato 20 mM, pH 7.5	140	20.2	6.9	10
Periodo de almacenamiento: 7 días							
Protocolo de intercambio de alcohol-AWOB-1							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	90	H ₂ O	10	25.2	5.6	10
3		100	-	0	25.2	5.6	10
4		100	-	0	25.2	5.6	10

5 Tabla 13. Protocolo de intercambio con intercambio de tampón y período de almacenamiento biostático en alcohol al 16 % en fosfato 20 mM (TP4-AWOB1)

Protocolo de preparación de transferencia: TP-4							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	0	PBS 5X	100	25.2	5.6	20
2		16	Fosfato 20 mM, pH 7.5	84	25.2	5.6	10
Periodo de almacenamiento: 7 días							
Protocolo de intercambio de alcohol-AWOB-1							
Etapa	Disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente	Volumen de membrana (ml)	Relación solución/membrana (ml/ml)	Tiempo de remojo (min)
1	Alcohol anhidro	90	H ₂ O	10	25.2	5.6	10
3		100	-	0	25.2	5.6	10
4		100	-	0	25.2	5.6	10

10 Los resultados, como se muestran en las figuras 23A y 23B, demostraron nuevamente la capacidad del proceso CPD para producir membranas secas que se asemejan a la forma húmeda. Si bien el impacto del proceso de secado fue mínimo, para ambos protocolos de intercambio, la presencia de la etapa de intercambio de tampón en el segundo protocolo tuvo un resultado ligeramente mejor para la capacidad de unión.

Ejemplo 10: secado del punto crítico de la membrana de proteína A usando un protocolo de intercambio de sal/alcohol

5 En este ejemplo, se demostró el uso de sal en lugar de tampón como fuente de iones, particularmente cationes multivalentes como el catión de calcio divalente, para modificar el sistema de intercambio de disolvente antes del proceso de CPD. Se sabe que los cationes de calcio divalentes impactan la estructura de las proteínas a través de enlaces de coordinación que sirven para estabilizar la estructura de las biomoléculas en solución. Además, la sal de calcio tiene buena solubilidad en solución de alcoholes anhidros, una ventaja que no tiene el tampón PBS. Esto permitiría un suministro continuo de cationes de calcio a la membrana durante las últimas etapas del protocolo de intercambio para garantizar que los cationes permanezcan en contacto con la membrana antes de pasar al proceso de CPD.

10 De manera similar al ejemplo anterior, los discos de membrana de proteína A se fabricaron funcionalizando membranas que contenían epoxi y luego se intercambiaron de manera similar pero siguiendo el protocolo AwB9 (Tabla 3; Fig. 2) que tiene una solución de cloruro de calcio (2 M) en agua en lugar de soluciones tampón de PBS y luego se secó en el punto crítico como se describió anteriormente utilizando los parámetros clave enumerados en la Tabla 6 (Fig. 12; Programa 8).

15 Los resultados (Fig. 16A y 16B) demostraron el efecto positivo de incorporar catión calcio en el protocolo de intercambio (AwB9) en comparación con el Protocolo C, particularmente en la capacidad de unión que permanece esencialmente sin cambios, y solo una caída inicial menor en el flujo de membrana. Las pruebas de almacenamiento en seco a largo plazo mostraron que el flujo de la membrana y la capacidad de unión fueron consistentes durante el período de prueba seleccionado (Fig. 17).

20 Al comparar los resultados del uso de un protocolo de intercambio con sal incorporada y un protocolo con tampón incorporado versus un protocolo de gradiente simple sin aditivos (Fig. 18), quedó claro que agregar sal y/o pasos de remojo en tampón mitigó el impacto del proceso de intercambio en capacidad de unión a la membrana y permeabilidad. Esto sugiere que la técnica CPD descrita aquí puede emplearse para tratar y secar eficazmente estructuras porosas delicadas y ligandos inmovilizados. El secado en puntos críticos, utilizando protocolos de intercambio modificados, ha demostrado ser un método exitoso para secar membranas de bioafinidad donde un bioligando se conjuga covalentemente con la superficie de la membrana. Los materiales secados en puntos críticos tienen un rendimiento cromatográfico similar a su forma presecada y su rendimiento y características fueron consistentes cuando se almacenaron secos durante períodos prolongados.

30 Fueron necesarias modificaciones de los protocolos de intercambio típicos para el proceso de CPD descrito: La incorporación de pasos de intercambio de sal y tampón en el protocolo permite que los medios toleren los efectos negativos resultantes de la exposición a los fluidos y condiciones del proceso de intercambio y secado.

35 Esta invención proporciona la oportunidad de utilizar el enfoque de CPD para manipular y secar una amplia gama de materiales que contienen un ligando sensible y una matriz o membrana robusta, o un bioligando robusto sobre una matriz o membrana lábil, o un bioligando sensible inmovilizado sobre una matriz o membrana lábil. En todos los casos, el proceso de CPD y los protocolos de intercambio relacionados deben modificarse para adaptarse a la sensibilidad del bioligando o de la plataforma en la que está inmovilizado el ligando.

REIVINDICACIONES

1. Un método de secado en punto crítico de un material de composite, que comprende las etapas de:
- a. proporcionar un material de composite que comprende:
- 5 i. un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y
- ii. un gel macroporoso reticulado, en el que el gel macroporoso reticulado comprende un polímero formado a partir de una reacción de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticulantes; el gel macroporoso reticulado está situado en los poros del miembro de soporte; y dichos macroporos del gel macroporoso reticulado son más pequeños que los poros del miembro de soporte;
- 10 en el que el material de composite se humedece con una solución acuosa;
- b. intercambiar la solución acuosa con un disolvente orgánico polar, de manera que el material de composite se humedezca con el disolvente orgánico polar;
- c. poner en contacto el material de composite con un fluido supercrítico a una temperatura y una presión superiores al punto crítico del fluido supercrítico, en la que las fases gaseosa y líquida son indistinguibles; y el disolvente orgánico polar es miscible con el fluido supercrítico; y
- 15 d. reducir la presión;
- de este modo se seca el punto crítico del material de composite.
2. El método de la reivindicación 1, en el que
- el gel macroporoso reticulado comprende una pluralidad de ligandos que son moléculas biológicas o iones biológicos.
- 20 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el fluido supercrítico se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono, agua, metano, etano, propano, etileno, propileno, metanol, etanol, acetona, y óxido nitroso.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el fluido supercrítico se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono, metano, etano, propano, etileno, propileno, metanol, etanol, acetona, y óxido nitroso.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el fluido supercrítico es dióxido de carbono.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que se ajustan uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en la cantidad total de fluido supercrítico en relación al volumen de la muestra, el número de ciclos de purga, la temperatura durante el contacto con el fluido supercrítico, la tasa de intercambio con el fluido supercrítico, la temperatura durante la etapa de evaporación, la tasa de calentamiento, y la tasa de reducción de la presión.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el disolvente orgánico polar se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, amoníaco, t-butanol, n-propanol, etanol, metanol, y ácido acético.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que las moléculas biológicas o los iones biológicos se seleccionan del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células, γ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen tanto humano como animal, proteínas de origen recombinante o natural, incluidos polipéptidos de origen sintético o natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, antígenos, lectinas, proteínas de unión a inmunoglobulinas bacterianas, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobulina, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, Proteína A, Proteína G, Proteína L, Péptido H, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético o natural, y ARN de origen sintético o natural;
- 35 opcionalmente en el que las moléculas biológicas o los iones biológicos son Proteína A.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el miembro de soporte comprende un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en polisulfonas, polietersulfonas, polifenilenoóxidos, policarbonatos, poliésteres, celulosa y derivados de celulosa.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el material de composite es una membrana.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el material de composite está en contacto con una o más capas intercaladas.
12. El método de la reivindicación 11, en el que una o más capas intercaladas se seleccionan del grupo que consiste en malla, polipropileno, polietileno y papel.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el gel reticulado es un hidrogel neutro, un hidrogel cargado, un gel de polielectrolito, un gel hidrófobo, un gel neutro, o un gel que comprende grupos funcionales.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el gel macroporoso reticulado comprende macroporos que tienen un tamaño promedio de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 3000 nm.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que los poros del miembro de soporte tienen un diámetro de poro promedio de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 50 μm .

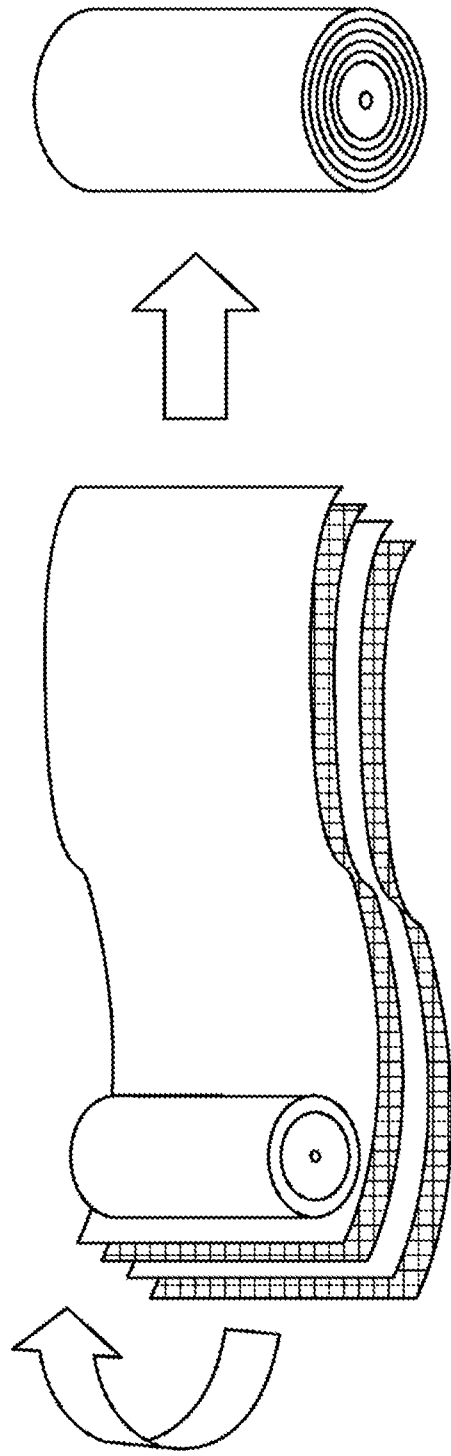


FIG. 1A

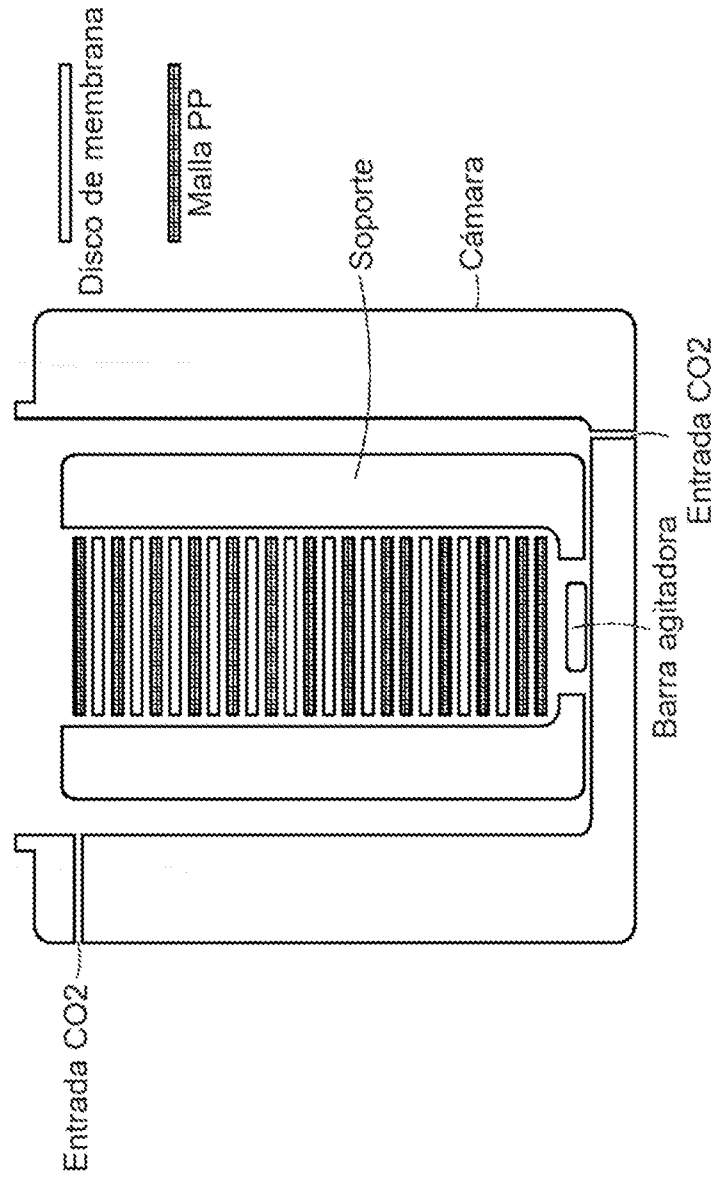


FIG. 1B

FIG. 2

Tabla 3. Protocolos de intercambio con componentes de alcohol, tampones, y sal

Protocolo de intercambio	Etapas	Tipo de disolvente	% de disolvente	Codisolvente o tampón	% de codisolvente o tampón	Disolvente (ml/disco)	Tiempo de remojo (min)
C	1	Alcohol anhidro (principalmente etanol)	30	H ₂ O	70	5	10
	2		70	H ₂ O	30	5	10
	3		90	H ₂ O	10	5	10
	4		100	-	0	5	10
	5		100	-	0	5	10
AwB3	1	Alcohol anhidro (principalmente etanol)	0	5X PBS	100	5	20
	2		90	H ₂ O	10	5	10
	3		90	H ₂ O	10	5	10
	4		100	-	0	5	10
	5		100	-	0	5	10
AwB7	1	Alcohol anhidro (principalmente etanol)	0	10X PBS	100	5	20
	2		90	H ₂ O	10	5	10
	3		90	H ₂ O	10	5	10
	4		100	-	0	5	10
	5		100	-	0	5	10
AwB9	1	Alcohol anhidro (principalmente etanol)	0	CaCl ₂ 2M en H ₂ O	100	5	20
	2		90	CaCl ₂ 2M en H ₂ O	10	5	10
	3		100	CaCl ₂ sólido 0.88 g	0	5	10
	4		100	-	0	5	10
	5		100	-	0	5	10

FIG. 3A

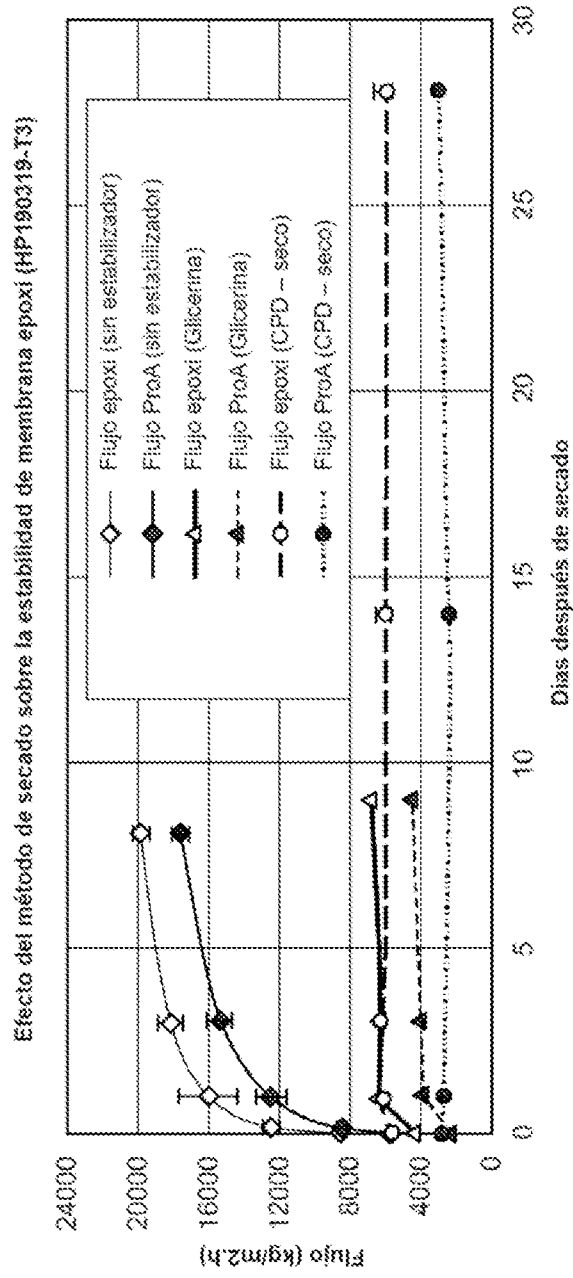


FIG. 3B

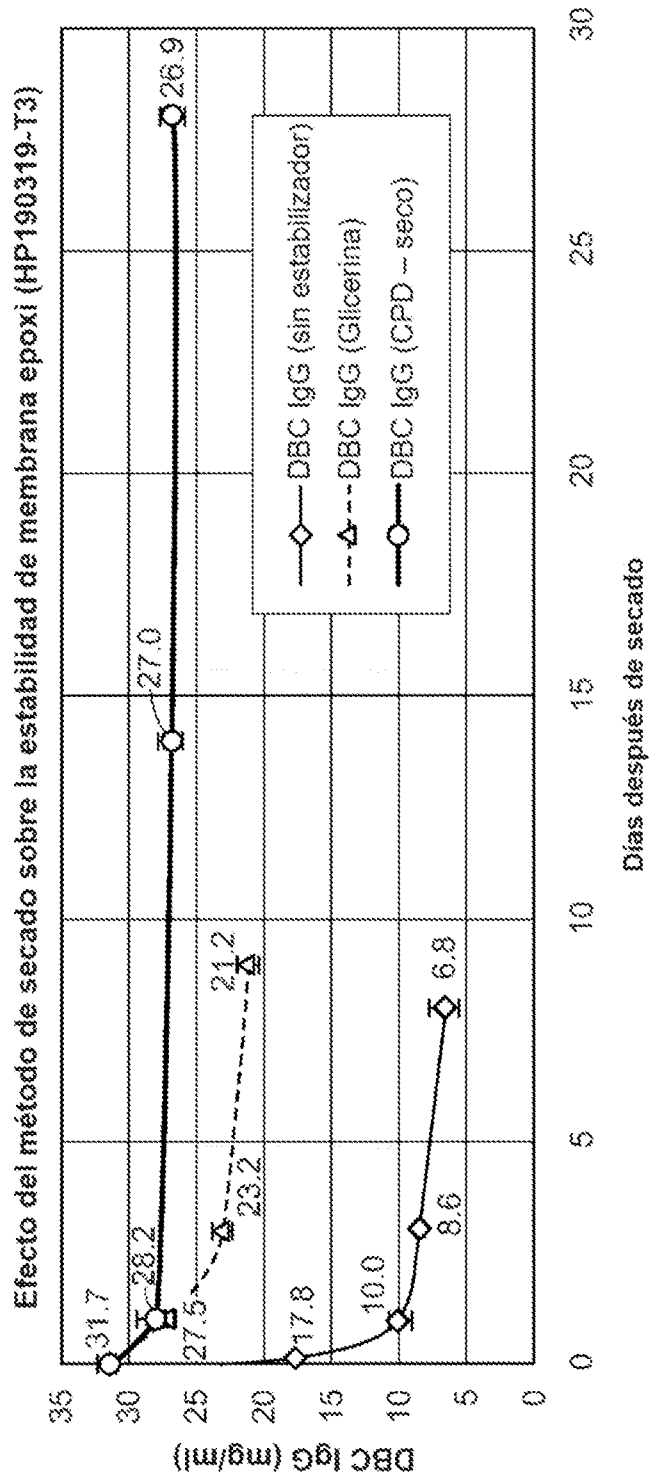


FIG. 4A

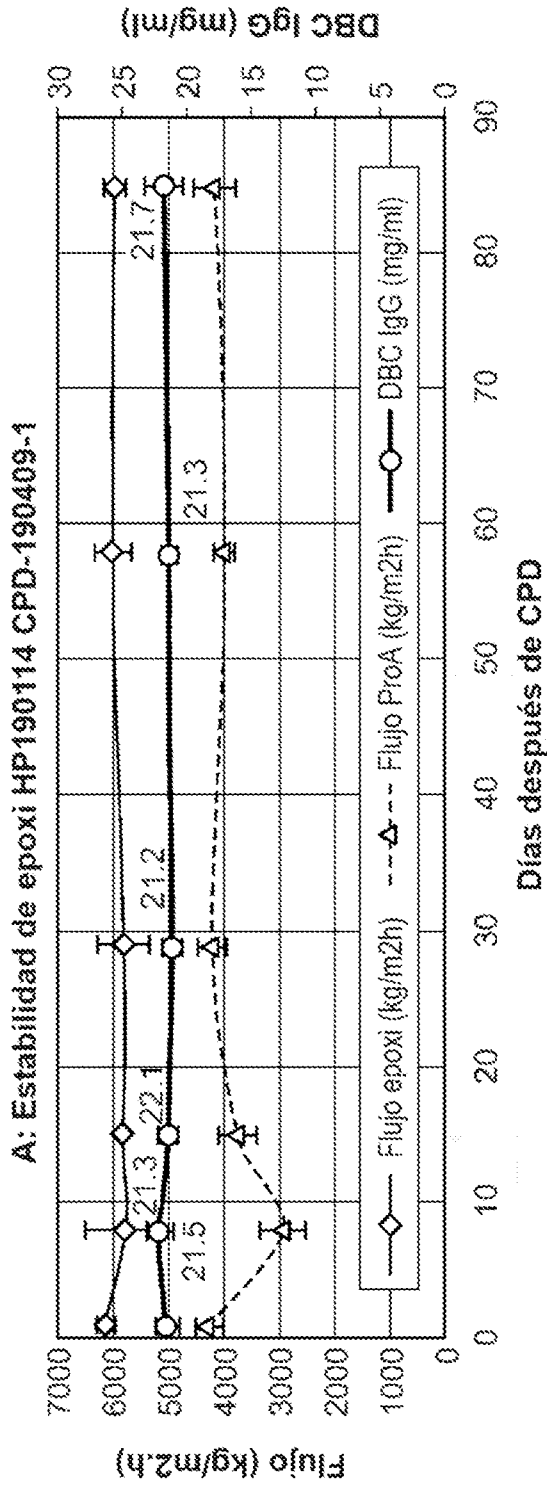


FIG. 4B

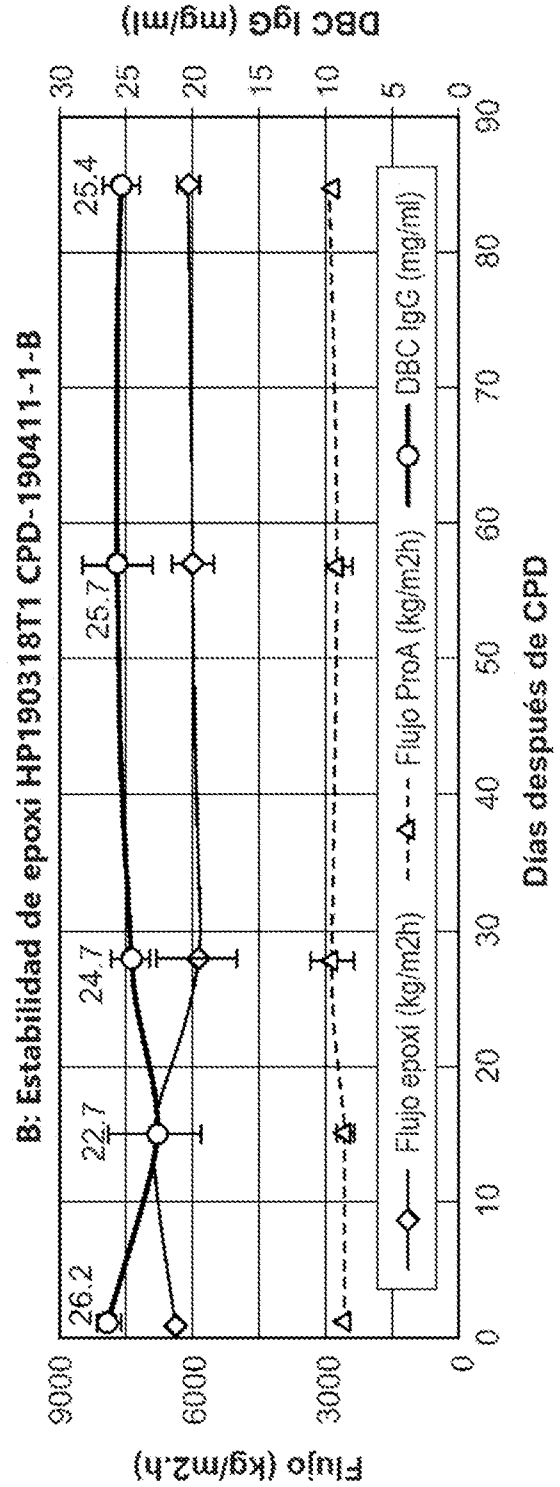


FIG. 4C

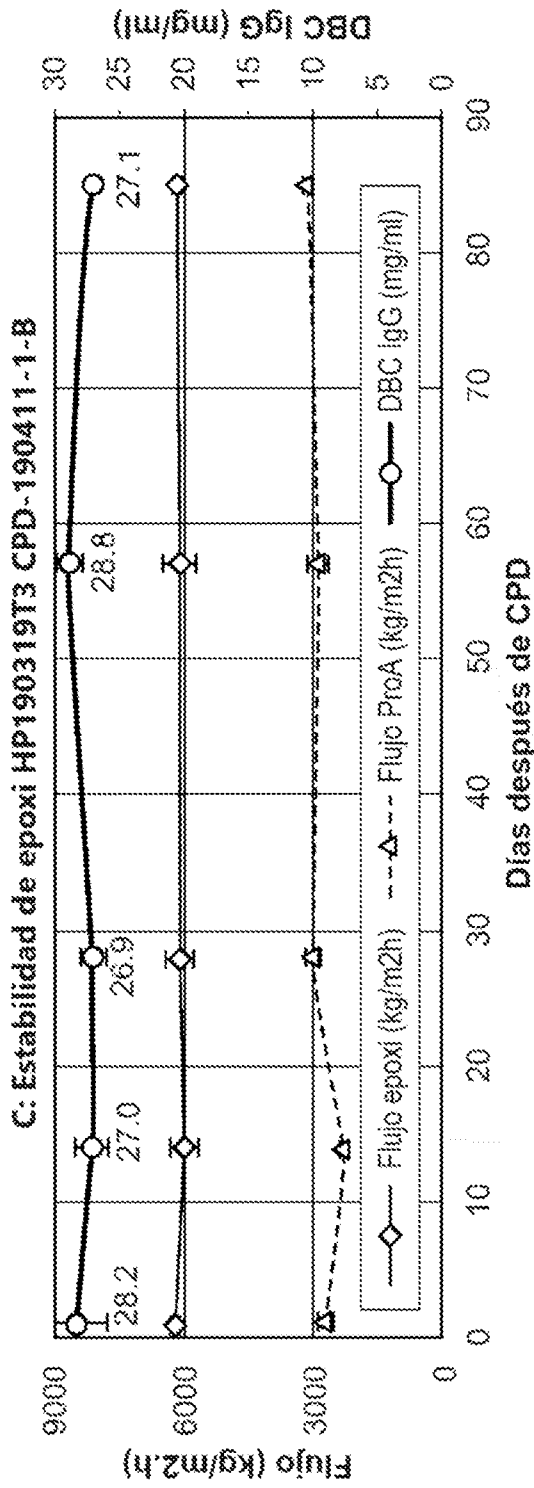


FIG. 4D

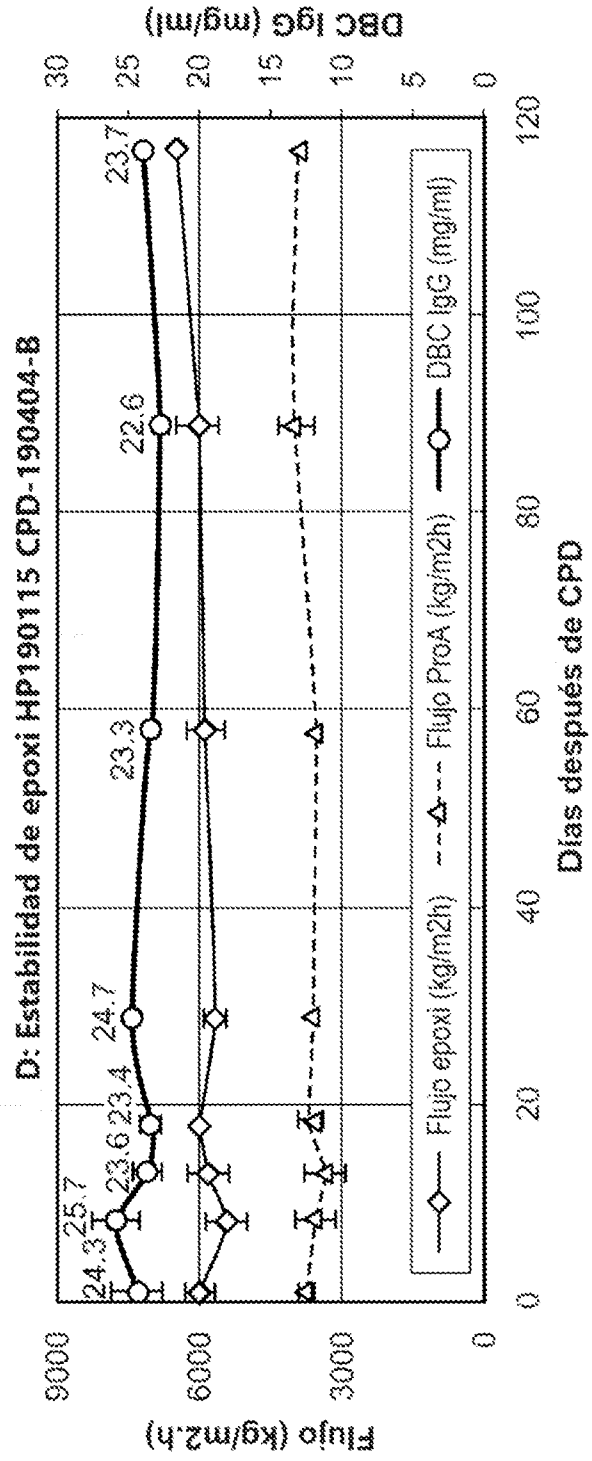


FIG. 5A

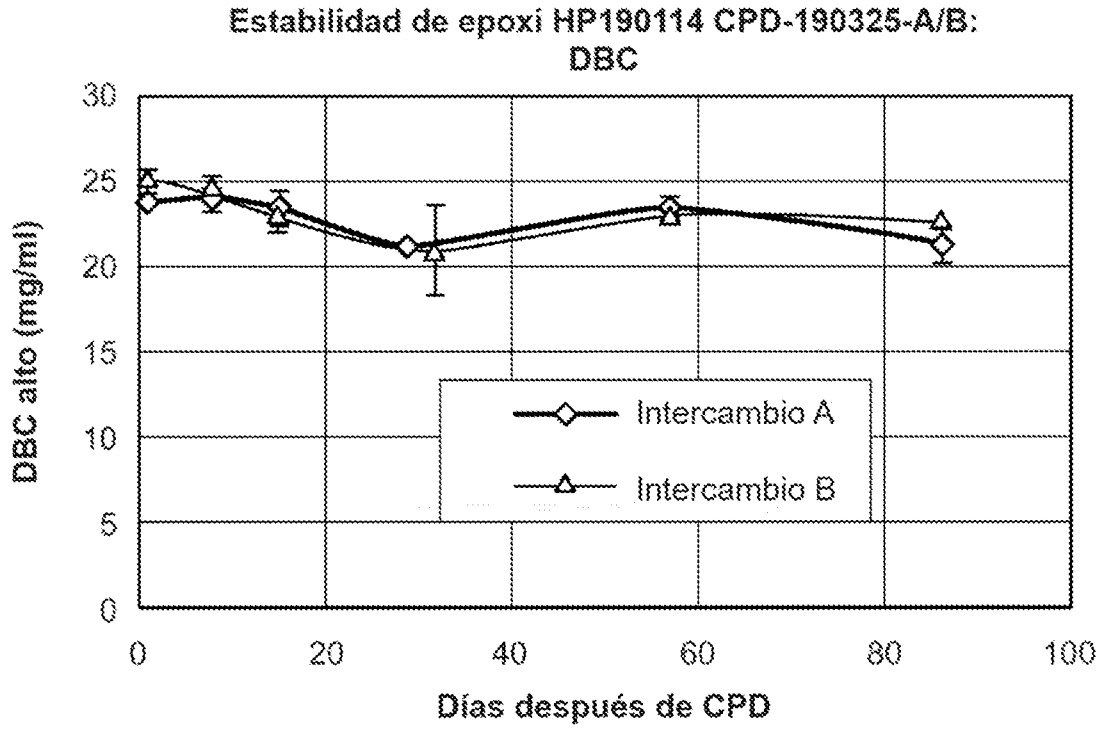


FIG. 5B

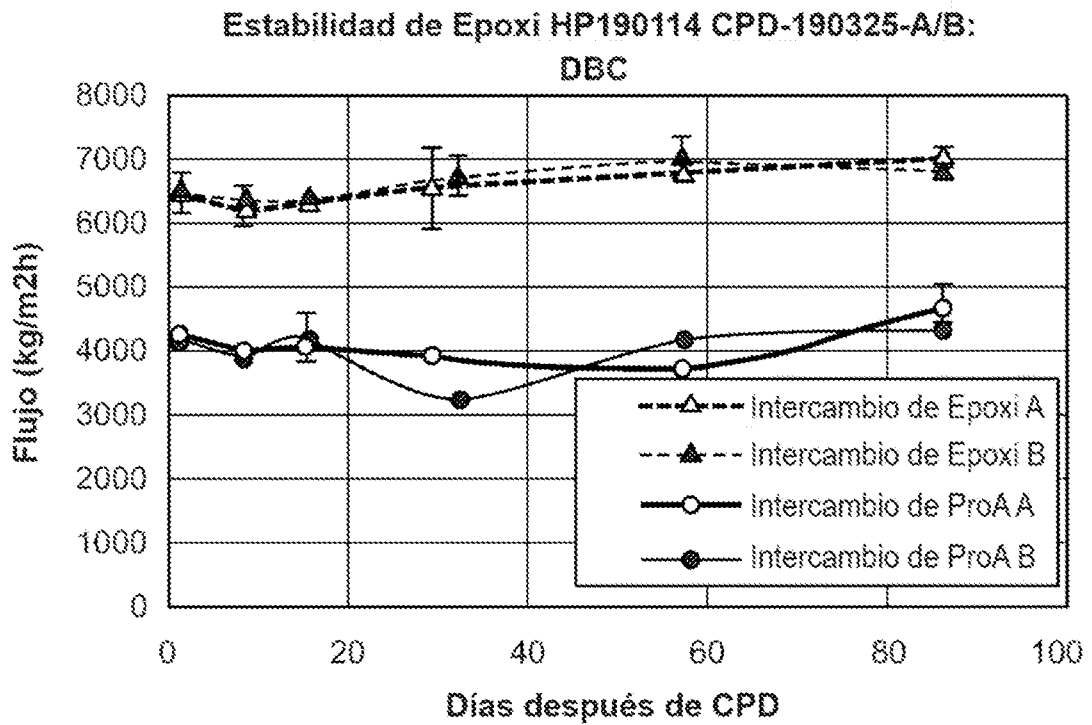


FIG. 5C

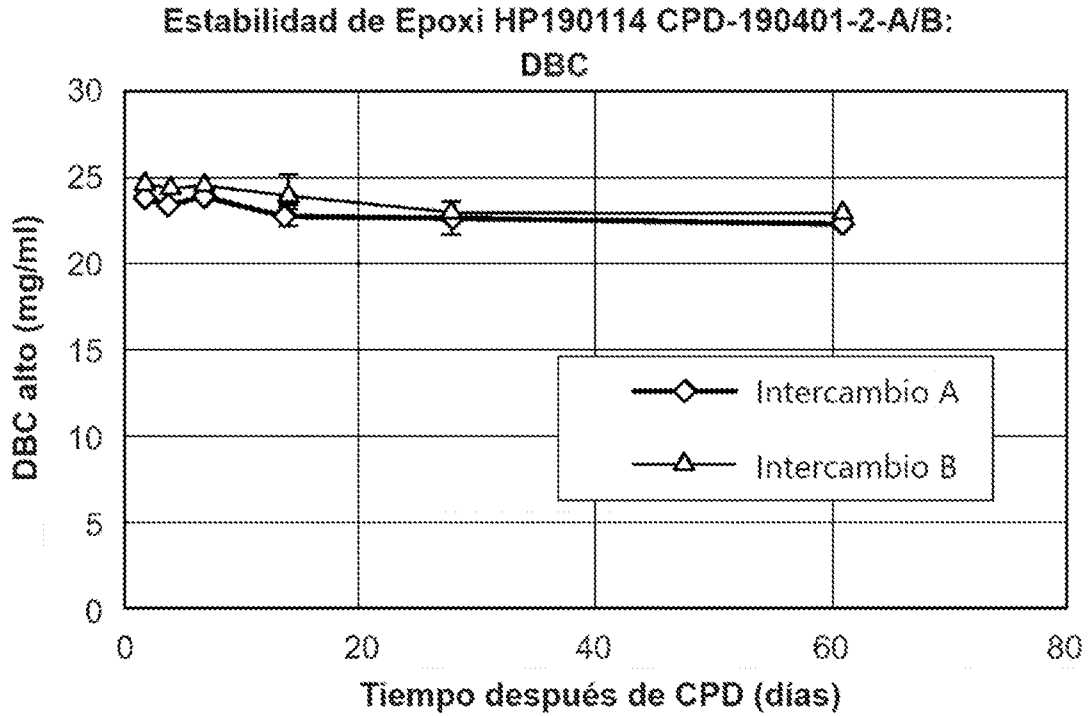


FIG. 5D

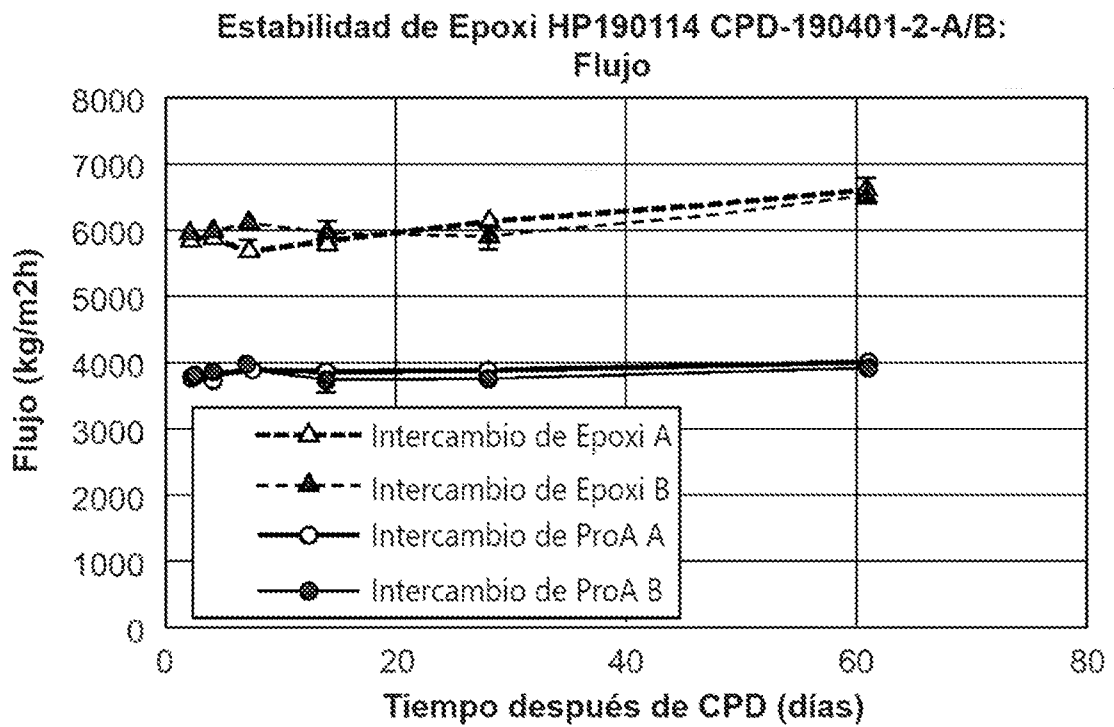


FIG. 6

Tabla 4. Parámetros de secado de punto crítico y volumen de extracción de etanol de membrana relacionada

ID de ejecución CPD	Agitador	Entrada de CO ₂		Intercambio de CO ₂		Salida de CO ₂		Temperatura de enfriamiento	Temperatura de calentamiento	Protocolo de intercambio	Volumen de disolvente (ml)	Volumen de memb. (ml)	Relación de disolvente/memb.
		Velocidad	% de Retardos	Velocidad	Ciclos	Color	Velocidad						
CPD190325 A	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	A	50	5.3	9.5
CPD190325 B	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	50	5.3	9.5
CPD190401-2-A	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	A	50	5.3	9.5
CPD190401-2-B	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	50	5.3	9.5
CPD190404	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	50	8.9	5.6
CPD190409-1	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	70	21.0	3.3
CPD190411-1	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	90	21.0	4.3

FIG. 7

Tabla 5. Parámetros de secado de punto crítico para membranas con capacidades de unión variables (A > B > C) y permeabilidades (C > B > A)

ID de ejecución CPD	Agitador	Entrada de CO ₂		Intercambio de CO ₂		Salida de CO ₂		Temperatura de ambiente	Temperatura de secamiento	Protocolo de intercambio	Volumen de disolvente (ml)	Volumen de memb. (m)	Relación de disolvente/memb.
		Velocidad	% de Rellenos	Retardo (min)	Velocidad	Ciclos	Calor						
Mem-A (CPD190410-B)	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	70	5.3	13.3
Mem-B (CPD190528)	100%	rápido	17	5	3	25	med	10°C	34°C	B	90	15.8	5.7
Mem-C (CPD190401-2-B)	100%	med	17	5	3	15	rápido	15°C	34°C	B	50	5.3	9.5

FIG. 8A

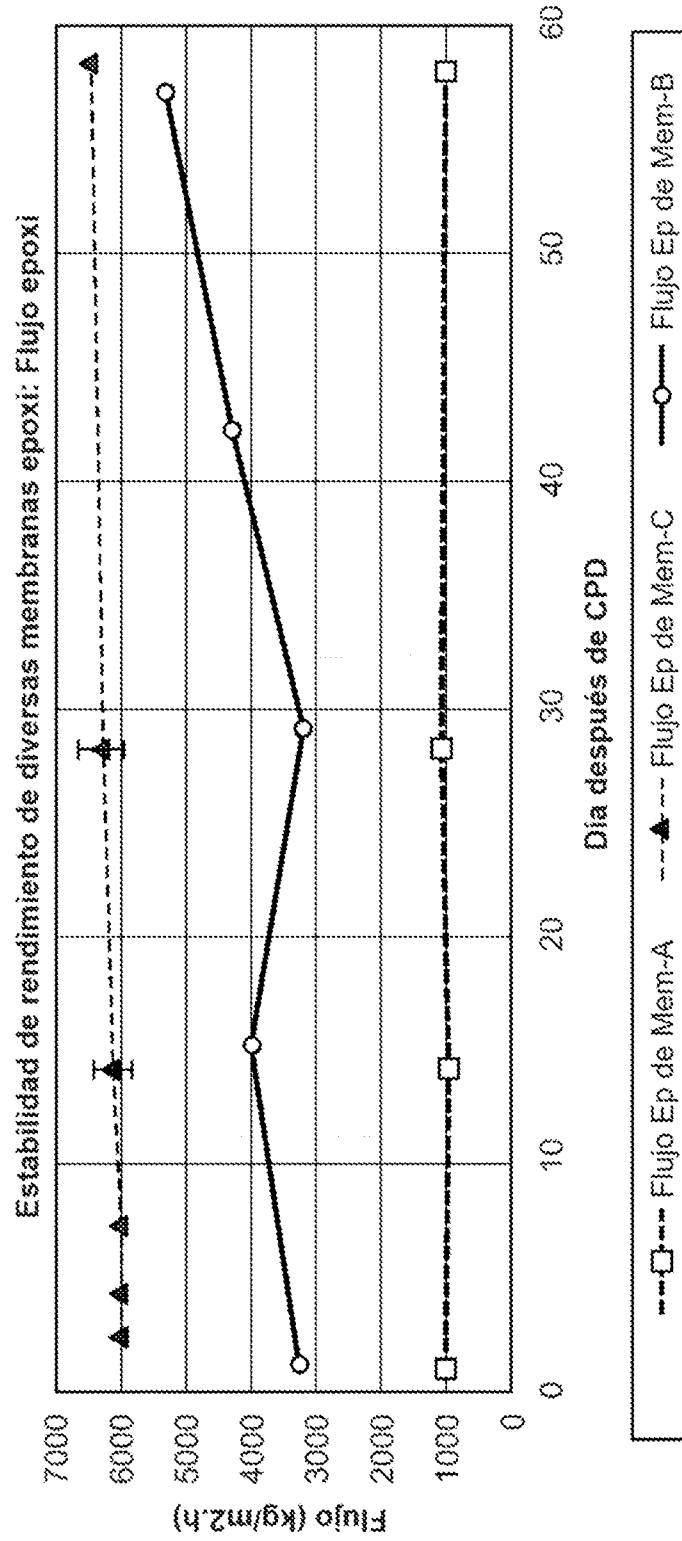


FIG. 8B

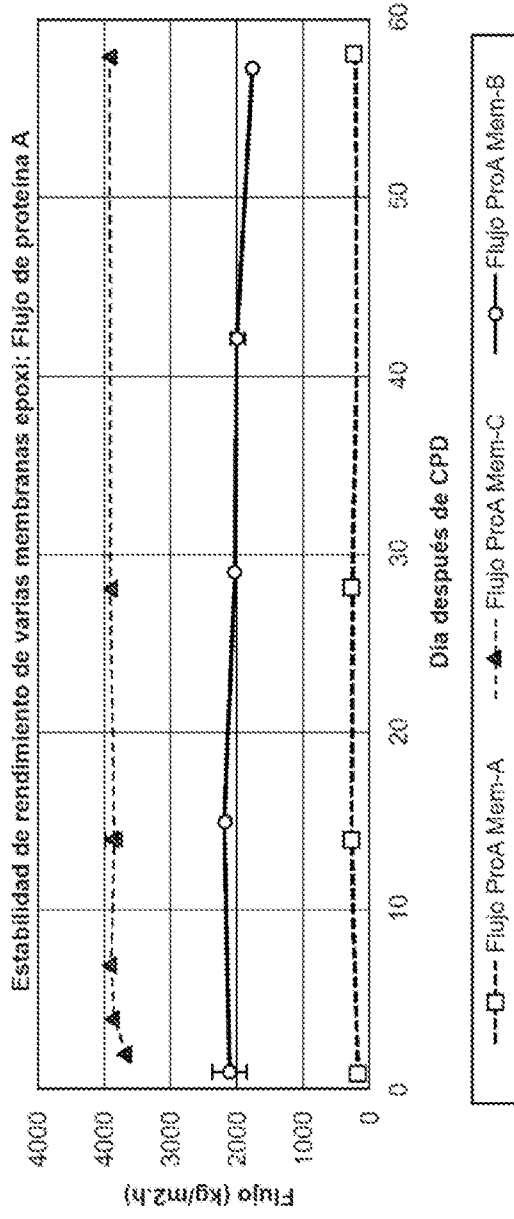


FIG. 8C

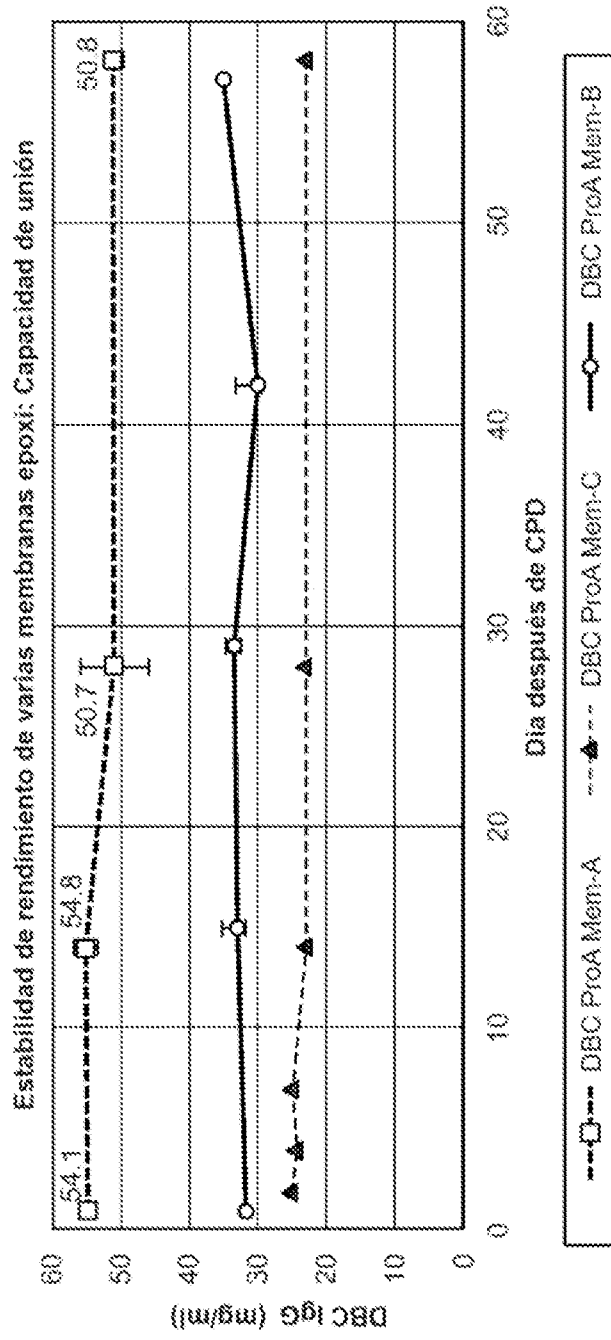


FIG. 9A

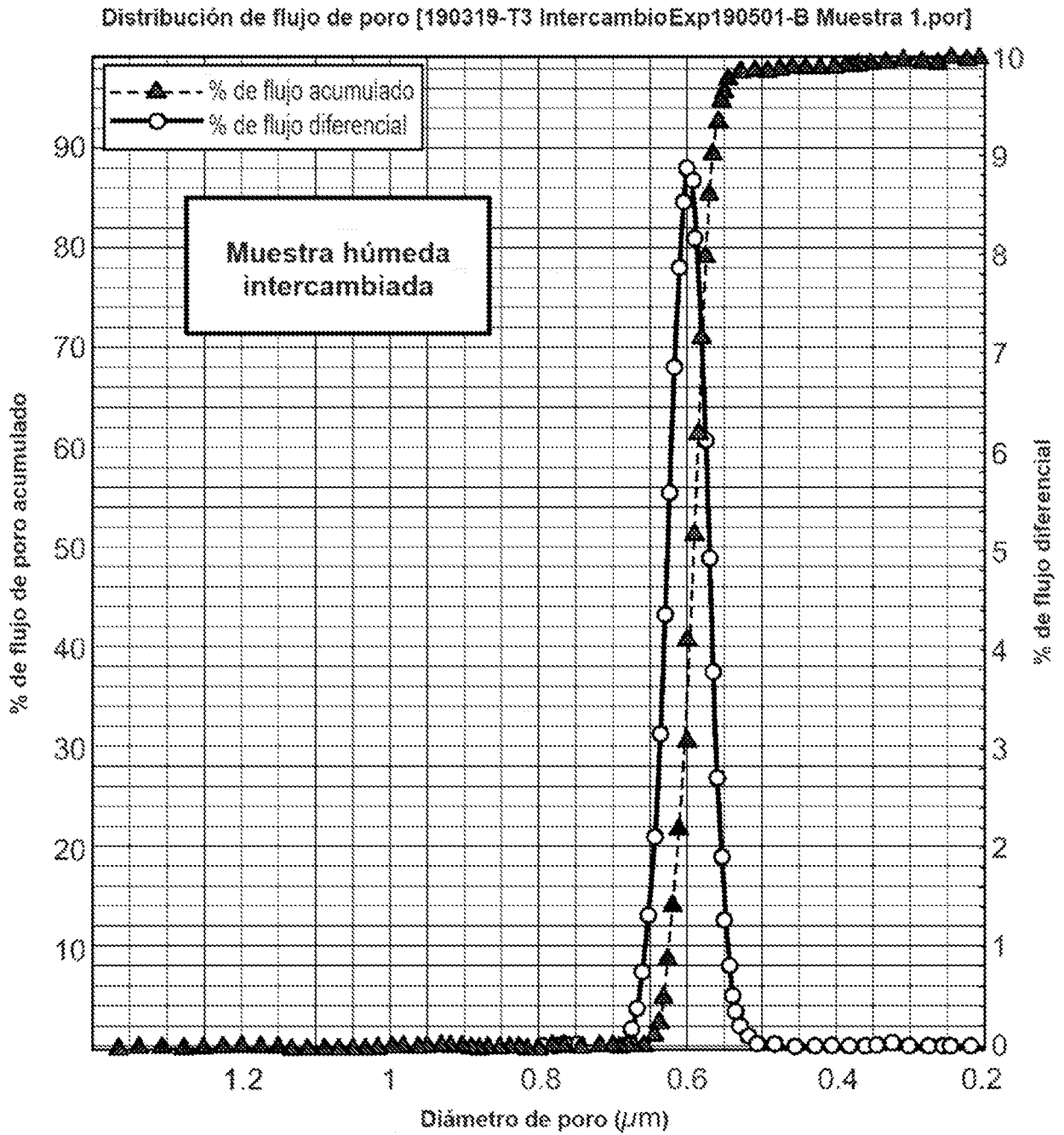


FIG. 9B

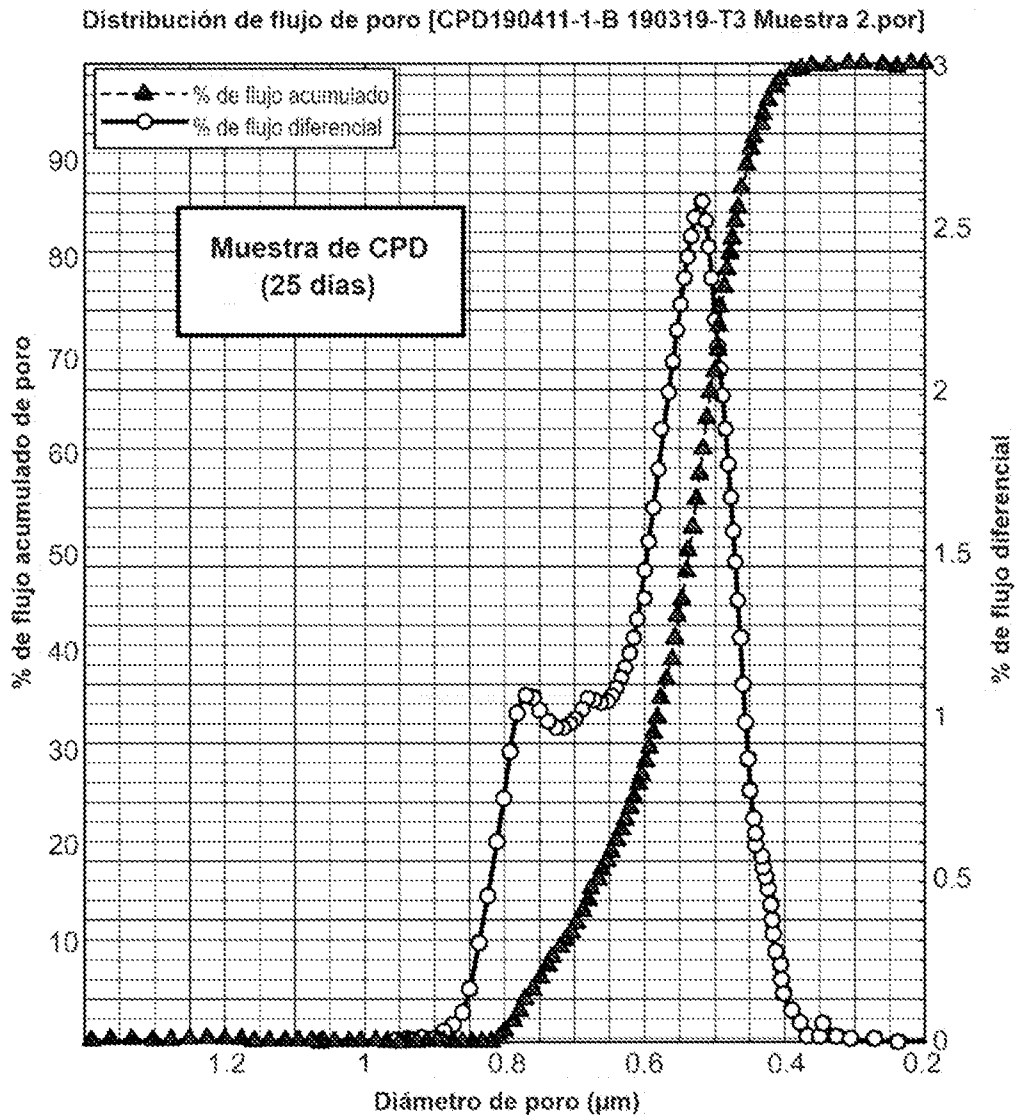


FIG. 9C

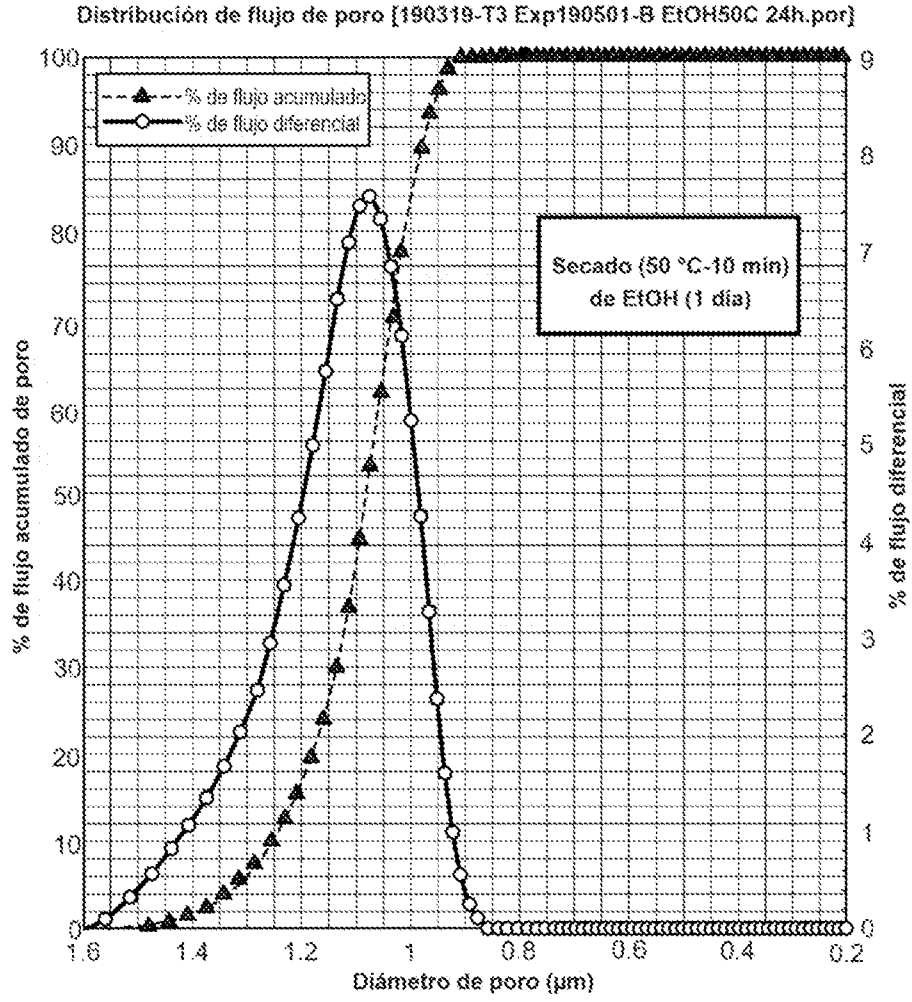


FIG. 9D

Distribución de flujo de poro [190319-T3 Exp190501-B Wat50C 24h muestra1.por]

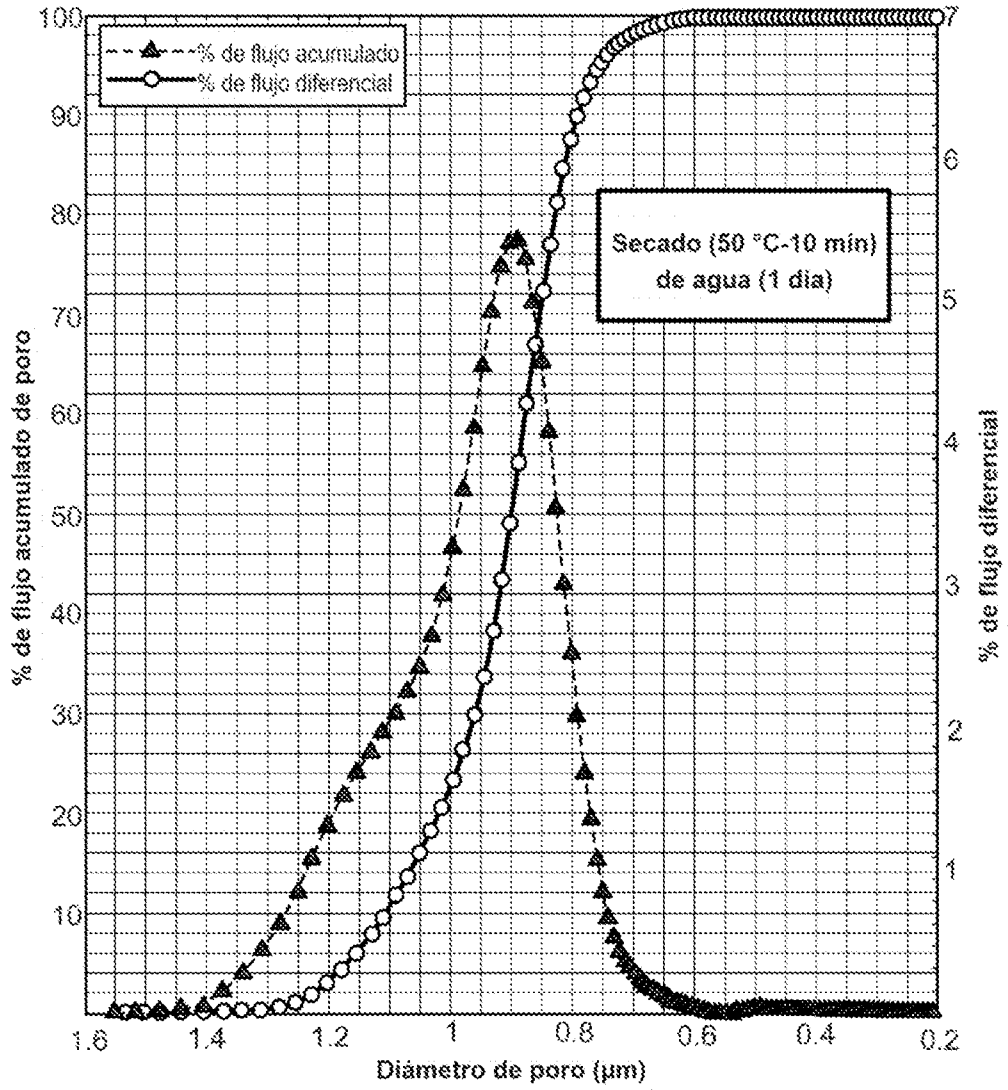


FIG. 10B

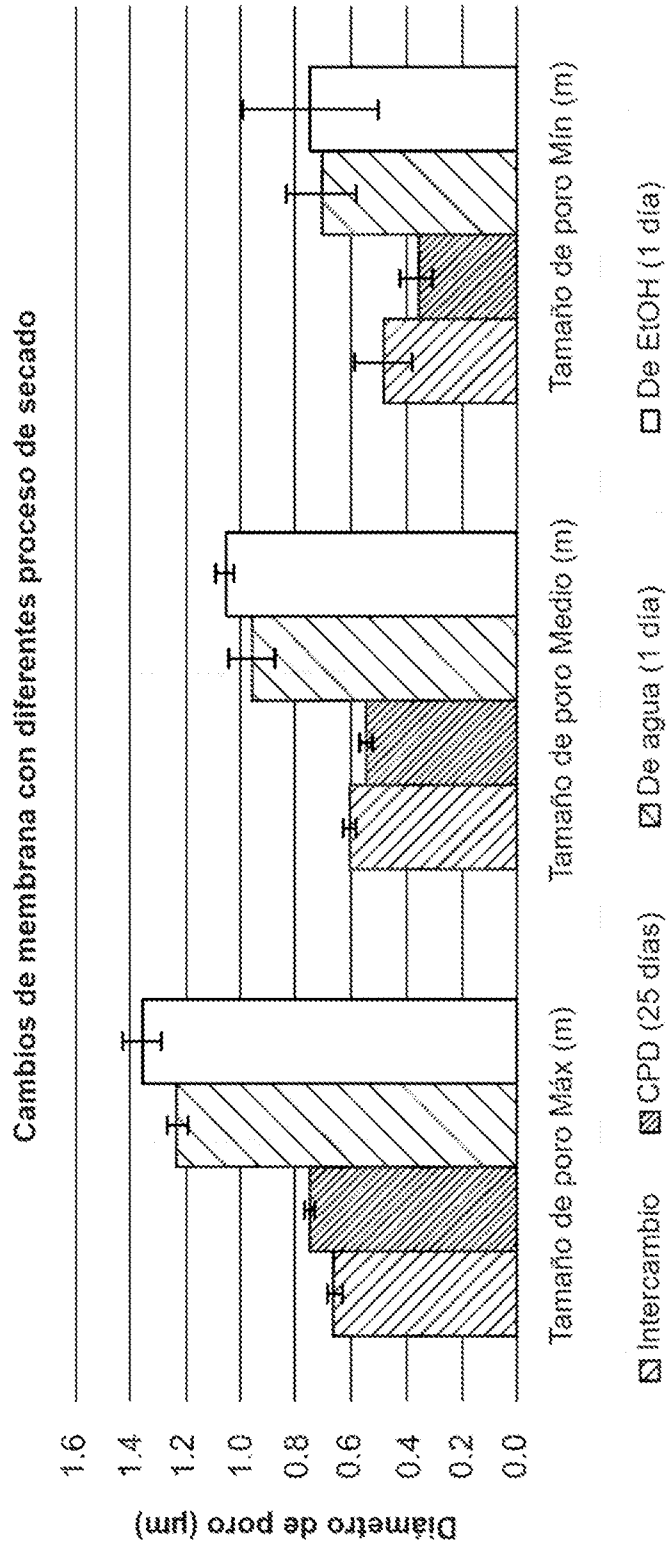


FIG. 11

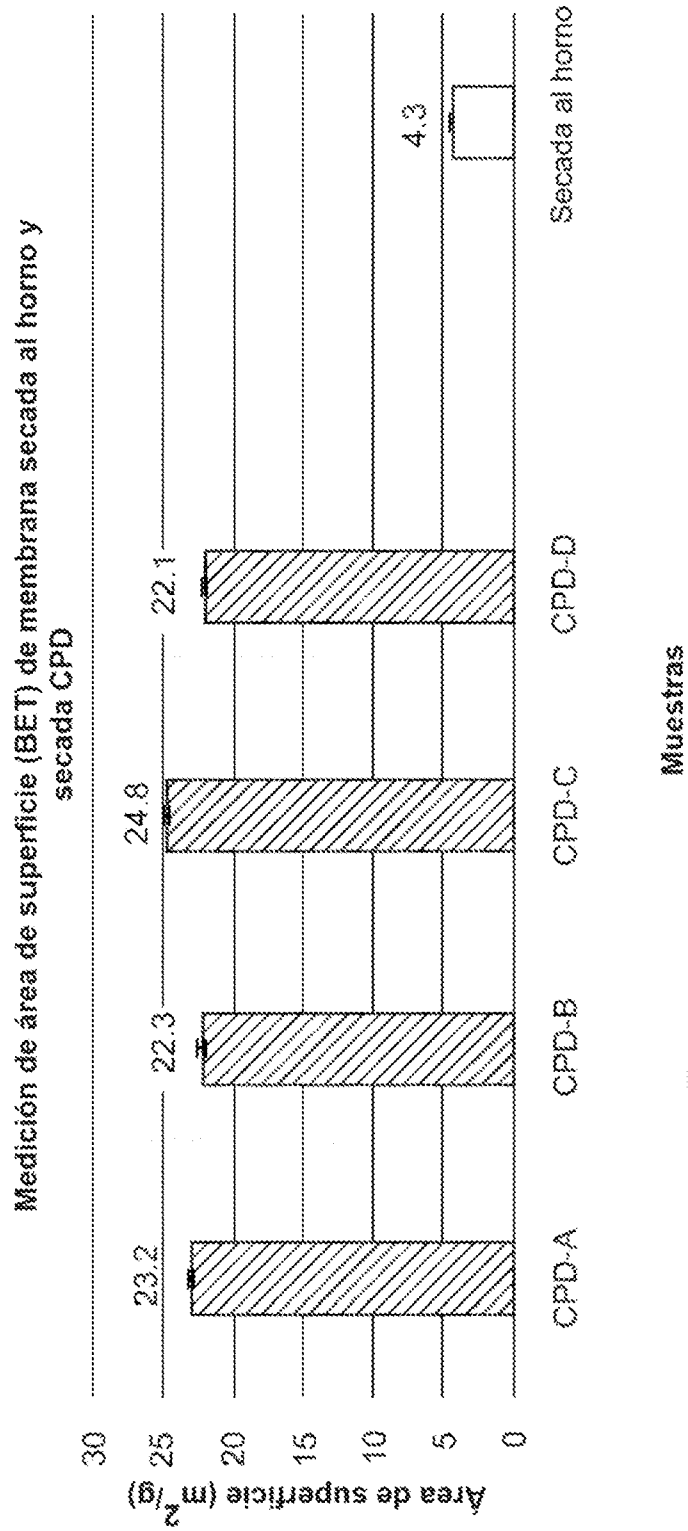


FIG. 12

Tabla 6. Parámetros clave de la ejecución del CPD y volumen de extracción de alcohol de membrana reaccionado

Programa CPD	Agitador		Entrada CO ₂			Intercambio de CO ₂		Salida de CO ₂		Temperatura de enfriamiento	Temperatura de reaccionamiento
	% de velocidad	% de velocidad	Velocidad	% de carga	Retardo (min)	Velocidad	Ciclos	Calor	Velocidad		
8	100%	Rápido	Rápido	50	5	3	15	Medio	Rápido	15°C	35°C
10	100%	Rápido	Rápido	17	5	3	15	Medio	Rápido	15°C	34°C

FIG. 13A

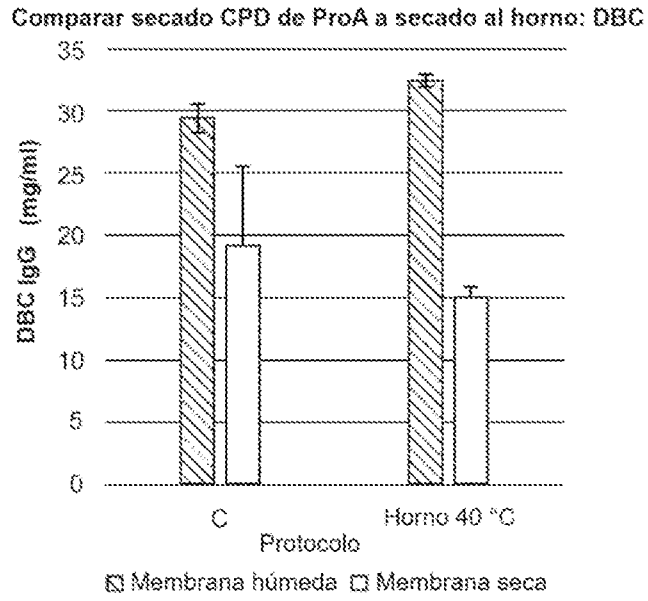


FIG. 13B

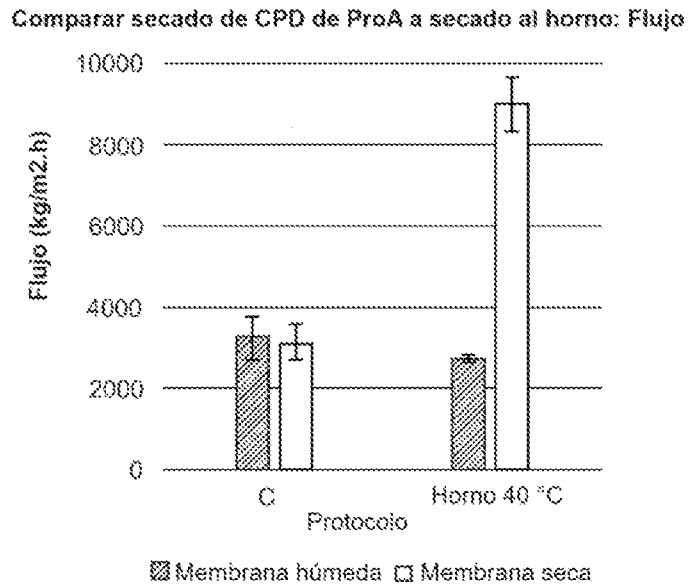


FIG. 14A

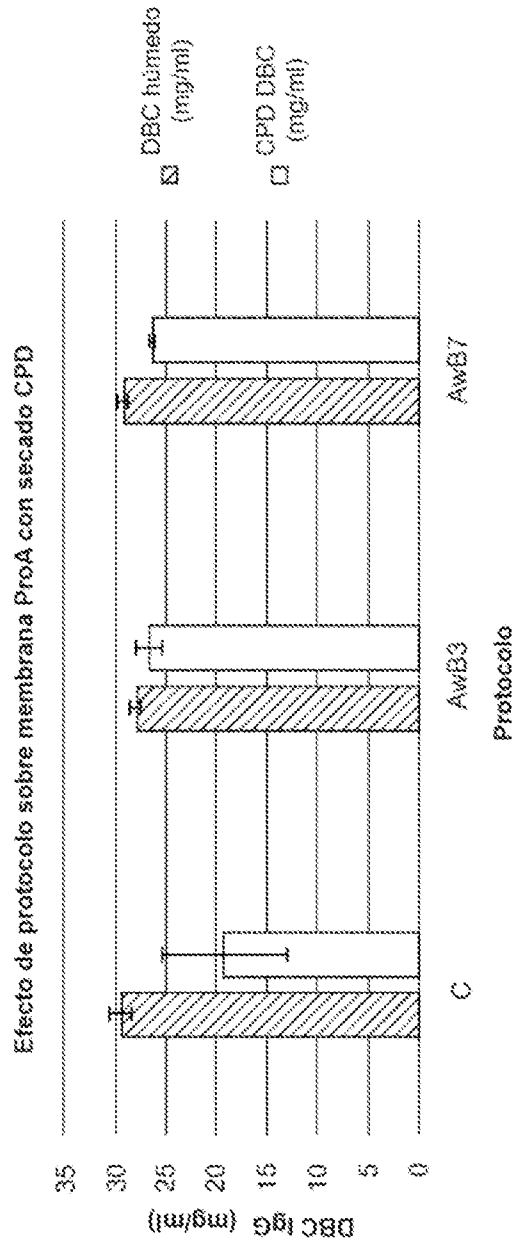


FIG. 14B

Efecto de protocolo sobre el flujo de membrana ProA con secado CPD

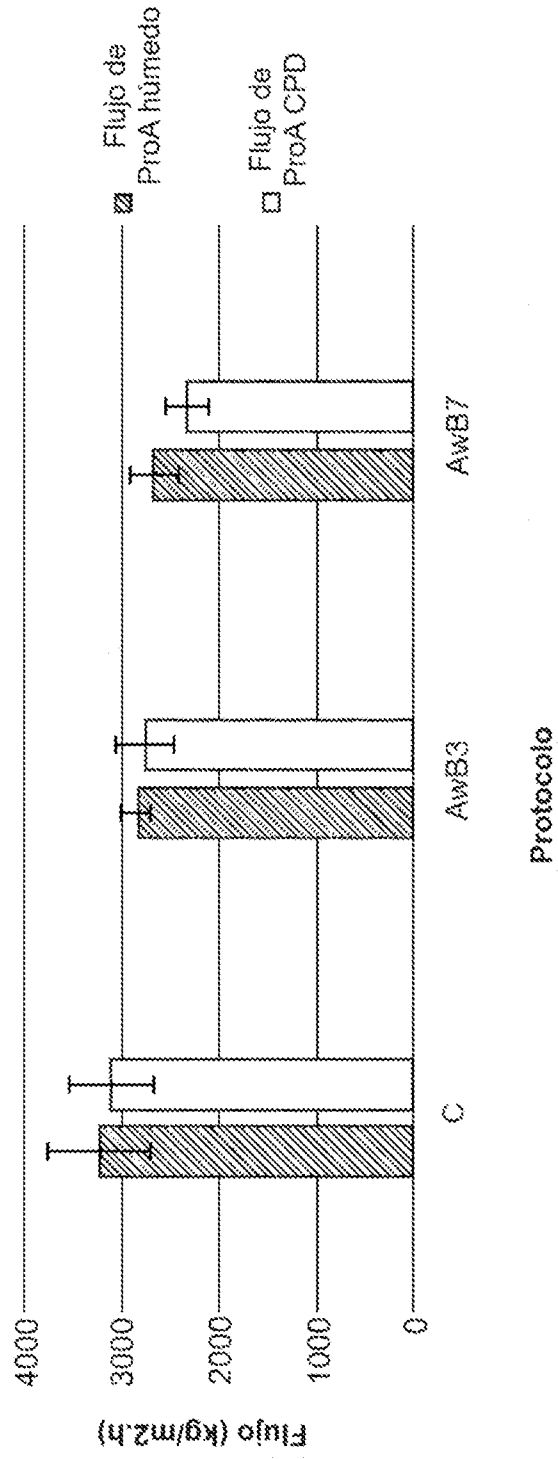


FIG. 15

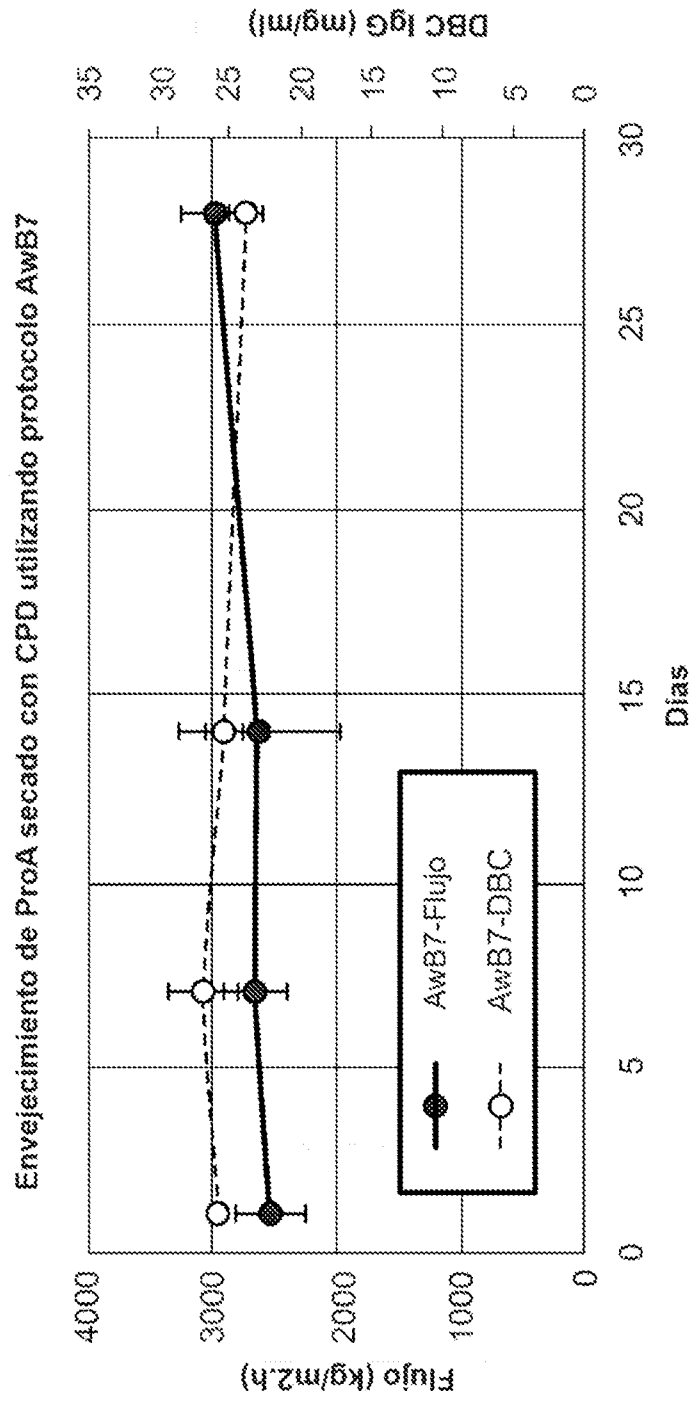


FIG. 16A

Efecto del protocolo sobre DBC de membrana de ProA con secado de CPD

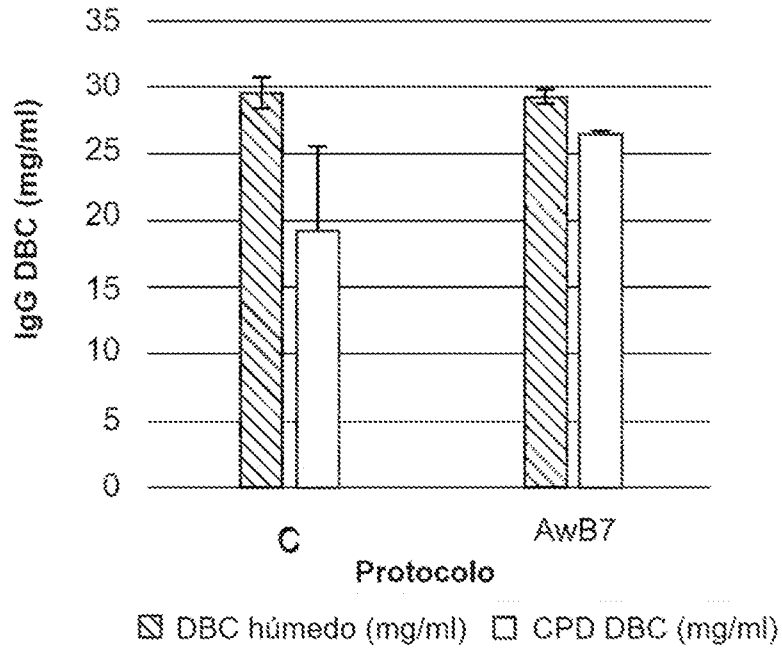


FIG. 16B

Efecto de protocolo sobre flujo de membrana de ProA con secado CPD

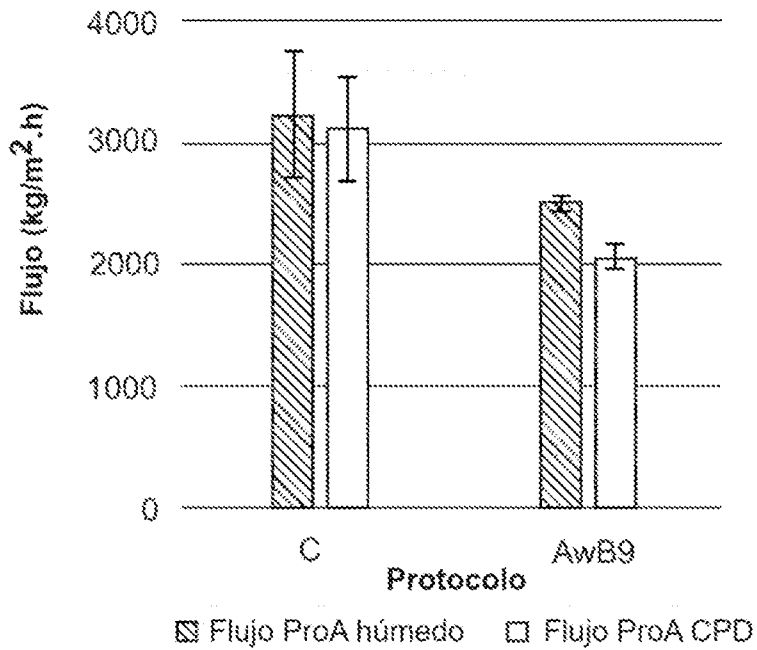


FIG. 17

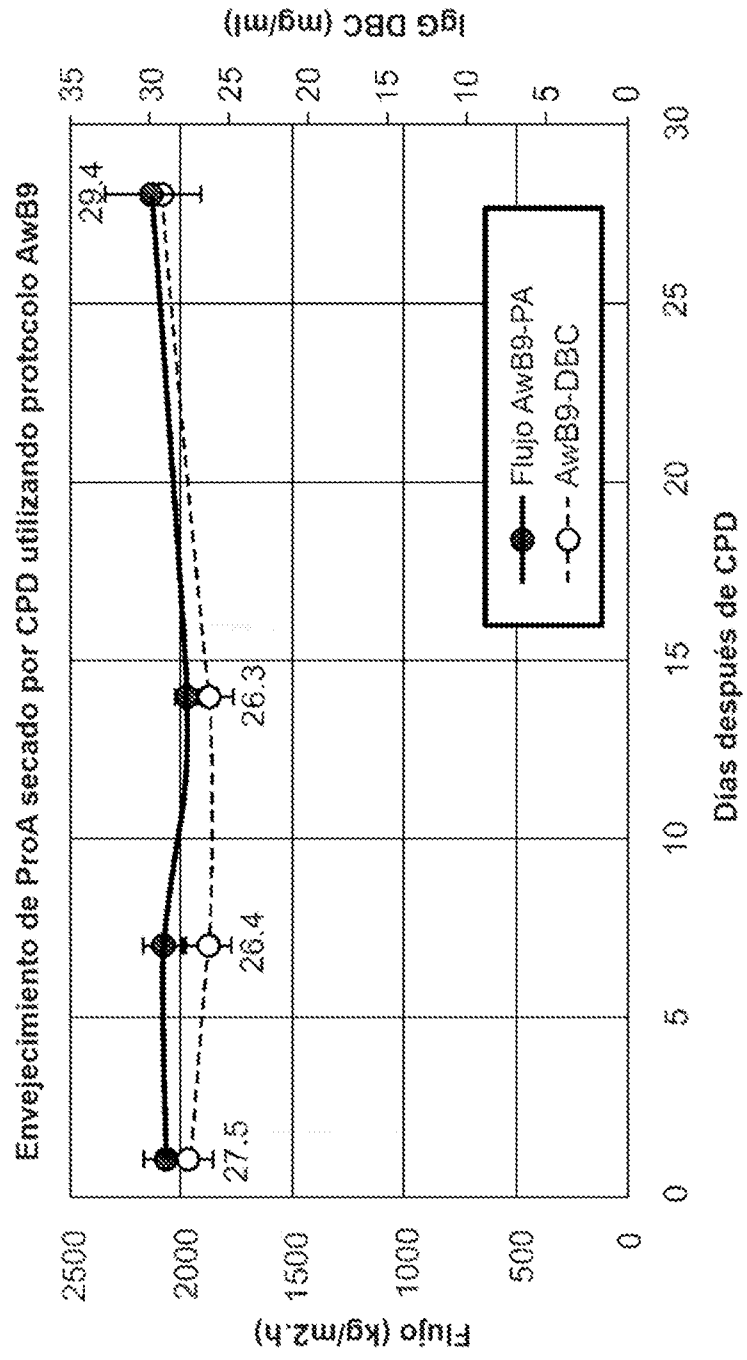


FIG. 18

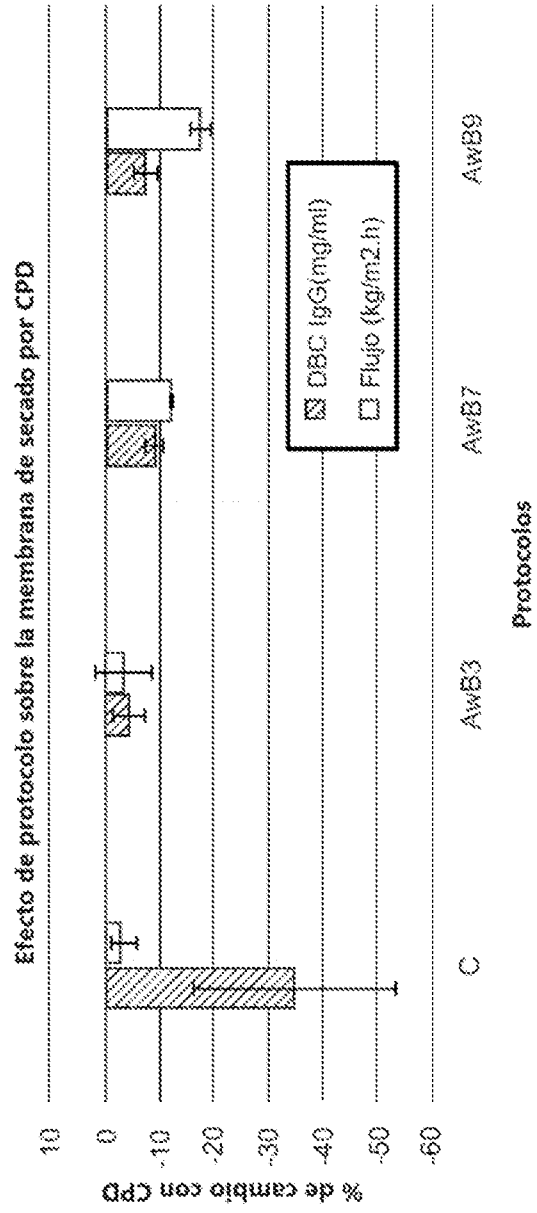


FIG. 19A

Estabilidad de envejecimiento de rollo de membrana de proteína A secada por CPD utilizando protocolo de intercambio de alcohol AWE3: DBC

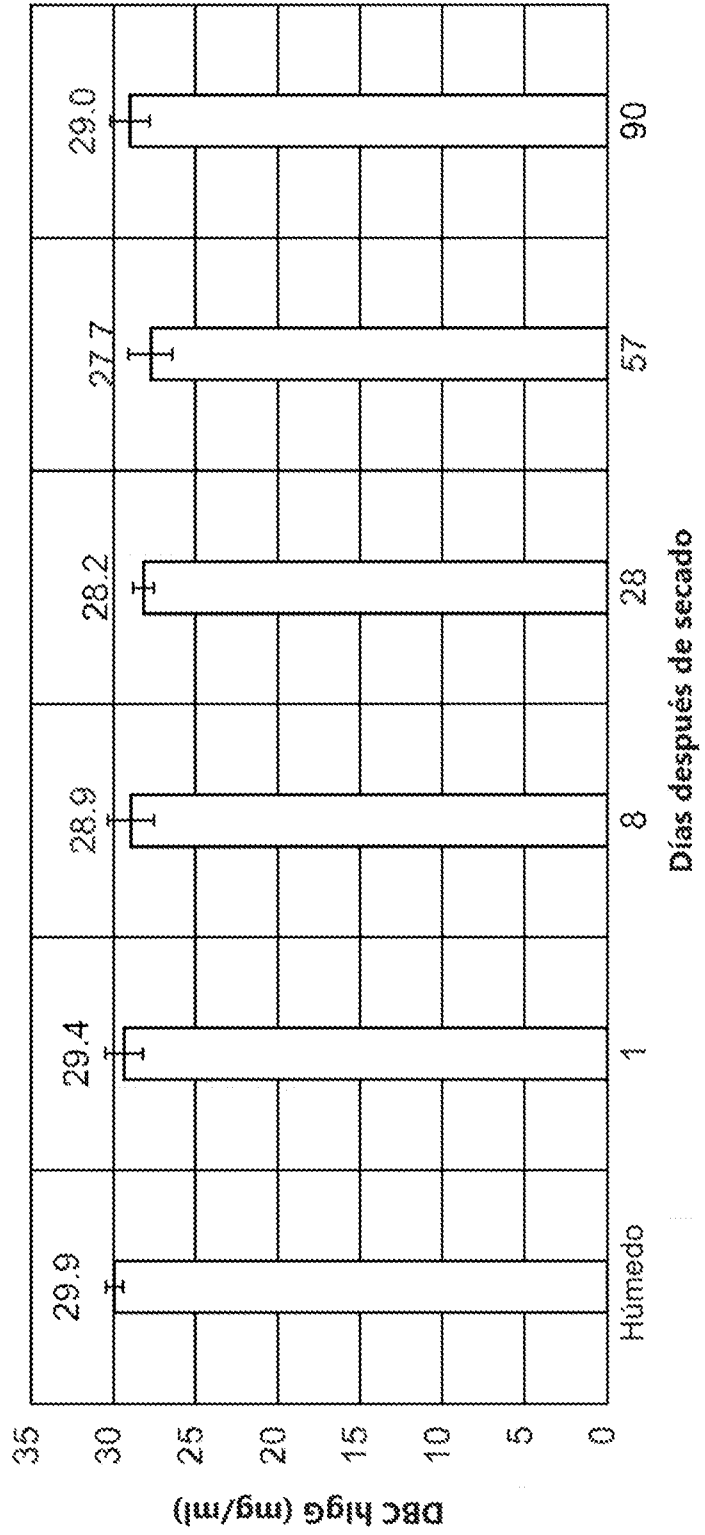


FIG. 19B

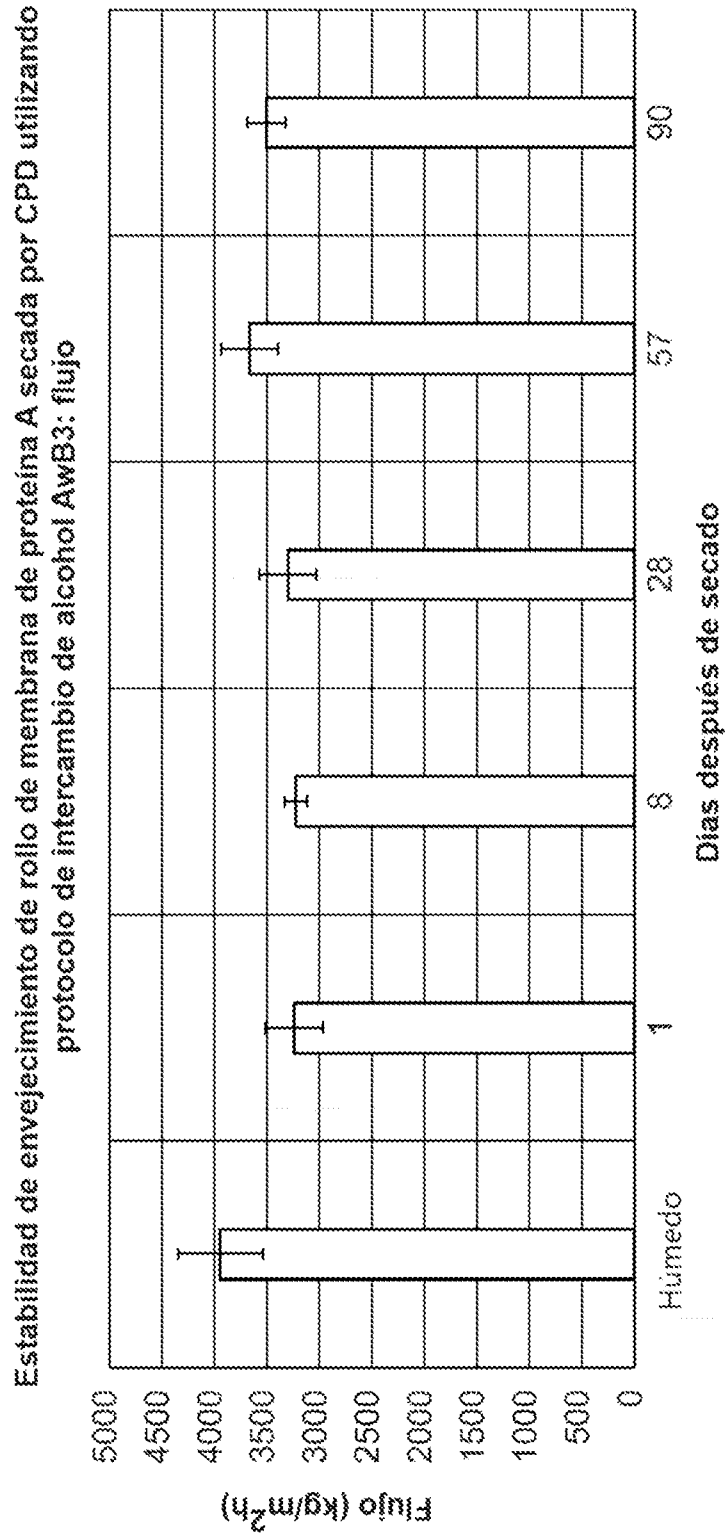


FIG. 20A

Estabilidad de envejecimiento para ProA secado por CPD utilizando protocolo de intercambio de alcohol limitado AwB3-SV: DBC

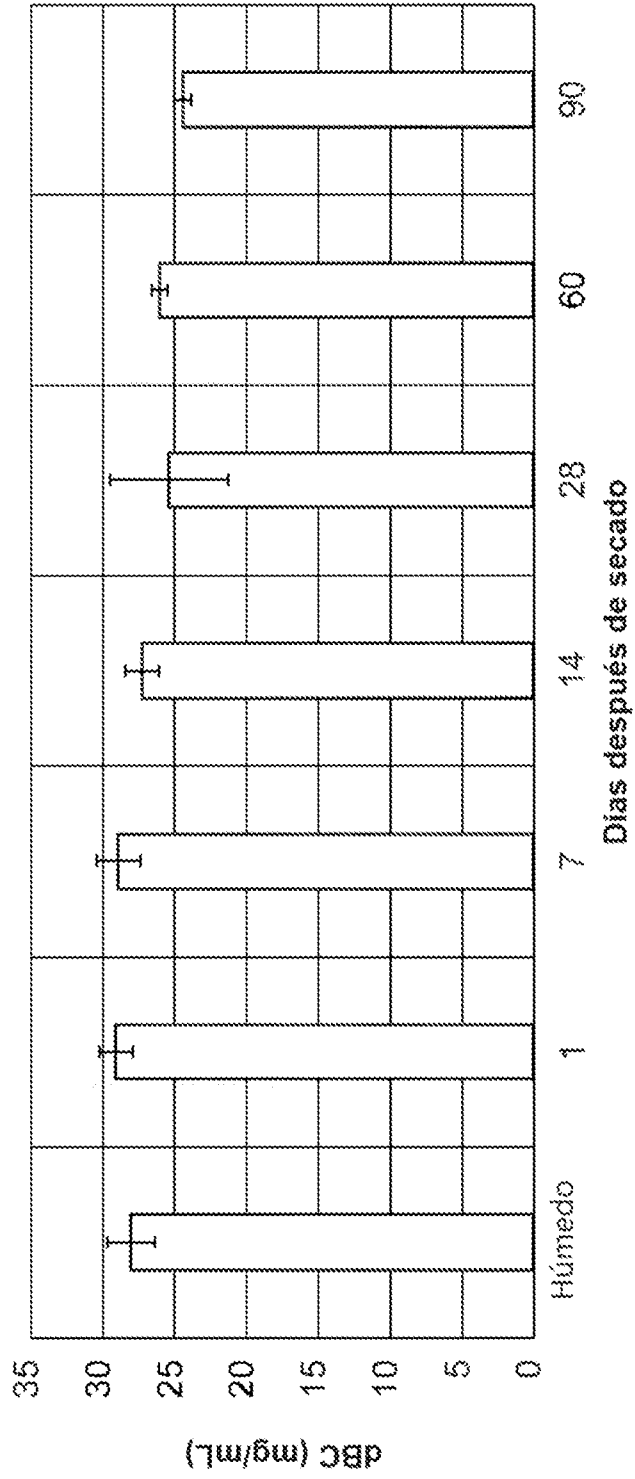


FIG. 20B

Estabilidad de envejecimiento para ProA secado por CPD utilizando protocolo de intercambio de alcohol limitado AwE3-SV: Flujo

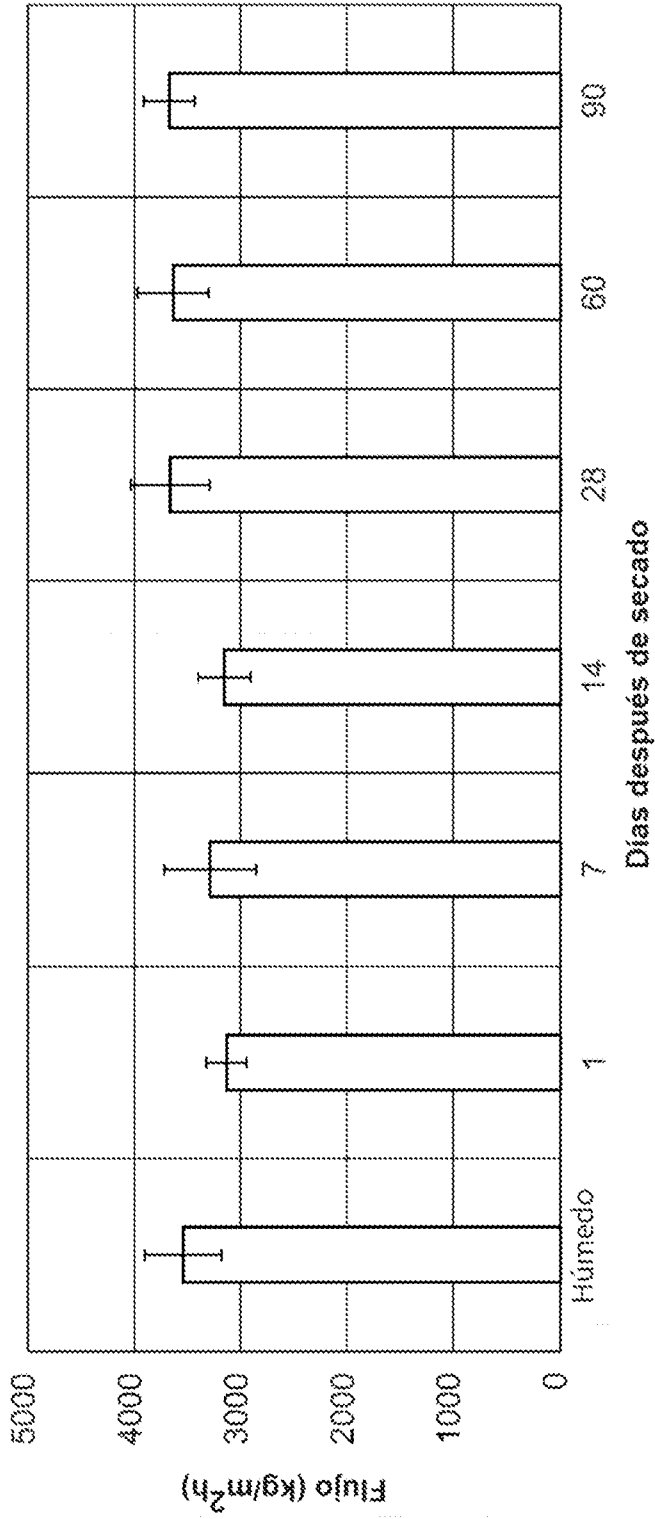


FIG. 21A

Estabilidad de envejecimiento para membrana ProA secada por CPD intercambiada utilizando protocolo con almacenamiento bioestático (1 día en alcohol al 20 %): DBC

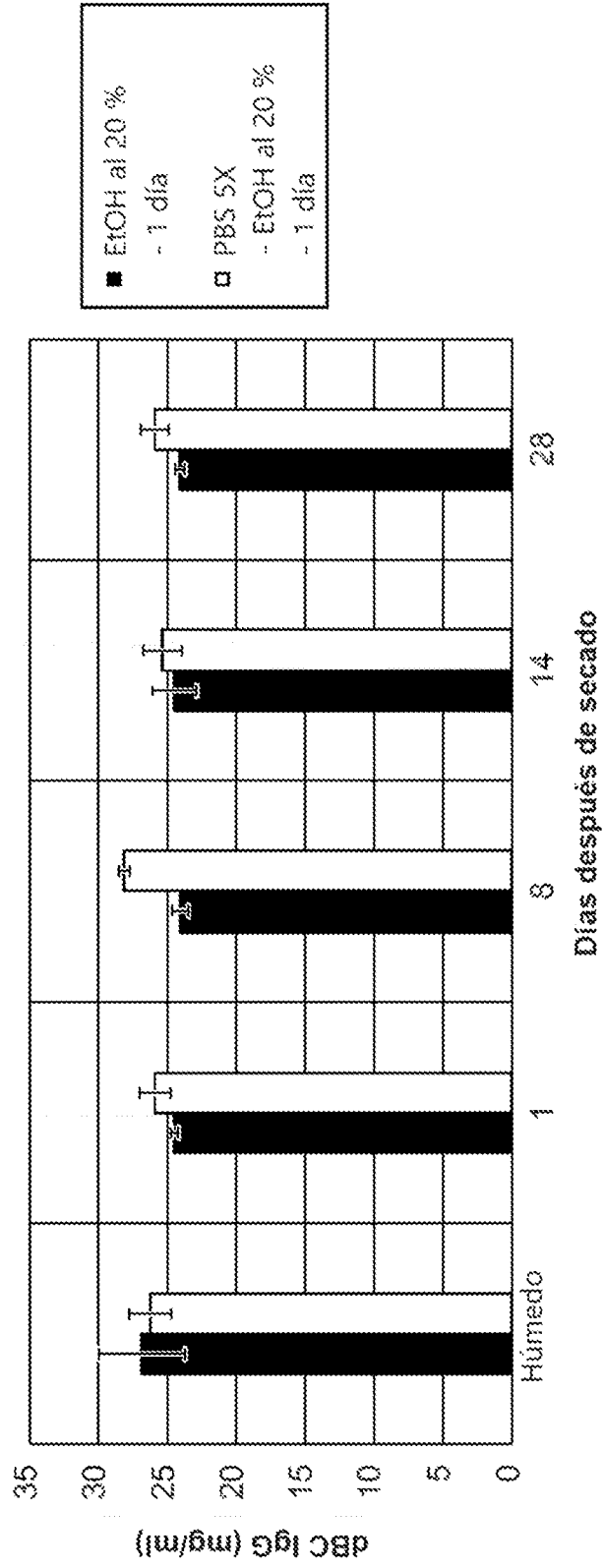


FIG. 21B

Estabilidad de envejecimiento para membrana ProA secada por CPD intercambiada utilizando protocolo con almacenamiento bioestático (1 día en alcohol al 20%): Flujo

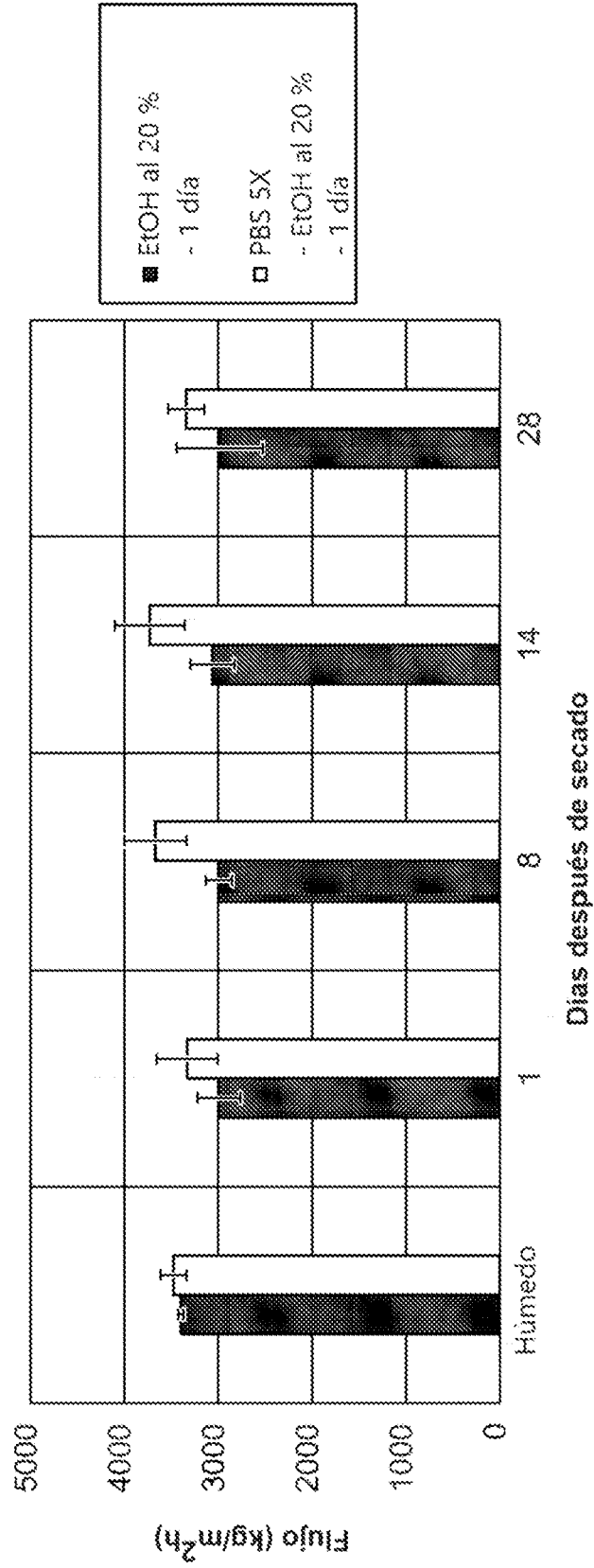


FIG. 22A

Estabilidad de envejecimiento para membrana ProA secada por CPD intercambiada utilizando protocolo con almacenamiento bioestático (7 días en alcohol al 20 %): DBC

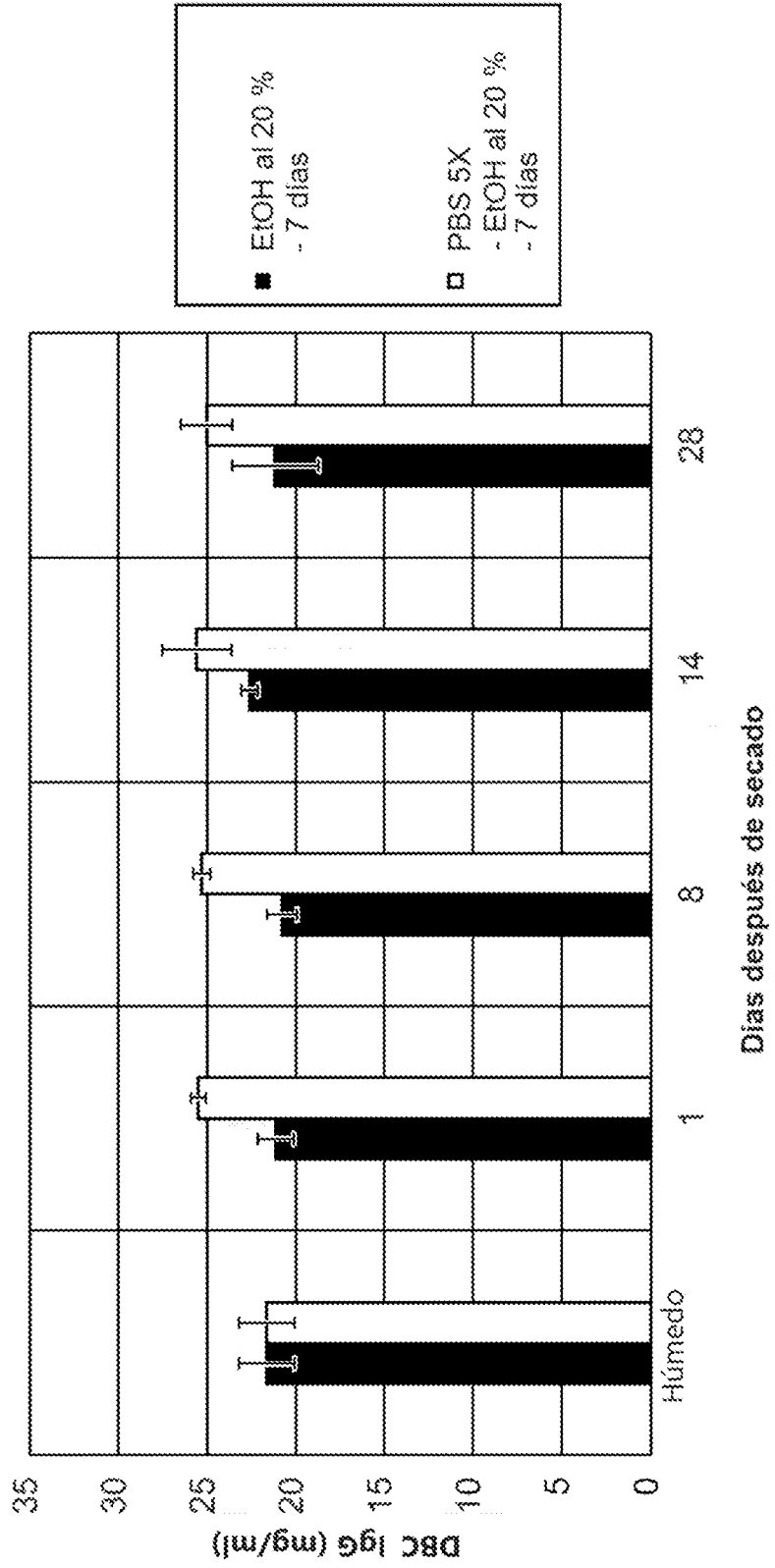


FIG. 22B

Estabilidad de envejecimiento para membrana ProA secada por CPD intercambiada utilizando protocolo con almacenamiento bioestático (7 días en alcohol al 20 %): Flujo

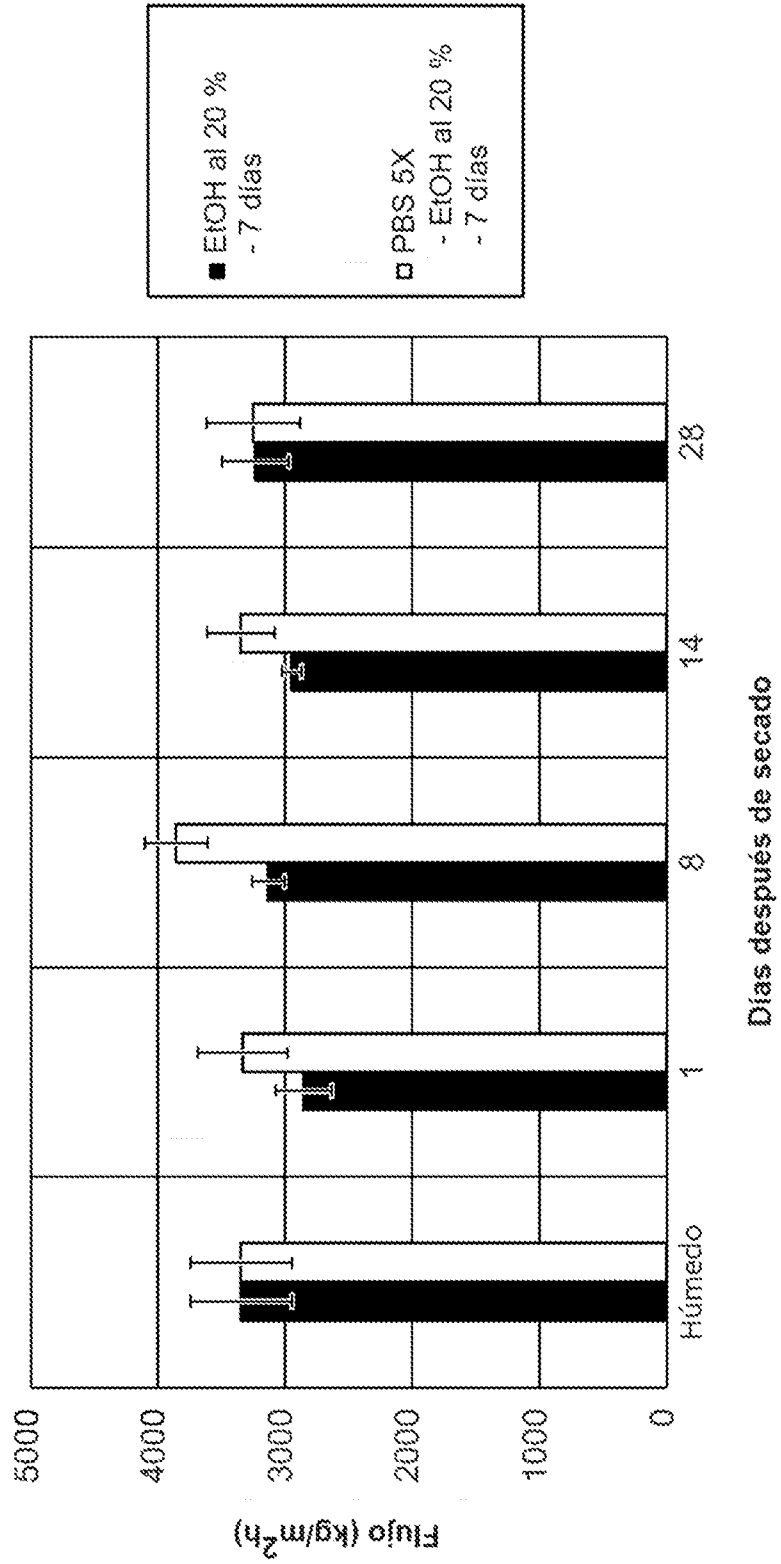


FIG. 23A

Estabilidad de envejecimiento para membrana ProA secada por CPD intercambiada utilizando protocolo con almacenamiento bioestático (7 días en alcohol al 16 % en fosfato 20 mM pH 7.5)

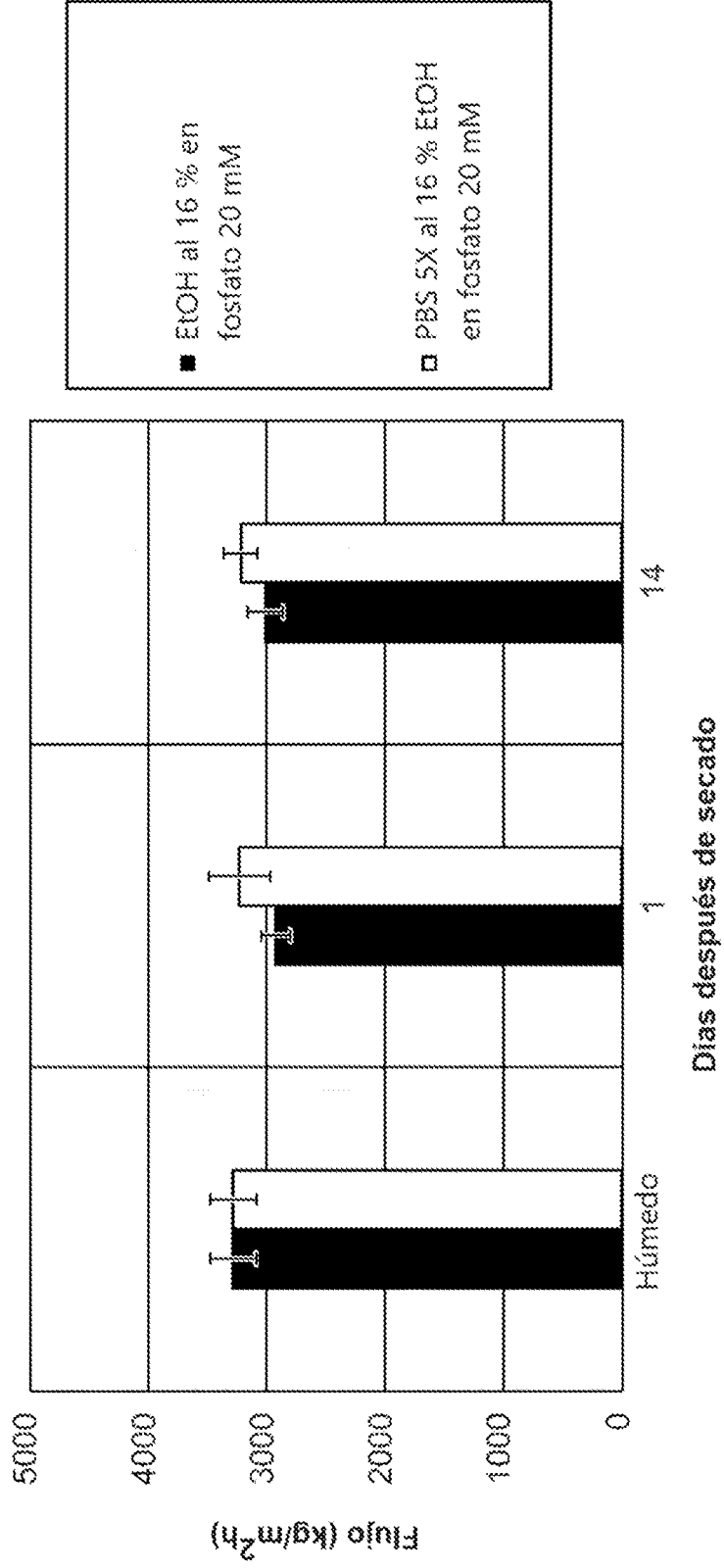


FIG. 23B

Estabilidad de envejecimiento para membrana ProA secada por CPD intercambiada utilizando protocolo con almacenamiento bioestático (7 días en alcohol al 16 % en fosfato 20 mM pH 7.5)

