



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

**(11) BR 112016007808-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 09/10/2014**

**(45) Data de Concessão: 26/10/2021**

**(54) Título:** PROCESSOS PARA PREPARAR UM MEIO DE CROMATOGRAFIA FUNCIONALIZADO, PARA PREPARAR UM CARTUCHO DE CROMATOGRAFIA E PARA ISOLAR UMA OU MAIS MOLÉCULAS BIOLÓGICAS, MEIO DE CROMATOGRAFIA FUNCIONALIZADO E USO DE UM MEIO DE CROMATOGRAFIA FUNCIONALIZADO OU DE UM CARTUCHO DE CROMATOGRAFIA

**(51) Int.Cl.:** B01J 20/24; B01D 15/36; B01D 15/38; B01J 20/28; B01J 20/285; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 09/10/2013 GB PCT/GB2013/052626.

**(73) Titular(es):** PURIDIFY LTD..

**(72) Inventor(es):** OLIVER HARDICK; DANIEL GILBERT BRACEWELL; STEWART DODS.

**(86) Pedido PCT:** PCT GB2014000401 de 09/10/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/052465 de 16/04/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 07/04/2016

**(57) Resumo:** MEIO DE CROMATOGRAFIA. A presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover duas ou mais folhas de não tecido empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, (II) simultaneamente aquecer e pressionar a pilha de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, e (III) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia.

“PROCESSOS PARA PREPARAR UM MEIO DE CROMATOGRAFIA FUNCIONALIZADO, PARA PREPARAR UM CARTUCHO DE CROMATOGRAFIA E PARA ISOLAR UMA OU MAIS MOLÉCULAS BIOLÓGICAS, MEIO DE CROMATOGRAFIA FUNCIONALIZADO E USO DE UM MEIO DE CROMATOGRAFIA FUNCIONALIZADO OU DE UM CARTUCHO DE CROMATOGRAFIA”

Campo da invenção

[0001] A invenção se refere aos meios de cromatografia funcionalizados que são adequados para isolar moléculas biológicas a partir das fases móveis.

Antecedentes da técnica

[0002] O mercado de biotecnologia é o setor que cresce mais rápido dentro do mercado farmacêutico mundial, responsável por 20% (\$153bn) de todas as vendas de mercado em 2012. Este crescimento de 10% na fatia de mercado em 2002 é definido para crescer em 41% entre 2012 e 2018 a partir de \$153bn a \$215bn. Existem atualmente cerca de 200 produtos de anticorpo monoclonal (MAb) no mercado e com mais de 1000 em testes clínicos a necessidade por avanço tecnológico nesta área é clara. Durante a última década titulantes de fermentação típicos de biomoléculas cresceram de 0,5 g/L a 50 g/L, e enquanto os processos de purificação a jusante também receberam alguma pesquisa e desenvolvimento, aprimoramentos nesta área não corresponderam com aqueles a montante. A grande confiança em operações de unidade de cromatografia de ligação/eluado, em termos econômicos, é a chave para avanços no processamento a jusante de biomoléculas, tais como MAbs. A cromatografia é responsável por uma parte bastante

significativa dos custos de processamento a jusante de biomoléculas, que por sua vez impacta nos custos globais das biomoléculas em si.

[0003] Historicamente, cromatografia de leito empacotado convencional tem sido uma ferramenta de separação extremamente poderosa. No entanto, está se tornando ainda mais aparente que sistemas radicalmente novos devem ser aplicados para permitir que biomoléculas sejam recuperadas de maneira eficiente e econômica após o preparo.

[0004] Uma área que tem observado desenvolvimento é a síntese de novos ligandos para substituir ligandos de afinidade caros atuais.

[0005] Outra rota que foi explorada é a modificação de estruturas de suporte convencionais tais como adsorventes de leito embalado empacotados porosos. Isto tipicamente é para se endereçar às desvantagens associadas com tais adsorventes, em particular problemas com a queda de pressão e tempos de residência. Estas desvantagens tipicamente resultam em separações ineficientes. O desenvolvimento de novas estruturas de adsorvente que permitem a operação independente da taxa de fluxo oferece a vantagem de rendimento aumentado, mas em geral apenas tem se provado útil em pequena escala. Problemas com incrustação de adsorvente são comuns, e isto geralmente

limita técnicas de separação cromatográfica para operações de polimento de estágio posterior. Uma troca deve ser feita entre incrustação e a capacidade de captura com relação aos tamanhos de poro de adsorvente. Pequenos tamanhos de poro são necessários para a boa separação com curvas de rompimento agudas, mas resultam em incrustação aumentada. Reciprocamente, adsorventes de tamanho de poro maior ( $10\text{ }\mu\text{m}$  a  $150+\mu\text{m}$ ) podem oferecer melhor manipulação de incrustantes, mas pequenas biomoléculas alvo podem passar através de tal adsorvente sem ligação.

[0006] Mais recentemente, cromatografia de membrana foi reportada como uma alternativa potencialmente viável no modo de captura de contaminante.

[0007] Outro foco de pesquisa tem sido o desenvolvimento de estruturas de monolito que provaram oferecer boa separação para grandes biomoléculas tais como plasmídeos e vírus devido aos relativamente grandes presentes na superfície. A tendência da indústria corrente de se mover para sistemas de uso único favorece a cromatografia de membrana já que a economia das membranas de uso único são mais favoráveis do que colunas de leito empacotado de uso único.

[0008] Outra rota para o desenvolvimento é um movimento para o processamento contínuo. A ação para o processamento contínuo pode permitir que eficiências sejam

alcançadas em muitos sistemas. Assim, a operação contínua apresenta oportunidades para o monitoramento de processo em tempo real e controle automatizado com benefícios potenciais incluindo especificação de produto previsível, custos de trabalho reduzidos, e integração com outros processos contínuos. No entanto, pouco no modo de operação de cromatografia realmente contínua tem sido desenvolvido desta forma até agora.

[0009] Portanto será percebido que existem muitos caminhos diferentes de pesquisa sendo empregados para prover processos aprimorados para recuperar biomoléculas.

[00010] Nanofibras poliméricas eletrofiadas possuem propriedades que oferecem uma solução potencial para os problemas observados com matrizes de suporte convencionais usados em bioprocessamento a jusante. As suas propriedades prontamente se propõem às superfícies de suporte de ligando com o potencial para operações de alta capacidade e alta taxa de transferência de massa, produzindo assim a taxa de fluxo independente da ligação com um sistema de alta porosidade e tamanho de poro de superfície relativamente pequeno.

[00011] Cartuchos de adsorvente contendo nanofibras poliméricas eletrofiadas com funcionalidade de dietilaminoetil (DEAE) foram reportados com capacidades de ligação em torno de 10% de um sistema de leito empacotado

típico, mas com taxas de fluxo em torno de cinquenta vezes aquelas de um sistema de leito empacotado típico. Tais sistemas de nanofibra apresentam uma razão de área de superfície para volume similar com aquela de um sistema depositado poroso. No entanto, tais sistemas de nanofibra existentes possuem capacidades de ligação de alguma forma inferiores do que aqueles sistemas de leito empacotado típicos. Sistemas conhecidos de nanofibra também mostram pouca capacidade de reprodução quando a mesma membrana é usada várias vezes. Isto representa um limite na sua utilidade na recuperação de biomoléculas.

[00012] Assim, anteriormente não foi possível preparar sistemas de adsorvente de nanofibra com capacidades de ligação maiores do que cerca de 10% de um sistema de leito empacotado típico enquanto mantém a porosidade e operações que podem ser reproduzidas robustas associadas com tais sistemas de nanofibra.

[00013] A espessura de sistemas de adsorvente de nanofibra produzidos por eletrofiação é limitada durante fabricação já que a deposição das nanofibras em uma superfície de coletor aterrada produz uma superfície menos aterrada quando a deposição aumenta. A carga residual nas fibras depositadas portanto faz aquela área menos atrativa para a deposição continuada resultando nas fibras se espalhando mais sobre a superfície do coletor. Este tem o

efeito de limitar a espessura de esteiras de nanofibra produzidas por eletrofiação até cerca de 100 a 200 µm. A espessura limitada destas esteiras de nanofibra traz com a mesma um limite inerente na resistência física da matriz global que limita os materiais úteis para as aplicações de processo tais como a cromatografia.

[00014] Um sistema de adsorvente de nanofibra conhecido é descrito em Ma, et al, Journal of Membrane Science 265 (2005) 115-123. Este documento descreve um processo para produzir uma membrana de nanofibra de celulose, que envolve tratamento térmico de uma única camada de malha de fibra não tecida consistindo de nanofibras de acetato de celulose, tratando as fibras de acetato de celulose aquecidas com NaOH e funcionalizando as fibras de celulose resultantes com azul Cibacron. Múltiplas membranas podem ser empilhadas, as bordas coladas e a pilha posicionada em um retentor de filtro.

#### Sumário da invenção

[00015] No seu sentido mais vasto, a presente invenção provê processos para preparar meios de cromatografia funcionalizados, processo o qual envolve tratar uma ou mais nanofibras de polímero com um combinação de etapas de processamento físico e químico para produzir um produto funcionalizado que é adequado para o uso como um meio de cromatografia em um método de cromatografia.

[00016] Foi descoberto que uma série específica de etapas de processamento físico e químico aumenta bastante a capacidade de ligação de sistemas de adsorvente de nanofibra, tipicamente aumentando a dita capacidade de ligação em 250% sob condições de operação típicas. Também foi descoberto que certas etapas de processamento físico específicas aprimoram a resistividade química de sistemas de adsorvente de nanofibra. Isto quer dizer que ambos os sistemas de adsorvente da invenção podem ser usados sob condições mais rígidas, e também que os sistemas de adsorvente podem ser usados múltiplas vezes sem perda de desempenho.

[00017] De maneira apropriada, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende

(I) prover duas ou mais folhas de não tecido empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero,

(II) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, e

(III) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia.

[00018] Mais especificamente, pontos de contato de fusão entre as nanofibras de folhas adjacentes envolve pontos de contato de fusão entre seções de uma nanofibra de polímero em uma folha com seções de uma nanofibra de polímero em uma adjacente folha. Tipicamente, isto também envolve pontos de contato de fusão entre seções de uma nanofibra de polímero em uma folha com outras seções da mesma nanofibra.

[00019] A presente invenção também provê:

- Um meio de cromatografia funcionalizado que pode ser obtido pelo processo da presente invenção.
- Um processo para preparar um cartucho de cromatografia, processo o qual compreende realizar o processo da presente invenção e incorporar o produto obtido desta forma em um cartucho.
- Um cartucho de cromatografia que (a) que pode ser obtido pelo dito processo, ou (b) que compreende um ou mais meios de cromatografia funcionalizados da invenção.
- Uso de um meio de cromatografia funcionalizado da invenção ou um cartucho de cromatografia da invenção na cromatografia.
- Um processo para isolar uma ou mais moléculas biológicas a partir de uma fase móvel, processo o qual compreende contatar uma ou mais moléculas biológicas em uma

fase móvel com um meio de cromatografia funcionalizado da invenção ou um cartucho de cromatografia da invenção.

[00020] A presente invenção também provê um processo para preparar um meio polimérico, processo o qual compreende prover duas ou mais folhas de não tecido, como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, como definido aqui, e simultaneamente aquecer e pressionar a pilha de folhas para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui. Também é provido um meio polimérico que pode ser obtido por aquele processo.

#### Breve Descrição das Figuras

[00021] A Figura 1 mostra o desempenho de um meio de cromatografia funcionalizado da invenção em uma cromatografia de troca iônica.

[00022] A Figura 2 mostra o desempenho de um meio de cromatografia funcionalizado da invenção em uma cromatografia de troca iônica.

[00023] A Figura 3 mostra uma configuração experimental para determinar a estabilidade química de membranas de cromatografia.

[00024] A Figura 4 mostra fotografias de uma membrana não de acordo com a invenção e uma membrana de acordo com a invenção seguindo a exposição a NaOH.

[00025] A Figura 5 mostra a espessura e densidades de membranas não de acordo com a invenção e membranas de acordo com a invenção.

[00026] A Figura 6 mostra as propriedades de escoamento das membranas não de acordo com a invenção e membranas de acordo com a invenção.

[00027] A Figura 7 mostra o efeito de pressão na espessura e nas densidades de membranas de acordo com a invenção.

[00028] A Figura 8 mostra o efeito de pressão nas propriedades de escoamento das membranas de acordo com a invenção.

[00029] A Figura 9 mostra o efeito de pressão na capacidade dinâmica de ligação das membranas de acordo com a invenção.

[00030] A Figura 10 mostra o efeito do número de ciclos de funcionalização nas propriedades de escoamento das membranas de acordo com a invenção.

[00031] A Figura 11 mostra o efeito do número de ciclos de funcionalização na capacidade dinâmica de ligação das membranas de acordo com a invenção.

[00032] A Figura 12 mostra as propriedades de eluição de ligação de uma membrana funcionalizada SP da invenção.

[00033] A Figura 13 mostra as propriedades de eluição de ligação de uma membrana funcionalizada CM da invenção.

[00034] A Figura 14 mostra as propriedades de eluição de ligação de uma membrana funcionalizada Q da invenção.

[00035] A Figura 15 mostra as propriedades de eluição de ligação de uma membrana funcionalizada A de proteína da invenção.

[00036] A Figura 16 mostra as propriedades de eluição de ligação de uma membrana funcionalizada com fenil da invenção.

[00037] A Figura 17 mostra fotografias das membranas não de acordo com a invenção seguindo a exposição a NaOH.

[00038] A Figura 18 mostra a espessura e densidades de membranas não de acordo com a invenção e membranas de acordo com a invenção.

[00039] A Figura 19 mostra as propriedades de escoamento das membranas não de acordo com a invenção e membranas de acordo com a invenção.

[00040] A Figura 20 mostra a capacidade dinâmica de ligação das membranas não de acordo com a invenção e membranas de acordo com a invenção.

[00041] A Figura 21 mostra fotografias de uma membrana de acordo com a invenção (imagem de topo) e uma

membrana não de acordo com a invenção (imagem de fundo) seguindo múltiplos ciclos de funcionalização.

#### Descrição Detalhada da invenção

##### Nanofibras de polímero

[00042] Os meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção são formados a partir de uma ou mais nanofibras de polímero. As nanofibras de polímero tipicamente são nanofibras de polímero eletrofiado. Tais nanofibras de polímero eletrofiado são bem conhecidas dos peritos na técnica e condições otimizadas para a sua produção podem ser encontradas em, por exemplo, O. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890, a totalidade do qual é incorporada aqui por referência. Os processos da presente invenção tipicamente compreendem uma etapa inicial de eletrofiação de um polímero para produzir uma ou mais nanofibras de polímero. Isto pode envolver a eletrofiação um polímero para produzir uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero

[00043] Nanofibras de polímero para o uso na presente invenção tipicamente possuem diâmetros médios de 10 nm a 1000 nm. Para algumas aplicações, nanofibras de polímero tendo diâmetros médios de 200 nm a 800 nm são apropriadas. Nanofibras de polímero tendo diâmetros médios de 200 nm a 400 nm podem ser apropriadas para certas aplicações.

[00044] O comprimento de nanofibras de polímero para o uso na presente invenção não está particularmente limitado. Assim, processos de eletrofiação convencionais podem produzir nanofibras de polímero de muitas centenas de metros ou até quilômetros de comprimento. Tipicamente, apesar disso, as uma ou mais nanofibras de polímero possuem um comprimento de até 10 km, preferivelmente de 10 m a 10 km.

[00045] Tipicamente, as uma ou mais nanofibras de polímero são providas na forma de uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero. Uma folha não tecida compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero é uma esteira das ditas uma ou mais nanofibras de polímero com cada nanofibra orientada de maneira essencialmente aleatória, isto é não foi fabricada de forma que a nanofibra ou nanofibras adotam um padrão particular. Folhas de não tecido compreendendo nanofibras de polímero tipicamente são providas pelos métodos conhecidos, tais como aqueles divulgados em O. Hardick, et al, J.Mater.Sci. 46 (2011) 3890. Folhas de não tecido, em certas circunstâncias, podem consistir de uma única nanofibra de polímero. Alternativamente, folhas de não tecido podem compreender duas ou mais nanofibras de polímero, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nanofibras de polímero.

[00046] Folhas de não tecido tipicamente possuem densidades de área de 1 a 40 g/m<sup>2</sup>, preferivelmente de 5 a 25 g/m<sup>2</sup>, em algumas circunstâncias de 1 a 20 ou 5 a 15 g/m<sup>2</sup>.

[00047] Folhas de não tecido tipicamente possuem uma espessura de 5 a 120 µm, preferivelmente de 10 a 100 µm, em algumas circunstâncias de 50 a 90 µm, em outras circunstâncias de 5 a 40, 10 a 30 ou 15 a 25µm.

[00048] O polímero usado para produzir as nanofibras usadas nos processos da presente invenção não está particularmente limitado, provido o polímero é adequado para o uso na cromatografia applications. Assim, tipicamente, o polímero é um polímero adequado para o uso como um meio de cromatografia, isto é um adsorvente, em um método de cromatografia. Polímeros adequados incluem poliamidas tais como nylon, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilonitrila, poliestireno, polisulfonas, policaprolactona, colágeno, quitosana, óxido de polietileno, agarose, acetato de agarose, celulose, acetato de celulose, e combinações do mesmo. Celulose e acetato de celulose são preferidos.

[00049] Tipicamente, o processo da presente invenção é para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, e o processo compreende prover uma ou mais nanofibras de acetato de celulose. Preferivelmente, o

processo compreende prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose. Acetato de celulose é prontamente eletrodepositado e pode ser transformada prontamente em celulose após a eletrofiação. Assim, preferivelmente o processo compreende prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose eletrodepositadas.

#### Modificação física das nanofibras

[00050] Os processos da presente invenção envolvem a modificação física das nanofibras de polímero nas folhas de não tecido, designadamente aquecimento e pressionamento, antes da modificação química. Estas etapas aprimoram a estabilidade estrutural do material. As condições de pressionamento e aquecimento também podem ser variadas para alterar a espessura e/ou a porosidade do material resultante.

[00051] O uso de múltiplas folhas de não tecido de nanofibras de polímero permite que um material mais espesso seja preparado que possui uma maior capacidade para a adsorvância (uma vez funcionalizado). Também foi descoberto que membranas produzidas por aquecimento e pressionamento de múltiplas folhas de não tecido de nanofibras de polímero possuem propriedades aprimoradas se comparadas com pilhas formadas a partir de nanofibras de polímero tratadas com

folhas únicas de calor. Assim, o processo da presente invenção compreende prover duas ou mais folhas de não tecido empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, e simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes. Assim, o processo da presente invenção envolve prover uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido, como definido aqui, na etapa (I) e a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende

(I) prover uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero,

(II) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, e

(III) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia.

[00052] Tipicamente, uma pilha de duas a vinte folhas de não tecido são providas. Em certas circunstâncias, uma pilha de entre cinco e vinte e cinco folhas de não tecido podem ser providas. Em certas circunstâncias, uma pilha de entre 10 e 20 folhas de não

tecido podem ser providas. O número de folhas de não tecido empregado vai afetar a espessura do eventual meio de cromatografia, e a sua permeabilidade aos líquidos. Assim, um meio mais espesso em geral vai ter uma menor permeabilidade do que um meio mais fino. Assim, onde uma alta permeabilidade é necessária, tipicamente um menor número de folhas é empregado. Onde um meio com menor permeabilidade é necessário um maior número de folhas pode ser empregado.

[00053] Para evitar qualquer dúvida, as folhas de não tecido são pressionadas (sob aquecimento) em uma direção paralela com a sua dimensão mais fina. Folhas de não tecido tipicamente vão ter duas dimensões que são muito maiores do que a terceira dimensão, e as folhas são pressionadas paralelas com esta terceira dimensão. Onde duas ou mais folhas de não tecido são providas e pressionadas, as duas ou mais folhas de não tecido são empilhadas uma sobre a outra de forma que elas substancialmente se sobrepõem e a menor dimensão de cada folha não tecida é alinhada. Isto forma uma pilha de folhas que é aquecida e pressionada na sequência. As folhas na pilha se sobrepõem e a menor dimensão de cada folha não tecida é alinhada.

[00054] Tipicamente, o pressionamento das nanofibras de polímero ou folhas de não tecido envolve sujeitar as

mesmas a uma pressão de 0,01 a 5 MPa, mais tipicamente de 0,05 a 3 MPa, por exemplo, de 0,1 a 1 MPa. Pressões adequadas para o uso no processo da presente invenção tipicamente são maiores do que 1 kPa, preferivelmente maiores do que 5 kPa, em algumas circunstâncias maiores do que 10 kPa. Tipicamente, pressões de não mais do que 500 kPa são usadas, preferivelmente não mais do que 200 kPa, mais preferivelmente não mais do que 150 kPa, por exemplo, não mais do que 100 kPa, 50 kPa ou 30 kPa. Faixas de pressão adequadas podem ser, por exemplo, de 1 a 500 kPa, de 5 a 200 kPa, de 5 a 150 kPa, de 5 a 100 kPa de 5 a 50 kPa, ou de 10 a 30 kPa. Pressão pode ser aplicada por qualquer meio adequado. Por exemplo, a pressão pode ser aplicada usando uma prensa manual ou prensa hidráulica. A pressão aplicada pode ser variada para alterar as propriedades físicas do meio. Em geral, uma maior pressão vai resultar em um meio mais robusto, tendo uma menor porosidade e menor espessura. Uma menor pressão tende a produzir um meio comparativamente menos robusto, com uma maior porosidade e maior espessura. Meio de cromatografia mais espesso pode ser preferido quando é desejável maximizar as propriedades de ligação.

[00055] A duração para a qual as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido são pressionadas não está particularmente restrita, e tempos de pressionamento

típicos podem ser determinados por um perito na técnica. Onde as uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido são aquecidas e pressionadas simultaneamente, tipicamente isto é realizado de 1 a 30 minutos, preferivelmente de 1 a 10 minutos, mais preferivelmente de 3 a 7 minutos, ainda mais preferivelmente por cerca de 5 minutos.

[00056] O aquecimento de uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido pode ser efetuado por meios convencionais, por exemplo, usando um forno. Onde as uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido são aquecidas e pressionadas simultaneamente, o aquecimento pode ser efetuado por um pressionador aquecido posicionando as uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido entre pesos, por exemplo, folhas de metal, em um forno aquecido.

[00057] A pilha de folhas de não tecido é aquecida e pressionada para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes.

[00058] Onde duas ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras, são empilhadas uma sobre a outra e sujeitadas às condições de calor e pressão, seções de uma nanofibra de polímero em uma folha podem estar em contato com seções da mesma nanofibra, e/ou com

seções de outras nanofibras na mesma folha não tecida, e/ou com seções das nanofibras em adjacentes folhas de não tecido. Seções das nanofibras nas folhas de não tecido não estão tipicamente em contato com seções das nanofibras em outras folhas de não tecido que não são adjacentes.

[00059] Assim, o aquecimento e o pressionamento de uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido pode fundir pontos de contato entre seções de uma nanofibra em uma folha com outras seções da mesma nanofibra, e/ou entre seções de uma nanofibra em uma folha com seções de outra nanofibra (se estiver presente) na mesma folha não tecida, e/ou entre seções de uma nanofibra em uma folha com seções de uma nanofibra em uma adjacente folha não tecida. Tipicamente, simultaneamente aquecendo e pressionando duas ou mais folhas de não tecido funde pontos de contato entre seções de uma nanofibra de polímero em uma folha com seções de uma nanofibra de polímero em uma adjacente folha. Preferivelmente, simultaneamente aquecendo e pressionando duas ou mais folhas de não tecido funde pontos de contato entre seções de uma nanofibra de polímero em uma folha com outras seções da mesma nanofibra, e funde pontos de contato entre seções da nanofibra de polímero na folha com seções de uma nanofibra de polímero em uma adjacente folha. Mais preferivelmente, aquecer e pressionar duas ou mais folhas de não tecido funde pontos de contato entre seções de uma

nanofibra em uma folha com outras seções da mesma nanofibra, e entre seções de uma nanofibra em uma folha com seções de outra nanofibra (se estiver presente) na mesma folha não tecida, e/ou entre seções de uma nanofibra com seções de uma nanofibra em uma adjacente folha não tecida. Ainda mais preferivelmente, aquecer e pressionar duas ou mais folhas de não tecido funde pontos de contato entre seções de uma nanofibra em uma folha com outras seções da mesma nanofibra, e entre seções da nanofibra na folha com seções de outra nanofibra (se estiver presente) na mesma folha não tecida, e entre seções da nanofibra na folha com seções de uma nanofibra em uma adjacente folha não tecida.

[00060] Em um exemplo simples onde duas folhas de não tecido são providas, cada folha não tecida contendo uma única nanofibra de polímero, aquecer e pressionar a primeira e a segunda e folhas de não tecido preferivelmente fundem pontos de contato entre seções da nanofibra de polímero na primeira folha não tecida com outras seções da nanofibra de polímero na primeira folha não tecida, e entre seções da nanofibra de polímero na primeira folha não tecida com seções da nanofibra de polímero na segunda folha não tecida, e tipicamente também entre seções da nanofibra de polímero na segunda folha não tecida com outras seções da nanofibra de polímero na segunda folha não tecida.

[00061] Tipicamente, as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido são aquecidas até uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero. O uso de uma maior temperatura pode resultar na destruição de uma estrutura de nanofibra. Em algumas circunstâncias é vantajoso usar uma temperatura que está abaixo da temperatura de transição vítreia do polímero. Em outras circunstâncias uma temperatura acima da temperatura de transição vítreia do polímero pode ser usada. Os pontos de fusão e as temperaturas de transição vítreia de polímeros adequados para o uso nos processos reivindicados são bem conhecidos dos peritos.

[00062] Tipicamente, as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido são aquecidas até uma temperatura entre uma temperatura em que pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero começam a fundir e o ponto de fusão do polímero. Preferivelmente, as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido são aquecidas até uma temperatura entre uma temperatura em que pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero começam a fundir e a temperatura de transição vítreia do polímero.

[00063] Tipicamente, uma temperatura maior do que 40°C, preferivelmente 30°C, mais preferivelmente 20°C, abaixo do ponto de fusão do polímero é usada. Tipicamente, uma temperatura de não mais do que 1°C, preferivelmente

2°C, mais preferivelmente 5°C, abaixo do ponto de fusão do polímero é usada. Assim, tipicamente uma faixa de temperatura é usada a partir de 40°C abaixo do ponto de fusão do polímero para 1°C abaixo do ponto de fusão do polímero, preferivelmente de 30°C abaixo do ponto de fusão do polímero para 2°C abaixo do ponto de fusão do polímero, mais preferivelmente de 20°C abaixo do ponto de fusão do polímero para 5°C abaixo do ponto de fusão do polímero.

[00064] No caso onde o polímero é acetato de celulose, as nanofibras de acetato de celulose ou folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, são aquecidas até ou em uma temperatura entre 190 a 220°C, preferivelmente de 195 a 218°C, por exemplo, de 195 a 215°C, 195 a 210°C, 190 a 210°C, 195 a 205°C ou 210 a 215°C. Outras faixas de temperatura adequadas que podem ser usadas incluem 200 a 220°C, preferivelmente de 205 a 218°C, por exemplo, de 205 a 210°C ou 210 a 215°C. Onde as nanofibras de acetato de celulose ou folhas de acetato de celulose não tecidas são aquecidas e pressionadas simultaneamente, uma temperatura entre 190 a 220°C tipicamente é empregada, por exemplo, de 190 a 210°C, 195 a 218°C, 195 a 215°C, 195 a 210°C, 195 a 205°C, 210 a 215°C, 200 a 220°C, 205 a 218°C, ou 205 a 210°C, em algumas circunstâncias cerca de 207°C.

[00065] As nanofibras de polímero ou folhas de não tecido tipicamente são aquecidas para de 1 a 120 minutos, por exemplo, de 5 a 60 minutos. Onde as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido são aquecidas e pressionadas simultaneamente, aquecimento tipicamente é realizado por de 1 a 30 minutos, preferivelmente de 1 a 10 minutos, mais preferivelmente de 3 a 7 minutos, ainda mais preferivelmente por cerca de 5 minutos .

[00066] Tipicamente, as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido possuem um tamanho de poro médio após pressionar e aquecer, isto é o produto pressionado resultante e aquecido, de 0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$ , preferivelmente de 0,3 a 0,9  $\mu\text{m}$ , mais preferivelmente de 0,4 a 0,8  $\mu\text{m}$ , ainda mais preferivelmente de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$ , ainda mais preferivelmente de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$ , por exemplo, de 0,6 a 0,65 $\mu\text{m}$ .

[00067] Tipicamente, as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido possuem uma densidade média após pressionar e aquecer, isto é o produto pressionado resultante e aquecido, de 200 a 1000  $\text{kg}/\text{m}^3$ , preferivelmente 250 a 750  $\text{kg}/\text{m}^3$ , mais preferivelmente de 350 a 650  $\text{kg}/\text{m}^3$ , em algumas circunstâncias de 450 a 550  $\text{kg}/\text{m}^3$ . Outras densidades preferíveis incluem de 200 a 750  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 200 a 650  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 200 a 550  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 250 a 750  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 250 a 650  $\text{kg}/\text{m}^3$ , e 250 a 550  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

[00068] As nanofibras de polímero ou folhas de não tecido comumente são aquecidas e pressionadas simultaneamente. Algumas modalidades podem envolver pressionar as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido então aquecendo subsequentemente as mesmas; ou aquecendo as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido então subsequentemente pressionando as mesmas. Onde as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido são aquecidas e pressionadas simultaneamente, aquecer e pressionar tipicamente é realizada em uma prensa aquecida ou posicionando as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido entre pesos, por exemplo, folhas de metal, em um forno aquecido.

[00069] O processo da presente invenção também pode envolver molhar as nanofibras de polímero ou folhas de não tecido antes do pressionamento e do aquecimento. Assim, o processo pode envolver uma etapa adicional entre as etapas (I) e (II) de molhar as pilhas de folha. Alternativamente, o processo pode envolver formar uma pilha de folhas de não tecido molhadas na etapa (I). Um solvente orgânico opcionalmente aquoso tipicamente é usado para molhar as nanofibras de polímero/folhas de não tecido/pilha de folhas, preferivelmente um solvente orgânico aquoso. Solventes orgânicos tipicamente são escolhidos de forma a não dissolver as nanofibras de polímero. Um perito estará a

par de quais solventes podem ser usados de forma a não dissolver nanofibras de polímero. Alcoóis são preferíveis como o solvente orgânico, por exemplo, metanol, etanol ou isopropanol, preferivelmente etanol. Etanol aquoso é preferido em alguns casos. Assim, algumas modalidades podem envolver molhar, seguindo pelo aquecimento e o pressionamento simultaneamente. Outras modalidades podem envolver molhar, seguido pelo pressionamento seguido do aquecimento. Mais algumas modalidades podem envolver molhar, seguido por aquecer, seguido por pressionar.

[00070] Tipicamente, as nanofibras de polímero ou folhas pressionadas ou aquecidas, isto é o produto pressionado e aquecido, possuem uma espessura de 0,05 a 10 mm, por exemplo, 0,1 a 5 mm.

[00071] Em algumas modalidades, o processo da presente invenção compreende prover uma ou mais nanofibras de polímero, pressionamento como uma ou mais nanofibras de polímero e aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero. Preferivelmente, o processo da presente invenção compreende prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, pressionando as uma ou mais folhas de não tecido e aquecendo as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras

de polímero. A fusão de pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero se refere às uma ou mais nanofibras de polímero contidas nas uma ou mais folhas de não tecido.

[00072] Em algumas modalidades, o processo da presente invenção envolve molhar como definido aqui e pressionar uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, seguido pelo subsequente aquecimento como definido aqui. Condições de umedecimento, pressionamento e aquecimento típicas são como definidas acima. Assim nesta modalidade, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende

(I) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui,

(II) molhar as pilhas de folha com um solvente orgânico opcionalmente aquoso como definido aqui,

(III) pressionar as pilhas de folha como definido aqui,

(IV) aquecer a pilha pressionada para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui, e

(V) contatar o produto pressionado e aquecido molhado com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia como definido aqui.

#### Modificação química das nanofibras

[00073] Os processos da presente invenção tipicamente envolvem modificação química das uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido para funcionalizar as mesmas para o uso na cromatografia. Na sua forma mais simples esta envolve contatar as uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido (que podem ser pressionadas e aquecidas) com um reagente para funcionalizar o produto como um meio de cromatografia.

[00074] Opcionalmente, antes desta etapa de contatar com um reagente, as uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido (que podem ser pressionadas e aquecidas) podem ser tratadas para ativar desprotetor qualquer grupo funcional no polímero.

[00075] A desproteção dos grupos funcionais tipicamente é efetuada de forma que os grupos funcionais podem reagir com o reagente. Por exemplo, quando o polímero é celulose, tipicamente uma ou mais nanofibras de acetato de celulose ou folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, é provida e,

antes de contatar com um reagente, o acetato de celulose é tratado para converter o mesmo para celulose. Este envolve a desproteção de grupos hidroxila acetilados para originar grupos hidroxila. Conversão de acetato de celulose para celulose tipicamente é efetuada usando alcalino aquoso, preferivelmente NaOH em água:etanol, mais preferivelmente água:etanol 2:1, por um período maior do que 12hrs, por exemplo, de 12 a 36 horas. Esta etapa tipicamente ocorre após as uma ou mais nanofibras de acetato de celulose ou folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, foram pressionadas e aquecidas. Alternativamente, esta etapa pode ser realizada antes como uma ou mais nanofibras de acetato de celulose ou folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, foram pressionadas e aquecidas. A ativação de grupos funcionais é discutida adicionalmente abaixo.

[00076] O reagente tipicamente funcionaliza o meio de cromatografia introduzindo uma ou mais porções que fazem o produto funcionalizado compreendendo as uma ou mais porções adequadas para o uso como um meio de cromatografia. As uma ou mais porções introduzidas vão depender da técnica de cromatografia particular para a qual o meio deve ser usado. Porções e reagentes adequados são discutidos adicionalmente abaixo. Tipicamente, o reagente reage com um

ou mais grupos funcionais presentes nas uma ou mais nanofibras de polímero, tipicamente contidos dentro de uma ou mais folhas de não tecido, para criar as uma ou mais porções. Grupos funcionais típicos incluem grupos hidroxila, amino e carboxi. Assim, tipicamente um ou mais grupos hidroxila, amino e/ou carboxi são funcionalizados no processo da presente invenção.

[00077] Apesar de a presente invenção visualizar processos que envolvem apenas um único tratamento com um reagente, processos que envolvem múltiplas etapas de funcionalização são preferidos. Tais processos podem levar aos produtos com propriedades de ligação aprimoradas.

[00078] Assim, tipicamente, funcionalização por contato com um reagente é efetuado contatando de um modo em batelada duas ou mais vezes com um reagente. Funcionalização em batelada quer dizer que o material de nanofibra de polímero (que foi opcionalmente pressionado, aquecido, desprotegido e/ou ativado) é reagido com um reagente para funcionalizar o mesmo, que a reação então é parada e o material (parcialmente) funcionalizado resultante reagido com uma batelada separada de reagente. A reação de um modo em batelada não se refere simplesmente à adição de mais porções de reagente para um vaso de reação, por exemplo.

[00079] Funcionalização em batelada tipicamente é realizada a partir de duas a dez vezes, isto é 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 vezes. Preferivelmente funcionalização em batelada é realizada entre duas a quatro vezes.

[00080] Cada etapa de contatar com um reagente de um modo em batelada tipicamente compreende

(a) contatar com o reagente, (b) isolar o produto da etapa (a) a partir do reagente, (c) opcionalmente tratar o produto da etapa (b) com alcalino aquoso, e (d) opcionalmente lavar o produto da etapa (b) / (c) com água. Preferivelmente, cada etapa de contatar com um reagente de um modo em batelada compreende (a) contatar com o reagente, (b) isolar o produto da etapa (a) a partir do reagente, (c) tratar o produto da etapa (b) com alcalino aquoso, e (d) opcionalmente lavar o produto da etapa (b) / (c) com água. Mais preferivelmente, cada etapa de contatar com um reagente de um modo em batelada compreende (a) contatar com o reagente, (b) isolar o produto da etapa (a) a partir do reagente, (c) tratar o produto da etapa (b) com alcalino aquoso, e (d) lavar o produto da etapa (b) / (c) com água.

[00081] As etapas de tratar com alcalino aquoso tipicamente empregam alcalino aquoso quente, isto é entre 70 e 90°C. Alternativamente, a etapa de tratar com alcalino aquoso pode ser realizada em temperatura ambiente.

[00082] O reagente usado em cada etapa de contatar com um reagente de um modo em batelada pode ser o mesmo ou diferente, mas preferivelmente é o mesmo.

[00083] Em circunstâncias onde entre duas e quatro etapas de contatar com um reagente de um modo em batelada são empregadas, as uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, que podem ter sido pressionadas, aquecidas e/ou desprotegidas, tipicamente são tratadas por

- (1) (a1) contatar com o reagente, (b1) isolar o produto da etapa (a1) a partir do reagente, (c1) opcionalmente tratar o produto da etapa (b1) com alcalino aquoso, e (d1) opcionalmente lavar o produto da etapa (b1)/(c1) com água, e

- (2) (a2) contatar o produto da etapa (b1)/(c1)/(d1) com o reagente, (b2) isolar o produto da etapa (a2) a partir do reagente, (c2) opcionalmente tratar o produto da etapa (b2) com alcalino aquoso, e (d2) opcionalmente lavar o produto da etapa (b2)/(c2) com água; ou

- (1) (a1) contatar com o reagente, (b1) isolar o produto da etapa (a1) a partir do reagente, (c1) opcionalmente tratar o produto da etapa (b1) com alcalino

aquoso, e (d1) opcionalmente lavar o produto da etapa (b1) / (c1) com água,

- (2) (a2) contatar o produto da etapa (b1) / (c1) / (d1) com o reagente, (b2) isolar o produto da etapa (a2) a partir do reagente, (c2) opcionalmente tratar o produto da etapa (b2) com alcalino aquoso, e (d2) opcionalmente lavar o produto da etapa (b2) / (c2) com água, e

- (3) (a3) contatar o produto da etapa (b2) / (c2) / (d2) com o reagente, (b3) isolar o produto da etapa (a3) a partir do reagente, (c3) opcionalmente tratar o produto da etapa (b3) com alcalino aquoso, e (d3) opcionalmente lavar o produto da etapa (b3) / (c3) com água; ou

- (1) (a1) contatar com o reagente, (b1) isolar o produto da etapa (a1) a partir do reagente, (c1) opcionalmente tratar o produto da etapa (b1) com alcalino aquoso, e (d1) opcionalmente lavar o produto da etapa (b1) / (c1) com água,

- (2) (a2) contatar o produto da etapa (b1) / (c1) / (d1) com o reagente, (b2) isolar o produto da etapa (a2) a partir do reagente, (c2) opcionalmente tratar o produto da etapa (b2) com alcalino aquoso, e (d2) opcionalmente lavar o produto da etapa (b2) / (c2) com água,

- (3) (a3) contatar o produto da etapa (b2) / (c2) / (d2) com o reagente, (b3) isolar o produto da etapa (a3) a partir do reagente, (c3) opcionalmente tratar o produto da etapa (b3) com alcalino aquoso, e (d3) opcionalmente lavar o produto da etapa (b3) / (c3) com água, e

- (4) (a4) contatar o produto da etapa (b3) / (c3) / 0 (d3) com o reagente, (b4) isolar o produto da etapa (a4) a partir do reagente, (c4) opcionalmente tratar o produto da etapa (b4) com alcalino aquoso, e (d4) opcionalmente lavar o produto da etapa (b4) / (c4) com água.

Tipicamente, cada etapa de contatar com um reagente de um modo em batelada compreende tratar com o reagente por entre 1 e 20 minutos.

[00084] Em certas circunstâncias, contatar com um reagente pode compreender posicionar uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, que podem ter sido pressionadas, aquecidas, desprotegidas e/ou ativadas (isto é o material de polímero) em um retentor, e fazendo com que um reagente escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o material de polímero que funcionaliza o material de polímero como um meio de cromatografia. A funcionalização de material de polímero desta maneira em certas circunstâncias pode ser

mais eficiente do que simplesmente contatar o material de polímero com o reagente, em um frasco ou béquer, por exemplo.

[00085] Tipicamente, o retentor é um retentor de filtro adaptado para reter o material de polímero. Tipicamente, o retentor de filtro retém o material de polímero tal que uma substância líquida ou aquosa que é passada através do retentor de filtro escoa em contato com o material de polímero. Assim, no contexto da presente invenção, o retentor de filtro preferivelmente retém o material de polímero tal que um reagente que é feito escoar através do retentor de filtro escoa em contato com o material de polímero.

[00086] Tipicamente, o reagente é feito escoar através do retentor sob pressão.

[00087] Tipicamente, o reagente é feito escoar através do retentor usando uma bomba, preferivelmente uma bomba de HPLC.

[00088] Tipicamente, o reagente é feito escoar através do retentor de uma maneira cíclica. Assim, qualquer reagente que sai do retentor é reciclado e passado através do retentor uma ou mais vezes.

[00089] Tipicamente, o reagente é feito escoar através do retentor para um período de tempo de 1 a 20 minutos.

[00090] Tipicamente, o reagente é feito escoar através do retentor em uma taxa de 10 a 100 mL/min.

[00091] Tipicamente, após o reagente ter sido feito escoar através do retentor o produto resultante é tratado com alcalino aquoso, e opcionalmente lavado com água. Preferivelmente, após o reagente ter sido feito escoar através do retentor o produto resultante é tratado com alcalino aquoso, e lavado com água. Tratamento com alcalino aquoso preferivelmente é tratamento com alcalino aquoso quente como definido acima. Tipicamente, após o reagente ter sido feito escoar através do retentor o produto resultante é removido do retentor antes de qualquer etapa de tratamento adicional. Assim, preferivelmente, após o reagente ter sido feito escoar através do retentor o produto resultante é removido do retentor, tratado com alcalino aquoso, e opcionalmente lavado com água. Mais preferivelmente, após o reagente ter sido feito escoar através do retentor o produto resultante é removido do retentor, tratado com alcalino aquoso, e lavado com água.

[00092] O reagente funcionaliza o produto das etapas anteriores de processamento físico e químico para produzir um meio de cromatografia, especificamente um meio de cromatografia funcionalizado. Tipicamente, o reagente funcionaliza o produto das etapas anteriores de forma que é adequado para o uso em um método de cromatografia de troca

iônica, de captura por afinidade ou hidrofóbico. Assim, contatar com o reagente tipicamente produz um meio de cromatografia que é funcionalizado com uma ou mais porções que são carregadas de maneira negativa, uma ou mais porções que são carregadas de maneira positiva, uma ou mais proteínas, ligandos sintéticos ou miméticos que imitam a ação de ligandos de proteína, peptídeos, anticorpos ou fragmentos do mesmo, corantes, histidina, grupos contendo um cátion de metal, ou grupos hidrofóbicos. Exemplos de tais grupos são definidos adicionalmente abaixo. Reagentes adequados para introduzir tais grupos serão evidentes para o perito. 2-cloro-N,N-dietilamina hidrocloreto (DEACH) glicidiltrimetil amônio são preferidos como o reagente, particularmente quando o meio de cromatografia funcionalizado é para o uso em um método de cromatografia de troca aniônica. Outros reagentes preferidos são TEMPO seguido por perclorato de sódio, ou alil glicidil éter seguido por dissulfito de sódio, particularmente quando o meio de cromatografia funcionalizado é para o uso um método de cromatografia de troca catiônica. Outro reagente preferido é NaIO<sub>4</sub> seguido por Proteína A, particularmente quando o meio de cromatografia funcionalizado é para o uso em um método de cromatografia por afinidade. Outro reagente preferido é óxido de estireno, particularmente quando o

meio de cromatografia funcionalizado é para o uso em um método de cromatografia hidrofóbico.

#### Meio de cromatografia e métodos

[00093] Os produtos do processo da presente invenção são meios de cromatografia funcionalizados, isto é meio de cromatografia que foi modificado quimicamente para tornar os mesmos adequados para o uso em um ou mais métodos de cromatografia. Modificações químicas específicas são discutidas em maior detalhe abaixo. Em termos gerais, tal modificação química muda as propriedades químicas e/ou físicas do meio de cromatografia. Isto por sua vez afeta como o meio de cromatografia se comporta quando usado em um método de cromatografia. As modificações, por exemplo, podem mudar a polaridade, hidrofobicidade ou propriedades de ligação biológica do meio de cromatografia funcionalizado comparado com a sua forma não funcionalizada. As modificações, em certas circunstâncias, podem mudar mais do que um da polaridade, da hidrofobicidade ou das propriedades de ligação biológica do meio de cromatografia funcionalizado comparado com a sua forma não funcionalizada. Em uma modalidade, a modificação altera a polaridade e hidrofobicidade do meio de cromatografia funcionalizado comparado com a sua forma não funcionalizada.

[00094] O meio de cromatografia tipicamente está na forma das membranas. Tais membranas são adequadas para o uso em métodos de cromatografia de membrana. Métodos de cromatografia de membrana são bem conhecidos dos peritos na técnica e são discutidos em "Membrane Processes in Biotechnologies and Pharmaceutics" ed. Catherine Charcosset, Elsevier, 2012, a totalidade do qual é incorporada aqui por referência.

[00095] Tipicamente, o meio de cromatografia de polímero funcionalizado é adequado para o uso em métodos de cromatografia escolhidos a partir de cromatografia de troca iônica, cromatografia de captura por afinidade, cromatografia hidrofóbica e cromatografia de modo misto. Em certas circunstâncias, o método de cromatografia opera em "modo misto", isto é usando mais do que uma forma de interação, isto é troca iônica, captura por afinidade e interação hidrofóbica. Tipicamente, tal cromatografia de "modo misto" envolve troca iônica (iônica) e interações hidrofóbicas. Preferivelmente, o meio de cromatografia de polímero funcionalizado é adequado para o uso em métodos de cromatografia escolhidos a partir de cromatografia de troca iônica, cromatografia de captura por afinidade, e cromatografia hidrofóbica. Em operação, tais métodos de cromatografia envolvem passar uma fase móvel contendo a molécula desejada por uma fase de adsorvente, aqui os meios

de cromatografia funcionalizados. A fase de adsorvente tipicamente é escolhida tal que a molécula desejada é retida nos mesmos de preferência para outros componentes também presentes na fase móvel.

[00096] Tipicamente, o polímero meio de cromatografia é funcionalizado com DEAE, Q, SP, CM, Proteína A, fenil, ou grupos MEP, por exemplo, grupos DEAE ou CM. Em geral, o polímero é celulose e o meio de cromatografia é funcionalizado com DEAE, Q, SP, CM, Proteína A, fenil, ou grupos MEP, por exemplo, grupos DEAE ou CM. Assim, o meio de cromatografia funcionalizado pode ser derivatizado com celulose com DEAE, Q, SP, CM, Proteína A, fenil, ou grupos MEP, por exemplo, grupos DEAE ou CM.

[00097] Cromatografia de troca iônica é uma técnica para separar moléculas, tipicamente íons ou moléculas polares, com base na sua carga iônica. Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em tais métodos portanto contêm uma ou mais porções que são carregadas de maneira positiva ou negativa. Cargas positivas e/ou negativas nos meios de cromatografia funcionalizados são comumente equilibrados com um ou mais contra íons. Cromatografia de troca iônica envolve um ou mais de cromatografia de troca catiônica e uma cromatografia de troca iônica.

[00098] Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em cromatografia de troca catiônica contêm uma ou mais porções que são carregadas de maneira negativa. Porções carregadas de maneira negativa típicas incluem um ou mais grupos carboxilato, sulfonato ou fosfonato, ou misturas dos mesmos, isto é as porções tipicamente contêm um ou mais  $-COO^-$ ,  $-SO_3^-$ , ou

[00099] grupos  $-P(OH)_2O^-$ , ou misturas dos mesmos. Meios de cromatografia funcionalizados típicos para o uso em cromatografia de troca catiônica contêm um ou mais  $-O-CH_2COO^-$ ,

[000100] porções  $-CH_2COO^-$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$ ,  $-CH_2CH_2SO_3^-$ , ou  $-P(OH)_2O^-$ .

[000101] Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em uma cromatografia de troca iônica contêm uma ou mais porções que são carregadas de maneira positiva. Porções carregadas de maneira positiva típicas incluem um ou mais grupos amina quaternários. Meios de cromatografia funcionalizados típicos para o uso em uma cromatografia de troca iônica contêm uma ou mais porções  $-N+(CH_3)_3$ ,  $-N+(C_2H_5)H$ ,  $-CH_2CH_2N+(C_2H_5)H$ ,  $-CH_2CH_2N+(C_2H_5)_2(CH_2CH(OH)CH_3)$ ,  $-O-CH_2CH_2-N+(CH_3)_3$ ,  $-CH_2CH_2N+(CH_3)_3$ , ou  $-CH_2CH_2N+(CH_3)_2H$ .

[000102] Cromatografia de captura por afinidade é uma técnica para separar moléculas com base na sua afinidade a particulares ligandos, comumente mas não sempre ligandos

biológicos. Este método, por exemplo, pode confiar nas forças atrativas entre anticorpos e antígenos ou enzimas e substratos. Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em cromatografia de captura por afinidade tipicamente contêm uma ou mais porções escolhido a partir de uma ou mais proteínas, peptídeos, anticorpos ou fragmentos do mesmo, corantes, histidina, ou grupos contendo um cátion de metal. Alternativamente, meios de cromatografia funcionalizados para o uso em cromatografia de captura por afinidade pode conter ligandos sintéticos ou miméticos que imitam a ação de ligandos de proteína.

[000103] Proteínas típicas para o uso em cromatografia de captura por afinidade são bem conhecidos dos peritos na técnica e incluem Proteína A, Proteína G e Proteína L.

[000104] Anticorpos e fragmentos do mesmo típicos para o uso em cromatografia de captura por afinidade são bem conhecidos dos peritos na técnica e incluem IgG.

[000105] Corantes típicos para o uso em cromatografia de captura por afinidade são bem conhecidos dos peritos na técnica e incluem Amarelo HE-4R, Vermelho HE-3B e Cibacron Azul F3G.

[000106] Grupos contendo cátions de metal típicos para o uso em cromatografia de captura por afinidade são bem conhecidos dos peritos na técnica. Tais grupos

tipicamente contém um agente quelante para imobilizar cátions de metal. O cátion de metal tipicamente é escolhido a partir de cátions de cobre, níquel, zinco e cobalto, preferivelmente  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ .

[000107] Cromatografia por interação hidrofóbica é uma técnica para separar moléculas com base na sua hidrofobicidade. Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em tais métodos portanto contêm uma ou mais porções que contêm um ou mais grupos hidrofóbicos. Grupos hidrofóbicos típicos incluem grupos propil, butil, fenil, e octil.

[000108] Cromatografia de modo misto (ou multimodal) é uma técnica para separar moléculas com base em duas ou mais características, tipicamente hidrofobicidade e carga iônica. Isto pode envolver um combinação de propriedades de hidrofobicidade e aniônicas, ou um combinação de propriedades de hidrofobicidade e catiônicas. Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em tais métodos portanto tipicamente contêm uma ou mais porções que são carregadas de maneira positiva ou negativa, tipicamente como definido acima, e que contêm um ou mais grupos hidrofóbicos, tipicamente como definido acima. Cargas positivas e/ou negativas nos meios de cromatografia funcionalizados são comumente equilibrados com um ou mais contra íons. Meios de cromatografia funcionalizados para o

uso em tais métodos também podem conter um ou mais grupos hidrofóbicos que podem ser ionizados, para o uso em assim chamada Cromatografia de Indução de Carga Hidrofóbica (HCIC). Assim, em uma modalidade, cromatografia de modo misto é Cromatografia de Indução de Carga Hidrofóbica. Grupos adequados para o uso em tais métodos são grupos 4-mercапto-etyl-piridina (MEP) e grupos octilamina.

[000109] Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em método de cromatografia de modo mistos que envolvem um combinação de interações hidrofóbicas e aniônicas contêm uma ou mais porções que são carregadas de maneira positiva, tipicamente como definido acima, e um ou mais grupos hidrofóbicos, tipicamente como definido acima. Grupos adequados para o uso em tais métodos são grupos N-benzil metil etanolamina e grupos N-benzoil-homocisteína. Meios de cromatografia funcionalizados para o uso em método de cromatografia de modo mistos que envolvem um combinação de interações hidrofóbicas e catiônicas contêm uma ou mais porções que são carregadas de maneira negativa, tipicamente como definido acima, e um ou mais grupos hidrofóbicos, tipicamente como definido acima. Grupos adequados para o uso em tais métodos são grupos N-benzoil-homocisteína.

[000110] Os processos reivindicados na presente invenção para preparar meios de cromatografia funcionalizados tipicamente envolvem a introdução de uma ou

mais porções em um meio de cromatografia tal que o resultante produto funcionalizado compreendendo as uma ou mais porções é adequado para o uso como um meio de cromatografia em um método de cromatografia. Porções, meios, reagentes e métodos típicos são como definidos acima. As uma ou mais porções são introduzidas reagindo um reagente com um ou mais grupos funcionais contidos nas uma ou mais nanofibras de polímero ou uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero, que tipicamente foram pressionados, aquecidos, desprotegidos e/ou ativados. Grupos funcionais típicos incluem grupos hidroxila, amino e carboxila.

[000111] Os um ou mais grupos funcionais podem ser ativados antes da reação com um reagente. Métodos de ativação convencionais conhecidos na técnica podem ser empregados. Assim, no caso onde o grupo funcional é um grupo hidroxila, tal grupo pode ser ativado tratando com carbonil diimidazol (CDI), bisoxiranos, ácido cianúrico, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) ou 2-fluoro-1-metil piridinio tolueno-4 sulfonato (FMP). No caso onde o grupo funcional é um grupo amino, tal grupo pode ser ativado tratando com epicloridrina, glutaraldeído ou epóxido. No caso onde o grupo funcional é um grupo carboxila, tal grupo pode ser ativado tratando com CDI ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

[000112] Um perito pode escolher reagentes adequados para introduzir porções particulares para particulares polímeros, por exemplo, com base nos grupos funcionais contidos nestes polímeros. Reagentes típicos incluem 2-cloro-N,N-dietilamina hidrocloreto (DEACH) .

[000113] Tipicamente,

[000114] - o método de cromatografia é um método de troca catiônica, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo carboxilato, sulfonato ou fosfonato;

[000115] - o método de cromatografia é um método de troca aniônica, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo dietilamina ou amino quaternário;

[000116] - o método de cromatografia é um método de cromatografia de captura por afinidade, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com uma proteína, peptídeo, anticorpo ou fragmento do mesmo, corante, histidina, ou grupo contendo um cátion de metal;

[000117] - o método de cromatografia é a interação hidrofóbica método de cromatografia, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo propil, butil, fenil, ou octil; ou

[000118] - o método de cromatografia é um método de cromatografia de modo misto, e o reagente funcionaliza o

meio de cromatografia com um grupo MEP, octilamina, N-benzil metil etanolamina ou N-benzoil-homocisteína.

[000119] Preferivelmente,

[000120] - o método de cromatografia é um método de troca catiônica, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo carboxilato, sulfonato ou fosfonato;

[000121] - o método de cromatografia é um método de troca aniônica, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo dietilamina ou amino quaternário;

[000122] - o método de cromatografia é um método de cromatografia de captura por afinidade, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com uma proteína, peptídeo, anticorpo ou fragmento do mesmo, corante, histidina, ou grupo contendo um cátion de metal; ou

[000123] - o método de cromatografia é a interação hidrofóbica método de cromatografia, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo propil, butil, fenil, ou octil; ou

[000124] Modalidades particulares do processo da invenção

[000125] No seu sentido mais vasto, a presente invenção provê processos para preparar meios de cromatografia funcionalizados, processo o qual envolve

tratar uma ou mais nanofibras de polímero com um combinação de etapas de processamento físico e químico para produzir um produto funcionalizado que é adequado para o uso como um meio de cromatografia em um método de cromatografia.

[000126] Tipicamente, as uma ou mais nanofibras de polímero são como definidas aqui. As uma ou mais nanofibras de polímero podem ser providas como uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero. Tipicamente, duas ou mais folhas de não tecido são providas, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero.

[000127] Tipicamente, as etapas de processamento físico são as etapas de aquecer e pressionar como definido aqui. Tipicamente, as etapas de aquecer e pressionar são realizadas simultaneamente.

[000128] Tipicamente, as etapas de processamento químico são as etapas de contatar com um reagente como definido aqui.

[000129] Tipicamente, o método de cromatografia é como definido aqui.

[000130] A presente invenção tipicamente provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra e cada compreendendo uma ou mais

nanofibras de polímero como definido aqui, (II) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui, e (III) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000131] Em uma modalidade preferida da invenção, a etapa de funcionalizar com um reagente é realizada de um modo em batelada. Isto aumenta a capacidade de ligação do resultante meio de cromatografia polimérico funcionalizado. Assim, na modalidade preferida, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra e cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui, e (III) contatar o produto da etapa (II) de um modo em batelada pelo menos duas vezes com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000132] Em uma modalidade adicionalmente preferida da invenção, a etapa de funcionalizar com um reagente é realizada pelo fluxo convectivo. Tal processo tipicamente é mais eficiente do que um processo difusivo padrão. Assim, nesta modalidade preferida adicional, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra e cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui, e (III) posicionar o produto da etapa (II) em um retentor como definido aqui, e (IV) fazer com que um reagente como definido aqui escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto da etapa (II) que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000133] É preferido que o meio de cromatografia de polímero funcionalizado é um meio de cromatografia de celulose funcionalizado.

[000134] Em uma modalidade mais preferida da invenção, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover duas

ou mais folhas de não tecido como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra e cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (ii) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de acetato de celulose de folhas adjacentes como definido aqui, (iii) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose como definido aqui, e (iv) contatar o produto obtido desta forma com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (iii) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000135] Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra e cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (ii) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de acetato de celulose de camadas adjacentes como definido aqui, (iii) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose como definido aqui, e (iv) contatar o produto obtido desta forma de um

modo em batelada entre duas a quatro vezes com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (iii) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000136] Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, empilhadas uma sobre a outra e cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (ii) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de acetato de celulose de folhas adjacentes como definido aqui, (iii) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose como definido aqui, (iv) posicionar o produto obtido desta forma em um retentor como definido aqui, e (v) fazer com que um reagente como definido aqui escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto obtido na etapa (iii) que funcionaliza o produto da etapa (iii) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000137] É preferido que entre duas e trinta, mais preferivelmente entre cinco e vinte e cinco das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I), cada

folha compreendendo 1, 2 ou 3 nanofibras de polímero e cada folha tendo uma espessura de 5 a 40  $\mu\text{m}$ .

[000138] Também é preferido na etapa (II) que as pilhas de folha sejam aquecidas simultaneamente em uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero e pressionadas sob uma pressão de 0,01 a 5 MPa por 1 a 120 minutos para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, o produto pressionado resultante e aquecido tendo uma densidade média de 250 a 750 kg/m<sup>3</sup> e uma espessura de 0,05 a 10 mm.

[000139] É mais preferido que:

[000140] - entre duas e trinta, mais preferivelmente entre cinco e vinte e cinco das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I), cada folha compreendendo 1, 2 ou 3 nanofibras de polímero e cada folha tendo uma espessura de 5 a 40  $\mu\text{m}$ ; e

[000141] - na etapa (II) que as pilhas de folha sejam aquecidas simultaneamente em uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero e pressionadas sob uma pressão de 0,01 a 5 MPa por 1 a 120 minutos para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, o produto pressionado resultante e aquecido tendo uma densidade média de 250 a 750 kg/m<sup>3</sup> e uma espessura de 0,05 a 10 mm.

[000142] É preferido que entre duas e trinta, mais preferivelmente entre cinco e vinte e cinco das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I), cada folha consistindo de uma única nanofibra de polímero, e cada folha tendo uma espessura de 5 a 120 µm e uma densidade de área de 1 a 40 g/m<sup>2</sup>.

[000143] Também é preferido na etapa (II) que as pilhas de folha são aquecidas simultaneamente em uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero e pressionadas sob uma pressão de 1 a 500 kPa por 1 a 30 minutos para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, o produto pressionado resultante e aquecido tendo uma densidade média de 200 a 1000 kg/m<sup>3</sup> e uma espessura de 0,05 a 10 mm.

[000144] É mais preferido que:

[000145] - entre duas e trinta, mais preferivelmente entre cinco e vinte e cinco das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I), cada folha consistindo de uma única nanofibra de polímero, e cada folha tendo uma espessura de 5 a 120 µm e uma densidade de área de 1 a 40 g/m<sup>2</sup>; e

[000146] - na etapa (II) que as pilhas de folha são aquecidas simultaneamente em uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero e pressionadas sob uma pressão de 1 a 500 kPa por 1 a 30 minutos para fundir pontos de

contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, o produto pressionado resultante e aquecido tendo uma densidade média de 200 a 1000 kg/m<sup>3</sup> e uma espessura de 0,05 a 10 mm.

[000147] Em uma modalidade preferida, as uma ou mais nanofibras de polímero são pressionadas e aquecidas. Isto aprimora as propriedades estruturais do resultante meio de cromatografia polimérico funcionalizado. Assim, na modalidade preferida a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) pressionar as uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (III) aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, e (IV) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000148] Na modalidade preferida, a etapa de prover uma ou mais nanofibras de polímero tipicamente compreende prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero.

[000149] Em uma modalidade adicionalmente preferida, a etapa de funcionalizar com um reagente é realizada de um

modo em batelada. Isto aumenta a capacidade de ligação do resultante meio de cromatografia polimérico funcionalizado. Assim, nesta modalidade preferida adicional, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) opcionalmente pressionando as uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (III) opcionalmente aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, e (IV) contatar o produto da etapa (I), (II) ou (III) de um modo em batelada pelo menos duas vezes com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (I), (II) ou (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000150] Nesta modalidade preferida adicional, a etapa de prover uma ou mais nanofibras de polímero tipicamente compreende prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero.

[000151] Esta modalidade adicionalmente preferida preferivelmente compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) pressionar as uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (III) aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero

para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, e (IV) contatar o produto da etapa (III) de um modo em batelada pelo menos duas vezes com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000152] Esta modalidade adicionalmente preferida mais preferivelmente compreende (I) prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) pressionando as uma ou mais folhas de não tecido como definido aqui, (III) aquecendo as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, e (IV) contatar o produto da etapa (III) de um modo em batelada pelo menos duas vezes com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000153] Em uma modalidade adicionalmente preferida, a etapa de funcionalizar com um reagente é realizada pelo fluxo convectivo. Tal processo tipicamente é mais eficiente do que um processo difusivo padrão. Assim, nesta modalidade preferida adicional, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover uma

ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) opcionalmente pressionando as uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (III) opcionalmente aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (IV) posicionar o produto da etapa (I), (II) ou (III) em um retentor como definido aqui, e (V) fazer com que um reagente como definido aqui escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto da etapa (I), (II) ou (III) que funcionaliza o produto da etapa (I), (II) ou (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000154] Esta modalidade ainda mais preferida preferivelmente compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) pressionar as uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (III) aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (IV) posicionar o produto da etapa (III) em um retentor como definido aqui, e (V) fazer com que um reagente como definido aqui escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto da etapa (III) que funcionaliza o produto da etapa (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000155] Esta modalidade ainda mais preferida mais preferivelmente compreende (I) prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (II) pressionando as uma ou mais folhas de não tecido como definido aqui, (III) aquecendo as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, (IV) posicionar o produto da etapa (III) em um retentor como definido aqui, e (V) fazer com que um reagente como definido aqui escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto da etapa (III) que funcionaliza o produto da etapa (III) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000156] É preferido que o meio de cromatografia de polímero funcionalizado é um meio de cromatografia de celulose funcionalizado.

[000157] Em uma modalidade ainda mais preferida, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover uma ou mais folhas de não tecido como definido aqui, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (ii) pressionando as uma ou mais folhas de não tecido como definido aqui, (iii) aquecendo as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma

ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (iv) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose como definido aqui, e (v) contatar o produto obtido desta forma de um modo em batelada entre duas a quatro vezes com um reagente como definido aqui que funcionaliza o produto da etapa (iv) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000158] Em uma modalidade ainda mais preferida, a presente invenção provê um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover uma ou mais folhas de não tecido como definido aqui, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (ii) pressionando as uma ou mais folhas de não tecido como definido aqui, (iii) aquecendo as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de acetato de celulose como definido aqui, (iv) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose como definido aqui, (v) posicionar o produto obtido desta forma em um retentor como definido aqui, e (vi) fazer com que um reagente como definido aqui escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto obtido na etapa (iv) que funcionaliza o produto da etapa (iv) como um meio de cromatografia como definido aqui.

[000159] Meio de cromatografia funcionalizado da invenção

[000160] A presente invenção também provê um meio de cromatografia funcionalizado que pode ser obtido pelo processo da presente invenção.

[000161] Também é provido um meio de cromatografia funcionalizado que é obtido pelo processo da presente invenção.

[000162] O meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção tipicamente possui uma porosidade de 0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$ , preferivelmente de 0,3 a 0,9  $\mu\text{m}$ , mais preferivelmente de 0,4 a 0,8  $\mu\text{m}$ , ainda mais preferivelmente de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$ , ainda mais preferivelmente de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$ , por exemplo, de 0,6 a 0,65  $\mu\text{m}$ .

[000163] O meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção possui uma densidade de 200 a 1000  $\text{kg}/\text{m}^3$ , preferivelmente 250 a 750  $\text{kg}/\text{m}^3$ , mais preferivelmente de 350 a 650  $\text{kg}/\text{m}^3$ , em algumas circunstâncias de 450 a 550  $\text{kg}/\text{m}^3$ . Outras densidades preferíveis incluem de 200 a 750  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 200 a 650  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 200 a 550  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 250 a 750  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 250 a 650  $\text{kg}/\text{m}^3$ , e 250 a 550  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

[000164] Tipicamente, o meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção possui uma espessura de 0,05 a 10 mm, por exemplo, 0,1 a 5 mm.

[000165] Preferivelmente, o meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção é funcionalizado de forma que é adequado para o uso em um método de cromatografia como definido aqui, por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia de captura por afinidade e cromatografia hidrofóbica.

[000166] O meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção tipicamente está na forma de uma membrana.

#### Cartucho de cromatografia da invenção

[000167] A presente invenção também provê um cartucho de cromatografia. O cartucho de cromatografia da presente invenção compreende um ou mais meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção. Alternativamente, o cartucho de cromatografia da presente invenção que pode ser obtido realizando o processo da presente invenção e incorporar o produto obtido desta forma em um cartucho.

[000168] Também é provido um processo para preparar um cartucho de cromatografia que compreende realizar o processo da presente invenção e incorporar o produto obtido desta forma em um cartucho.

[000169] O cartucho de cromatografia tipicamente é adequado para o uso na cromatografia, preferivelmente um método de cromatografia como definido aqui.

[000170] Um cartucho de cromatografia da presente invenção tipicamente compreende um ou mais meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção dentro de um retentor, por exemplo, um retentor como definido acima. O retentor tipicamente é cilíndrico.

[000171] Tipicamente, o cartucho de cromatografia compreende um ou mais meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção empilhadas dentro de um retentor cilíndrico.

[000172] Tipicamente, o cartucho de cromatografia compreende dois ou mais meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção. Tipicamente, o cartucho de cromatografia compreende até vinte meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção.

[000173] Tipicamente, o cartucho de cromatografia também compreende um ou mais frits dentro do retentor tipicamente cilíndrico. Frits são bem conhecidos dos peritos na técnica e se referem a estruturas porosas rígidas, tipicamente metal rígido, cerâmica polimérica, preferivelmente estruturas porosas de metal rígido ou cerâmicas. Frits tipicamente são incluídos em um cartucho de cromatografia para aprimorar a distribuição de fluxo através do cartucho e/ou suportar os um ou mais meios de cromatografia funcionalizados da presente invenção. Poros em frits típicos possuem diâmetros de 1 a 1000  $\mu\text{m}$ ,

preferivelmente de 5 a 500 µm, mais preferivelmente de 10 a 150 µm. Outros diâmetros de poro de frit típicos incluem de 1 a 20 µm, preferivelmente de 5 a 10 µm, mais preferivelmente de 3 a 7 µm.

[000174] Tipicamente, o cartucho de cromatografia também compreende um ou mais meios de distribuição de fluido de entrada e/ou meios de coleta de fluido de saída. Tais meios são bem conhecidos dos peritos na técnica.

#### Método de cromatografia da invenção

[000175] A presente invenção também provê uso de um meio de cromatografia funcionalizado da invenção ou um cartucho de cromatografia da invenção na cromatografia, particularmente em um método de cromatografia como definido aqui.

[000176] A presente invenção também provê um processo para isolar uma ou mais moléculas biológicas a partir de uma fase móvel, processo o qual compreende contatar uma ou mais moléculas biológicas em uma fase móvel com um meio de cromatografia funcionalizado da invenção ou um cartucho de cromatografia da invenção. O meio de cromatografia ou cartucho de cromatografia se liga preferencialmente com as uma ou mais moléculas biológicas na fase móvel, tipicamente em preferência aos outros componentes (por exemplo, outras moléculas biológicas) também presentes na fase móvel. Isto pode ser realizado de acordo com métodos convencionais

conhecidos para a fase de ligação de tais métodos de cromatografia.

[000177] Assim, tipicamente, este processo de cromatografia é um processo de troca iônica (ânion ou cátion), captura por afinidade, interação hidrofóbica ou cromatografia de modo misto.

[000178] Preferivelmente, o processo de cromatografia é um processo de cromatografia de troca aniônica e o meio de cromatografia é funcionalizado com DEAE ou Q; o processo de cromatografia é um processo de cromatografia de troca de cátion e o meio de cromatografia é funcionalizado com SP ou CM; o processo de cromatografia é um processo de cromatografia de captura por afinidade e o meio de cromatografia é funcionalizado com Proteína A; ou o processo de cromatografia é um processo de cromatografia por interação hidrofóbica e o meio de cromatografia é funcionalizado com grupos fenil.

[000179] Assim, a presente invenção provê um processo de cromatografia que compreende a etapa acima. Tipicamente, o processo de cromatografia é realizada de acordo com um método de cromatografia como definido acima.

[000180] O processo de cromatografia tipicamente compreende uma etapa adicional de recuperar as uma ou mais moléculas biológicas a partir do meio de cromatografia funcionalizado ou cartucho de cromatografia. Esta etapa

tipicamente pode ser efetuada contatando o meio de cromatografia funcionalizado ou cartucho de cromatografia em que é adsorvido como uma ou mais moléculas biológicas com um tampão de eluição. Isto pode ser realizado de acordo com métodos convencionais conhecidos para a fase de eluição de tais métodos de cromatografia. Assim, o processo tipicamente é um método cromatográfico de eluição ligado.

[000181] Entre as etapas de ligação e eluição, o processo pode compreender adicionalmente uma etapa de lavar o meio de cromatografia funcionalizado ou cartucho de cromatografia da invenção em que é adsorvido como uma ou mais moléculas biológicas. Esta etapa de lavagem é realizada para remover qualquer componente que não é ligado com o meio de cromatografia funcionalizado ou cartucho de cromatografia. Isto pode ser realizado de acordo com métodos convencionais conhecidos para a fase de lavagem de tais métodos de cromatografia.

[000182] Após a etapa de eluição, o processo pode compreender adicionalmente uma etapa de regenerar o meio de cromatografia funcionalizado ou cartucho de cromatografia da invenção. Tipicamente isto é efetuado contatando o meio de cromatografia funcionalizado ou cartucho de cromatografia a partir do qual as uma ou mais moléculas biológicas foram eluídas com um tampão. Isto pode ser realizado de acordo com métodos convencionais conhecidos

para a fase de regeneração de tais métodos de cromatografia.

[000183] Tipicamente, as uma ou mais moléculas biológicas são escolhidas a partir de proteínas, polipeptídeos, anticorpos, aminoácidos, vírus e ácidos nucleicos, incluindo, por exemplo, proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, vacinas virais e DNA de plasmídeo.

[000184] O anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo multiespecífico (por exemplo, um anticorpo biespecífico) ou um anticorpo deletado de domínio. Preferivelmente o anticorpo monoclonal é um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano. Fragmentos de ligação de antígeno de anticorpos monoclonais podem ser usados. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')2 e Fv fragmentos, diacorpos e anticorpos de cadeia única.

[000185] Tipicamente, o processo de cromatografia emprega um sistema de leito móvel real ou simulado. Assim tipicamente, o processo compreende introduzir as uma ou mais moléculas biológicas em uma fase móvel para um ou mais aparelhos de cromatografia de leito móvel real ou simulado tendo uma pluralidade de colunas de cromatografia ligadas, em que as colunas de cromatografia contêm como adsorvente o meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção.

[000186] Qualquer aparelho de leito móvel real ou simulado conhecido pode ser usado para realizar o processo

de cromatografia, provido que compreende, como adsorvente, o meio de cromatografia funcionalizado da presente invenção.

[000187] Cromatografia de leito móvel real e simulada são técnicas conhecidas, familiares para os peritos na técnica. O princípio de operação envolve movimento em contracorrente de uma fase de eluente líquido e uma fase de adsorvente sólido. Esta operação permite o uso mínimo de solvente fazendo o processo economicamente viável. Tal tecnologia de separação encontra aplicações em áreas diversas incluindo a purificação de moléculas biológicas usando adsorventes de membrana.

[000188] Um sistema de leito móvel simulado consiste de um número de colunas individuais contendo adsorvente que são conectados em série. Eluente é passado através das colunas em uma primeira direção. Os pontos de injeção da carga de alimentação e o eluente, e os pontos de coleta de componente separados no sistema são deslocados de maneira periódica por meio de uma série de válvulas. O efeito global é simular a operação de uma única coluna contendo um leito móvel do adsorvente sólido. Assim, um sistema de leito móvel simulado consiste de colunas que, como em um sistema de leito estacionário convencional, contêm leitos estacionários de adsorvente sólido através dos quais o eluente é passado, mas em um sistema de leito móvel

simulado a operação é tal como para simular um leito móvel em contra corrente contínuo.

[000189] Um sistema de leito móvel real é similar em operação a um sistema de leito móvel simulado. No entanto, em vez de deslocar os pontos de injeção da mistura de alimentação e o eluente, e os pontos de coleta de componente separados por meio de um sistema de válvulas, em vez de uma série de unidades de adsorção (isto é colunas) são movidos de maneira física com relação aos pontos de alimentação e de retirada. Novamente, a operação é tal como para simular um leito móvel em contra corrente contínuo.

#### Meio polimérico da invenção

[000190] A presente invenção também provê um processo para preparar um meio polimérico, processo o qual compreende prover duas ou mais folhas de não tecido empilhadas uma sobre a outra como definido aqui, cada dita folha compreendendo duas ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, e simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui. Também é provido um meio polimérico que pode ser obtido por aquele processo.

[000191] A primeira etapa do processo envolve prover uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido. Assim, a presente invenção também provê um processo para preparar um

meio polimérico, processo o qual compreende prover uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, cada dita folha compreendendo duas ou mais nanofibras de polímero como definido aqui, e simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui. Também é provido um meio polimérico que pode ser obtido por aquele processo.

[000192] Este processo também pode envolver molhar como definido aqui e pressionar uma pilha de duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui, seguido pelo subsequente aquecimento como definido aqui. Condições de umedecimento, pressionamento e aquecimento típicas são como definidas acima. Assim nesta modalidade, a presente invenção provê um processo para preparar um meio polimérico, processo o qual compreende

(I) prover duas ou mais folhas de não tecido como definido aqui empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero como definido aqui,

(II) molhar as pilhas de folha com um solvente orgânico opcionalmente aquoso como definido aqui,

(III) pressionar as pilhas de folha como definido aqui, e

(IV) aquecer a pilha pressionada para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes como definido aqui.

[000193] Funcionalidades preferidas para o meio polimérico da invenção e o processo para produzir aquele meio polimérico são como definidos acima para o meio de cromatografia da invenção e o processo usado para produzir o meio de cromatografia.

[000194] Os seguintes Exemplos ilustram a invenção.

#### Materiais e equipamento

[000195] Os seguintes materiais, equipamento e técnicas foram empregados a menos que seja declarado de outra forma.

[000196] Fração de Soro de Albumina Bovina de Proteína BSA V, >96% com peso molecular de ~66 kDa e todos os outros produtos químicos foram comprados a partir de Sigma-Aldrich Co. (Sigma-Aldrich Company Ltd. Dorset, UK) da maior pureza disponível e usados sem purificação adicional, a menos que seja declarado de outra forma.

[000197] Citocromo c, de Coração de Equino, ≥90% com peso molecular de ~12 kDA foi comprado a partir de Merck Chemical (Merck Serono Ltd. Middlesex, UK).

#### Exemplo Preparativo 1

##### Preparo de membrana de nanofibra

[000198] Uma solução de 0,20 g/mL de acetato de celulose, com uma massa molecular relativa de 29.000 g/mol, foi dissolvida em acetona/dimetilformamida/etanol (2:2:1). Eletrofiação foi realizada em uma cabine de controle de clima de Zona de Clima (al-safetech Luton, UK) para permitir o controle da temperatura e da umidade das condições ambiente. Condições otimizadas de O. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890 foram usadas para produzir folhas de não tecido de nanofibras de acetato de celulose eletrodepositadas com baixa distribuição de diâmetros de fibra, espessuras médias de 20 micron e densidades de área médias de 10 g/m<sup>2</sup>.

[000199] Uma vez eletrodepositadas, quinze folhas de não tecido das nanofibras com uma área de superfície de face de 100 cm<sup>2</sup> foram empilhadas uma sobre a outra e pressionadas em uma prensa hidráulica manual em uma pressão de 1 MPa por dois minutos. Após pressionar, a folha de material foi colocada imediatamente em um forno pré-aquecido em 213°C por 5 minutos entre folhas de metal. A pressão entre as folhas de metal foi determinada como 20 kPa. O material pressionado e aquecido então foi cortado em múltiplos discos de 25 mm de diâmetro.

#### Exemplo 1

Modificação química por convecção

[000200] Um disco de nanofibra de acetato de celulose foi preparado como dito acima e modificado quimicamente para produzir funcionalidade de superfície de troca aniônica. Um disco tendo uma espessura de 0,188 mm e volume total 0,1 mL foi modificado como definido abaixo.

[000201] O disco de nanofibra foi empacotado em um retentor de filtro antes da derivatização. Desacetilação foi realizada usando 30 mL de NaOH 0,1M em água DI:etanol (2:1), que foi bombeado através do disco de uma maneira cíclica usando uma bomba de HPLC Dionex, P680 em uma taxa de 25 mL/min por 24 horas. O disco então foi rinsado com 300 mL H<sub>2</sub>O DI em uma taxa de 25 mL/min. Funcionalidade de superfície de troca de ânion então foi transmitida fazendo o ciclo de 20 mL de solução aquosa 15% de 2-cloro-N,N-dietiletilamina hidrocloreto 99% (DEACH) aquecida (40°C) através do disco em 40 mL/min por 10 min. O disco então foi removido do alojamento de retentor de filtro e deixado por 30 segundos escorrer antes de colocar em 20 mL de NaOH 0,5M quente (80°C) em um tubo de amostra de 50 mL em uma mesa agitadora com agitação gentil por 10 min. Finalmente o disco foi rinsado em múltiplos volumes de H<sub>2</sub>O DI e deixado secar antes do uso.

#### Exemplo 2

[000202] Um experimento foi realizado como definido no Exemplo 1 acima, exceto que o disco de nanofibra de

acetato de celulose usado teve uma espessura de 0,376 mm e volume total de 0,2 mL.

#### Exemplo 3

##### Modificação química por difusão

[000203] Um disco de nanofibra de acetato de celulose foi preparado como dito acima. Um disco tendo uma espessura de 0,188 mm e volume total 0,1 mL foi modificado como definido abaixo.

[000204] O disco foi posicionado em um tubo de amostra de 50 mL contendo 30 mL NaOH 0,1M em água DI:etanol (2:1) por 24 horas em uma mesa agitadora de laboratório para desacetilar o acetato de celulose para formar celulose regenerada. O disco então foi rinsado completamente em 10 x 30 mL volumes de água DI por 5 minutos cada um na mesa agitadora. Funcionalidade de superfície de troca de ânion então foi introduzida posicionando o disco rinsado em um tubo de amostra com 20 mL de solução aquosa 15% de 2-cloro-N,N-dietiletilamina hidrocloreto 99% (DEACH) aquecida (40°C) por 10 min. o adsorvente foi removido e deixado escorrer por 30 segundos antes de ser colocado em 20 mL de NaOH 0,5M quente (80°C) em um novo tubo de amostra na mesa agitadora por 10 min. Finalmente o disco foi rinsado em múltiplos volumes de H<sub>2</sub>O DI e deixado secar antes do uso.

#### Exemplo 4

[000205] Um experimento foi realizado como definido no Exemplo 1 acima, exceto que o disco de nanofibra de acetato de celulose usado teve uma espessura de 0,376 mm e volume total 0,2 mL.

#### Exemplo 5

[000206] Análise de desempenho de bioseparação

[000207] Discos de nanofibra preparados e modificados de acordo com os Exemplos 1 a 4 foram analisados para comparar o desempenho de ligação de proteína de membranas de nanofibra com massa e volume equivalentes derivatizadas por dois métodos diferentes. Isto foi para determinar a extensão da modificação da área de superfície apresentada por estes sistemas de nanofibra.

[000208] Experimentos foram conduzidos usando um AKTA Basic (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) com medição em linha da absorvância de UV (280 nm), pH, e condutividade.

[000209] Discos de nanofibra preparados e modificados de acordo com Exemplos 1 a 4 foram equilibrados com 5 mL de 20 mM Bis-Tris, tampão de lavagem com pH 5,3 em uma taxa de 480 cm/h e então carregado com 1 mL de uma solução de proteína de dois componentes contendo 1 mg/mL BSA e 0,25 mg/mL de tampão de lavagem 5mL de Citocromo C. então foi passado através do adsorvente antes de 5 mL de NaCl 0,4M 20 mM Bis-Tris, tampão de eluição com pH 5,3 foi introduzido.

A capacidade eluída então foi analisada usando software Unicorn 5,0 como medido pela integração da área de pico.

[000210] Uma mistura de BSA e Citocromo C foi usada para ter vantagem dos seus diferentes pontos isoelétricos e portanto adequação para a separação por cromatografia de troca iônica. Citocromo C possui um pI de 10,0 enquanto BSA possui um pI de 4,7 em água a 25°C. Isto quer dizer que em uma solução tampão Bis-Tris em pH 5,3 o Citocromo C terá uma carga positiva global e não vai se ligar com a superfície de troca aniônica fraca do adsorvente de DEAE. Em contraste, neste pH acima do pI de BSA, BSA vai ter uma carga de superfície negativa global e portanto vai se ligar com o adsorvente de DEAE. Já que a concentração de sal é aumentada durante a eluição a interação entre a carga de superfície negativa de BSA e a troca aniônica é competida pelos íons de sal e assim o BSA é removida do adsorvente e coletada.

[000211] O desempenho do adsorvente foi analisado sobre um número de ciclos de operação para determinar a capacidade de reprodução com relação ao tempo de vida dos adsorventes. A Tabela abaixo define as capacidades de ligação médias para os discos testados.

Amostra	Espessura de adsorvente (mm)	Volume de adsorvente (mL)	Capacidade de ligação (mg/mL)
Exemplo 1	0,188	0,1	5,64±0,10
Exemplo 3	0,188	0,1	5,56±0,40
Exemplo 2	0,376	0,2	6,46±0,44

<u>Exemplo 4</u>	<u>0,376</u>	<u>0,2</u>	<u>5,88±0,56</u>
------------------	--------------	------------	------------------

[000212] Para ambas as espessuras dos discos de nanofibra, o processo de modificação convectivo origina uma maior capacidade de ligação do que o processo de modificação difusivo. Este efeito foi mais pronunciado para o disco mais grosso.

[000213] A capacidade de reagentes químicos de alcançar superfícies funcionais do sistema de polímero também foi observada para depender da espessura de uma membrana de nanofibra. Assim, para as membranas de nanofibra mais grossas testadas houve uma capacidade de ligação significativamente melhorada observada para os adsorventes de nanofibra de DEAE que foram derivatizados através do fluxo convectivo. Isto sugere que para os protocolos investigados, a difusão é insuficiente para os reagentes químicos alcançarem todas as áreas de superfície de ligação.

#### Exemplo 6

##### Modificação química difusiva repetida

[000214] Derivatização de superfície de troca de ânion de discos de nanofibra de celulose foi realizada como descrito acima no Exemplo 4, isto é usando um disco de nanofibra de acetato de celulose tendo uma espessura de 0,376 mm e volume total 0,2 mL. A modificação química então foi repetida a partir do ponto de introdução de DEACH até o fim do protocolo.

[000215] Assim, o disco obtido no Exemplo 4 foi posicionado em um tubo de amostra com 20 mL de solução aquosa 15% de 2-cloro-N,N-dietiletilamina hidrocloreto 99% (DEACH) quente (40°C) por 10 min. O adsorvente foi removido e deixado escorrer por 30 segundos antes de ser colocado em 20 mL NaOH 0,5M quente (80°C) em um novo tubo de amostra em uma mesa agitadora por 10 min, então rinsado em múltiplos volumes de H<sub>2</sub>O DI.

#### Exemplo 7

[000216] Um experimento foi realizada as no Exemplo 6, exceto que a modificação química foi repetida mais uma vez.

[000217] Assim, o disco obtido no Exemplo 6 foi posicionado em um tubo de amostra com 20 mL de solução aquosa 15% de 2-cloro-N,N-dietiletilamina hidrocloreto 99% (DEACH) quente (40°C) por 10 min. O adsorvente foi removido e deixado escorrer por 30 segundos antes de ser colocado em 20 mL de NaOH 0,5M quente (80°C) em um novo tubo de amostra em uma mesa agitadora por 10 min, então rinsado em múltiplos volumes de H<sub>2</sub>O DI.

#### Exemplo 8

[000218] Um experimento foi realizada as no Exemplo 7, exceto que a modificação química foi repetida mais uma vez.

[000219] Assim, o disco obtido no Exemplo 7 foi posicionado em um tubo de amostra com 20 mL de solução aquosa 15% de 2-cloro-N,N-dietiletilamina hidrocloreto 99% (DEACH) quente ( $40^{\circ}\text{C}$ ) por 10 min. O adsorvente foi removido e deixado escorrer por 30 segundos antes de ser colocado em 20 mL NaOH 0,5M quente ( $80^{\circ}\text{C}$ ) em um novo tubo de amostra em uma mesa agitadora por 10 min, então rinsado em múltiplos volumes de H<sub>2</sub>O DI.

#### Exemplo 9

[000220] Discos produzidos nos Exemplos 4 e 6 a 8 foram analisados para a capacidade de ligação usando o protocolo definido acima no Exemplo 5. A queda de pressão para cada disco também foi determinada.

[000221] A Tabela abaixo define as capacidades de ligação e quedas de pressão médias para os discos testados.

Amostra	Modificação químicas	Queda de Pressão (MPa)	Capacidade de ligação (mg/mL)
Exemplo 4	x1	0,210	5,88±0,56
Exemplo 6	x2	0,205	13,31±3,11
Exemplo 7	x3	0,245	14,88±0,38
Exemplo 8	x4	0,205	15,88±0,73

[000222] Estes resultados mostram um aprimoramento claro na substituição do grupo funcional com etapas de protocolo de derivatização repetidas. No geral um aprimoramento de 270% na capacidade de ligação foi observado para os adsorventes testados usando etapas de

protocolo repetidas durante a derivatização. A queda de pressão não foi afetada pela modificação repetida.

[000223] A estabilidade estrutural dos adsorventes de nanofibra de DEAE de derivatização repetida não parecem ser afetados e isto foi confirmado por estudos de reproduibilidade que mostram desempenho constante por 50 ciclos de operação típica.

[000224] A Figura 1 mostra o fluxo através de citocromo C + BSA não ligado como o primeiro pico durante o carregamento de uma mistura de 2 componentes e a eluição de BSA como o segundo pico. O resultado médio para 50 corridas de ligação equivalentes é traçado  $\pm 1$  desvio padrão da população de amostra (mostrado pelas curvas pontilhadas em torno da curva principal da mesma cor). Estes resultados mostram a capacidade de reprodução pelas 50 corridas de ligação equivalentes e mostram que para as condições escolhidas a nanofibra adsorvente realiza reproduibilidade, captura e eluição 99% de BSA carregado. O desvio padrão foi calculado para mostrar que a nanofibra adsorvente opera de maneira consistente.

[000225] A Figura 2 mostra o fluxo através de citocromo C + BSA não ligado como o primeiro pico durante o carregamento de uma mistura de 2 componentes e a eluição de BSA como o segundo pico. Múltiplas corridas de ligação foram realizadas, e curvas traçadas para as corridas

gravaram 500 corridas. As curvas gravadas para as duas corridas se sobrepõem quase completamente. Isto também demonstra a excelente capacidade de reprodução obtida com membranas preparadas de acordo com a presente invenção. Isto está em contraste com a queda significativa no desempenho após múltiplas corridas reportadas com membranas da técnica anterior.

#### Exemplo Preparativo 2

[000226] Uma solução de 0,20 g/mL de acetato de celulose, com uma massa molecular relativa de 29.000 g/mol, foi dissolvida em solventes comuns, por exemplo, acetona/dimetilformamida/etanol. Condições otimizadas a partir de O. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890 foram usados para produzir folhas de não tecido de nanofibras de acetato de celulose eletrodepositadas com baixa distribuição de diâmetros de fibra, espessuras médias de 20 micron e densidades de área médias de 20 g/m<sup>2</sup>.

[000227] Um eletrodepositado, dez folhas de não tecido das nanofibras com uma área de superfície de face de 100 cm<sup>2</sup> foram empilhadas uma sobre a outra e colocadas em um forno pré-aquecido em 208°C por 30 minutos entre folhas de metal. A pressão entre as folhas de metal foi determinada como 20 kPa. O material pressionado e aquecido então foi cortado em múltiplos discos com 25 mm de diâmetro.

[000228] Exemplo Analítico 1 - efeito de aquecimento e pressionamento

[000229] Dez folhas de nanofibras de acetato de celulose foram obtidas como descrito no Exemplo Preparativo 2. As folhas foram empilhadas uma sobre a outra e sujeitadas a 20 kPa de pressão em uma prensa aquecida enquanto simultaneamente é aquecida até 207°C. As folhas empilhadas foram pressionadas e aquecidas na prensa por 5 minutos. Após pressionar e aquecer um disco da membrana resultante foi cortado. As fibras de acetato de celulose foram desacetyladas para celulose usando o método destacado no Exemplo 3. Amostras preparadas deste modo são referidas abaixo como as amostras de "prensa", refletindo o fato de que o aquecimento foi realizado em uma prensa aquecida.

[000230] Um disco de "prensa" foi posicionado em um anel em O de borracha dentro de uma seringa de 50 mL, como o vaso para reter o anel em O no local. Um peso na forma de uma ponta de pipeta de 10 mL (massa de 5,81 g) foi posicionado no centro de um disco de nanofibra. Uma solução de NaOH 1 M foi adicionada ao vaso e um temporizador foi usado para determinar o ponto de falha. O ponto de falha foi determinado como o momento em que a ponta da pipeta cai através do disco. A duração tomada para a ponta da pipeta para cair através do disco indica a resistividade química do disco. Este experimento foi repetido três vezes.

[000231] Esta configuração experimental é mostrada na Figura 3.

[000232] Discos de nanofibra adicionais foram produzidos como descrito acima, exceto que as dez folhas de nanofibra primeiramente foram pressionadas em uma prensa (sem aquecimento) em uma pressão de 20 kPa por uma hora, seguido pelo aquecimento (sem pressionamento) em um forno por cinco minutos a 207°C. Amostras preparadas deste modo são referidas abaixo como as amostras de "forno", refletindo o fato de que o aquecimento foi realizado em um forno.

[000233] Um disco de "forno" foi posicionado em um anel em O de borracha e sujeitado ao teste de resistividade química descrito acima. Novamente, isto foi repetido três vezes.

[000234] Os resultados para os discos de "prensa" e "forno" são definidos na Tabela abaixo.

	Disco 1	Disco 2	Disco 3
Forno	66 minutos	71 minutos	88 minutos
Prensa	>120 hrs	>120 hrs	>120 hrs

[000235] Pode ser observado a partir destes resultados que discos que são pressionados e aquecidos simultaneamente possuem resistividade química superior em relação a aqueles que são pressionados (sem aquecimento) e subsequentemente aquecidos (sem pressionamento).

[000236] O disco de "forno" mostra descoloração e corrosão dentro de 10 minutos de exposição à NaOH 1M. O

disco "de prensa" mostra pouca degradação mesmo após 120 horas de exposição. Fotografias dos respectivos discos são mostradas como a Figura 4.

[000237] A espessura e a densidade de um número de discos de "prensa" e "forno" foram determinadas. As espessuras e as densidades médias destes discos são mostradas na Figura 5. Os discos de "prensa" foram descobertos como sendo ambos mais finos e densos do que os discos de "forno".

[000238] As características de escoamento dos discos de "prensa" e "forno" foram analisadas determinando a queda de pressão de coluna delta em taxas de escoamento crescentes (2, 5, 10, 20, 30, 40, 60 ml/min) de tampão Tris-HCl (pH 8) através dos discos. Os dados obtidos são mostrados como a Figura 6. Pode ser observado que os discos de "prensa" e "forno" possuem características de escoamento similares.

#### Exemplo Analítico 2 - efeito de variar pressão

[000239] Discos de celulose regenerada foram preparados usando o método descrito no Exemplo Analítico 1 para os discos de "prensa". Discos preparados desta maneira são referidos abaixo como os discos de "20 kPa".

[000240] Discos adicionais foram preparados usando o método descrito acima para os discos de "20 kPa", exceto que uma pressão de 200 kPa foi usada em vez de 20 kPa.

Discos preparados desta maneira são referidos abaixo como os discos de "200 kPa".

[000241] A espessura e a densidade de um número de discos de "20 kPa" e "200 kPa" foram determinadas. As espessuras e as densidades médias destes discos são mostradas na Figura 7. Os discos de "200 kPa" foram descobertos como sendo mais finos e densos do que os discos de "20 kPa".

[000242] As características de escoamento de discos de "20 kPa" e "200 kPa" foram analisadas usando o método descrito no Exemplo Analítico 1. Os dados obtidos são mostrados como a Figura 8. Pode ser observado que a queda de pressão sobre os discos de "200 kPa" é maior do que aquela sobre os discos de "20 kPa".

[000243] Discos de "20 kPa" e "200 kPa" de celulose regenerada foram funcionalizados com DEAE usando o método do Exemplo 3. Capacidades dinâmicas de ligação (DBC) para estes discos foram determinadas usando um protocolo similar com aquele definido no Exemplo 5. A capacidade de ligação dinâmica (DBC) foi determinada em um fluxo de 30 ml/min, usando diferentes massas de BSA (1 mg, 2 mg, 4 mg), usando tampão Tris-HCl em pH 8, com uma etapa de eluição de NaCl 1M. Os resultados da análise de DBC são mostrados na Figura 9. A DBC dos discos de "20 kPa" é maior do que aquela dos discos de "200 kPa".

### Exemplo 10

[000244] Discos de nanofibra foram preparados de acordo com o método do Exemplo Preparativo 2. Discos foram desacetilados e imersos com DEACH em temperatura ambiente, então lavados com temperatura ambiente NaOH 0,5M. A imersão em DEACH e lavagem com NaOH 0,5M foi repetida até 5 vezes e é referida abaixo como o número de ciclos de funcionalização. Assim, os discos foram funcionalizados usando 1 ciclo, 2 ciclos, 3 ciclos, 4 ciclos e 5 ciclos.

[000245] As características de escoamento dos discos de ciclo 1, 2, 3, 4 e 5 foram analisadas usando o método descrito no Exemplo Analítico 1 usando taxas de fluxo crescentes (2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ml/min), usando tampão Tris-HCl em pH 8. Os dados obtidos são mostrados como a Figura 10. Pode ser observado que queda de pressão aumenta com o número de ciclos.

[000246] A capacidade dinâmicas de ligação (DBC) para os discos de ciclo 1, 2, 3, 4 e 5 foi analisada usando o método descrito no Exemplo Analítico 2. Os resultados da análise de DBC são mostrados na Figura 11. A DBC aumenta de 1 a 4 ciclos, e então diminui para o quinto ciclo.

### Exemplo 11 - Preparo de discos funcionalizados de SP

[000247] Discos de celulose regenerada foram preparados usando o método do Exemplo Preparativo 2 e do Exemplo 1.

[000248] A uma solução de 10 ml de DMSO e 5 mL de NaOH 1M foram adicionados 2 mL de alil glicidil éter seguido por 10 discos de fibra de celulose regenerada. Uma solução de sódio disulfito (3 g) em 30 mL de H<sub>2</sub>O foi ajustado para pH 6,5 pela adição de NaOH (1M). Os discos obtidos na primeira etapa acima então foram tratados com esta mistura. Os discos então foram lavados com HCl 0,1M seguido por água .

[000249] Para determinar a capacidade dinâmica de ligação, discos funcionalizados SP foram analisados usando um método similar com aquele destacado acima no Exemplo 5. Um sistema de purificação de AKTA (GE Healthcare) foi equilibrado com tampão de pH 5 de acetato de Na 10 mM. Uma amostra de lisozima 1 mg/ml foi carregada no sistema em 30 mL/min. Uma solução de NaCl 1 M (tampão de pH 5 de acetato de Na 10 mM) foi usada para a eluição. O traço de UV em linha a 280 nm produziu o cromatograma mostrado na Figura 12.

#### Exemplo 12 - preparo de discos funcionalizados CM

[000250] Discos de celulose regenerada foram preparados usando o método do Exemplo Preparativo 2 e Exemplo 1.

[000251] Estes foram adicionados a uma solução aquosa de NaBr (24,3 mmol) e TEMPO (1,60 mmol) e ajustados usando NaOH até pH 10. A este NaOCl foi adicionado (5,0 mmol) até

que não houve alteração adicional no pH. Os discos então foram lavados com EtoH.

[000252] Para determinar a capacidade dinâmica de ligação dos discos, o sistema de AKTA é corrido em uma taxa de escoamento de 30 ml/min e a amostra usada é Lisozima em uma concentração de 1 mg/ml com injeção de carga de 1 ml. Tampão de pH 5 de acetato de sódio 10 mM foi usado para equilibrar e lavar o sistema. Uma solução de NaCl 1 M (tampão de pH 5 de acetato de sódio 10 mM) é usada para a eluição. O traço de UV em linha a 280 nm produz o cromatograma mostrado na Figura 13.

#### Exemplo 13 - preparo de discos funcionalizados Q

[000253] Discos de celulose regenerada foram preparados usando o método do Exemplo Preparativo 2 e Exemplo 1.

[000254] Estes foram adicionados a uma solução de 2:1:0,1 DMSO:1MNaOH:glicidiltrimetilamônio. Os discos então foram lavados com HCl 0,1M e água.

[000255] Para determinar a capacidade de ligação dinâmica o sistema de purificação de AKTA (GE Healthcare) foi equilibrado com tampão com pH 8 de Tris-HCl 10 mM. Uma amostra de 1 mg/ml de BSA foi carregada no sistema em 20 mL/min. Uma solução de NaCl 1 M (tampão com pH 8 de Tris-HCl 10 mM) é usada para a eluição. O traço de UV em linha a 280 nm produz o cromatograma mostrado na Figura 14.

Exemplo 14 - Discos funcionalizados de proteína A

[000256] Discos de celulose regenerada foram preparados usando o método do Exemplo Preparativo 2 e Exemplo 1.

[000257] Estes foram adicionados a uma solução 80 mL de tampão de acetato de sódio (pH 5,5) que contém 6,5 g de NaIO<sub>4</sub>. Os discos então foram lavados com 50 mL de etileno glicol seguido por água. Discos então foram lavados com 0,05% Triton X-100, 100 mM de carbonato/bicarbonato pH 9,0. O ligando de Proteína A foi dializado com 0,05% de Triton X-100, 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9,0 e então adicionado aos discos. A solução então foi decantada e 0,05% Triton X-100, 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9,0 adicionado. A esta uma solução de 100 mM de boro-hidreto de sódio foi adicionada para produzir uma concentração de boro-hidreto final de 4 mM. Esta solução então é decantada e 20% de etanol em tampão de pH 6,7 de 50 mM fosfato 150 mM de cloreto de sódio adicionado. As etapas de lavagem acima foram repetidas 9 vezes.

[000258] Para determinar a capacidade de ligação dinâmica o sistema de AKTA foi corrido em uma taxa de fluxo de 30 ml/min e a amostra usada foi a Proteína A purificada de IgG em uma concentração de 1 mg/ml com injeção de carga de 1 ml. Tampão de pH 7,4 de PBS foi usado para equilibrar e lavar o sistema. Uma solução de tampão de 0,1M de Citrato

de Sódio com pH 3,0 é usada para a eluição. O traço de UV em linha a 280 nm produz o cromatograma mostrado na Figura 15.

Exemplo 15 - discos funcionalizados com fenil  
[000259] Discos de celulose regenerada foram preparados usando o método do Exemplo Preparativo 2 e Exemplo 1.

[000260] Estes foram adicionados a 75 mL de uma solução de uma mistura de 2:1 de DMSO:1MNaOH. Óxido de estireno (7,5 mL) então foi adicionado à mistura de reação que foi agitada em temperatura ambiente por 4 horas. Os discos então foram lavados com metanol, e então água.

[000261] Para determinar a capacidade de ligação dinâmica o sistema de AKTA foi rodado em uma taxa de fluxo de 10 ml/min e a amostra usada foi de 0,1 mg/ml de lisozima (com sulfato de amônio 1,5 M), com a injeção de carga de 1 ml. Sulfato de amônio 1,5 M com 10 mMTris em pH 8 foi usado para equilibrar e lavar o sistema. 10 mMTris em pH 8 é usado para a eluição. O traço de UV em linha a 280 nm produz o cromatograma mostrado na Figura 16.

Exemplo Analítico 3 - Efeito de empilhar antes de pressionar e aquecer

[000262] Como discutido acima no Exemplo Analítico 1, discos de celulose regenerada preparados de acordo com a presente invenção (os discos de "prensa") duram por mais do

que 120 horas em um teste de resistividade química (mostrado na Figura 3). Os discos de "prensa" mostram pouca degradação mesmo após 120 horas de exposição a NaOH (como mostrado na Figura 4).

[000263] Folhas únicas de nanofibras de acetato de celulose foram obtidas como descrito no Exemplo Preparativo 2. Uma folha de camada única foi sanduichada por duas folhas de PTFE planas e posicionada em um forno a 208°C por uma hora, de acordo com o método descrito em Ma, et al, Journal of Membrane Science 265 (2005) 115-123. A folha obtida foi desacetilada usando o método destacado no Exemplo 3. Dez discos foram cortados a partir da resultante folha de celulose e empilhadas como descrito em Ma, et al. Amostras preparadas deste modo são referidos abaixo como as amostras de "Ma, et al". Este processo foi repetido oito vezes para criar oito pilhas de dez discos.

[000264] Uma pilha de dez discos de "Ma, et al" foi posicionada em um anel em O de borracha e sujeitada ao teste de resistividade química descrito acima no Exemplo Analítico 1. Isto foi repetido três vezes. Os três testes de discos de "Ma, et al" falharam após dez minutos, dez minutos e dois minutos, respectivamente.

[000265] Pode ser observado a partir destes resultados que discos que são formados a partir de múltiplas folhas de não tecido das nanofibras que são

primeiramente empilhadas e então pressionadas e aquecidas simultaneamente possuem resistividade química superior a aquelas formadas pelo aquecimento de folhas de nanofibra individuais, seguido por subsequente empilhamento.

[000266] Os discos de "Ma, et al" mostram descoloração e corrosão dentro de 10 minutos de exposição a 1M NaOH como mostrado na Figura 17. O disco de "prensa de calor" mostra pouca degradação mesmo após 120 horas de exposição (Figura 4).

[000267] A espessura e densidade de um número de discos de "prensa de calor" e "Ma, et al" foram determinadas. As espessuras e densidades médias destes discos são mostrados na Figura 18. Os discos de "prensa de calor" foram descobertos como sendo mais finos e mais densos do que os discos de "Ma, et al".

[000268] As características de escoamento de discos de "prensa de calor" e "Ma, et al" foram analisadas determinando a queda de pressão de coluna delta em taxas de fluxo crescentes de tampão Tris-HCl (pH 8) através dos discos. Os dados obtidos são mostrados como a Figura 19. Pode ser observado que os discos de "prensa de calor" e "Ma, et al" possuem características de fluxo similares.

[000269] Discos de "prensa de calor" e "Ma, et al" foram funcionalizados com ligandos de DEAE usando o método descrito no Exemplo 3. A capacidade dinâmica de ligação

destes discos foi determinada usando um protocolo similar com aquela definida no Exemplo 5. A capacidade de ligação dinâmica (DBC) foi determinada em um fluxo de 30 ml/min, usando diferentes massas de BSA (1 mg, 2 mg, 4 mg), usando tampão de Tris-HCl em pH 8, com uma etapa de eluição de NaCl 1M. Os resultados da análise de DBC são mostrados na Figura 20. DBC dos discos de "prensa de calor" é maior do que aquela de discos de "Ma, et al".

[000270] a possibilidade de realizar funcionalizações de repetição dos discos de "prensa de calor" e "Ma, et al" foi determinada. O método para a funcionalização de DEAE de repetição dos discos descrito no Exemplo 10 foi realizado tanto nos discos de "prensa de calor" quanto de "Ma, et al" de celulose regenerada. A estabilidade química tuim do material de "Ma, et al" quer dizer que não foi possível aumentar a DBC usando múltiplos ciclos de funcionalização. A DBC máxima foi descoberta como possível para o material de "Ma, et al" foi de cerca de 7 mg/ml (como mostrado na Figura 20). Usando múltiplos ciclos de funcionalização foi possível aumentar a DBC do material de "prensa de calor" até cerca de 16 mg/ml (ver a Figura 11). O material de "Ma, et al" se degradou de maneira significativa após múltiplos ciclos de DEAE. Este problema não foi observado com o material de "prensa de calor". Fotografias do material de "Ma, et al" e do material de "prensa de calor" após

múltiplos ciclos de funcionalização são mostrados na Figura 21. O material de "Ma, et al" é mostrado como a fotografia de fundo, e o material de "prensa de calor" como a fotografia de topo na Figura 21.

[000271] Algumas modalidades preferidas da presente invenção são destacadas abaixo.

[000272] [1] Um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, (ii) pressionando as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, (iv) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose, e (v) contatar o produto obtido desta forma de um modo em batelada entre duas a quatro vezes com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (iv) como um meio de cromatografia.

[000273] [2] O processo de acordo com [1], cada etapa de contatar com um reagente compreendendo (a) contatar com o reagente, (b) isolar o produto da etapa (a) a partir do reagente, (c) opcionalmente tratar o produto da etapa (b) com alcalino aquoso, e (d) opcionalmente lavar o produto da etapa (b) / (c) com água.

[000274] [3] O processo de acordo com [1] ou [2], a etapa (v) compreendendo

- (1) (a1) contatar o produto da etapa (iv) com o reagente, (b1) isolar o produto da etapa (a1) a partir do reagente, (c1) opcionalmente tratar o produto da etapa (b1) com alcalino aquoso, e (d1) opcionalmente lavar o produto da etapa (b1)/(c1) com água, e

- (2) (a2) contatar o produto da etapa (b1)/(c1)/(d1) com o reagente, (b2) isolar o produto da etapa (a2) a partir do reagente, (c2) opcionalmente tratar o produto da etapa (b2) com alcalino aquoso, e (d2) opcionalmente lavar o produto da etapa (b2)/(c2) com água; ou

- (1) (a1) contatar o produto da etapa (iv) com o reagente, (b1) isolar o produto da etapa (a1) a partir do reagente, (c1) opcionalmente tratar o produto da etapa (b1) com alcalino aquoso, e (d1) opcionalmente lavar o produto da etapa (b1)/(c1) com água,

- (2) (a2) contatar o produto da etapa (b1)/(c1)/(d1) com o reagente, (b2) isolar o produto da etapa (a2) a partir do reagente, (c2) opcionalmente tratar o produto da etapa (b2) com alcalino aquoso, e (d2) opcionalmente lavar o produto da etapa (b2)/(c2) com água, e

- (3) (a3) contatar o produto da etapa (b2) / (c2) / (d2) com o reagente, (b3) isolar o produto da etapa (a3) a partir do reagente, (c3) opcionalmente tratar o produto da etapa (b3) com alcalino aquoso, e (d3) opcionalmente lavar o produto da etapa (b3) / (c3) com água; ou
  - (1) (a1) contatar o produto da etapa (iv) com o reagente, (b1) isolar o produto da etapa (a1) a partir do reagente, (c1) opcionalmente tratar o produto da etapa (b1) com alcalino aquoso, e (d1) opcionalmente lavar o produto da etapa (b1) / (c1) com água,
  - (2) (a2) contatar o produto da etapa (b1) / (c1) / (d1) com o reagente, (b2) isolar o produto da etapa (a2) a partir do reagente, (c2) opcionalmente tratar o produto da etapa (b2) com alcalino aquoso, e (d2) opcionalmente lavar o produto da etapa (b2) / (c2) com água,
  - (3) (a3) contatar o produto da etapa (b2) / (c2) / (d2) com o reagente, (b3) isolar o produto da etapa (a3) a partir do reagente, (c3) opcionalmente tratar o produto da etapa (b3) com alcalino aquoso, e (d3) opcionalmente lavar o produto da etapa (b3) / (c3) com água, e
    - (4) (a4) contatar o produto da etapa (b3) / (c3) / (d3) com o reagente, (b4) isolar o produto da etapa (a4) a partir do reagente, (c4) opcionalmente tratar

o produto da etapa (b4) com alcalino aquoso, e (d4) opcionalmente lavar o produto da etapa (b4) / (c4) com água.

[4] O processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, cada etapa de contatar com um reagente sendo para um período de tempo de 1 a 20 minutos.

[5] Um processo para preparar um meio de cromatografia de celulose funcionalizado, processo o qual compreende (i) prover uma ou mais folhas de não tecido, cada compreendendo uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, (ii) pressionando as uma ou mais folhas de não tecido, (iii) aquecendo as uma ou mais folhas de não tecido para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de acetato de celulose, (iv) tratar o produto pressionado e aquecido para converter o acetato de celulose para celulose, (v) posicionar o produto obtido desta forma em um retentor, e (vi) fazer com que um reagente escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto obtido na etapa (iv) que funcionaliza o produto da etapa (iv) como um meio de cromatografia.

[6] O processo de acordo com [5], a etapa (vi) compreendendo

- fazer com que um reagente escoe através do retentor sob pressão; e/ou
- fazer com que um reagente escoe através do retentor usando uma bomba; e/ou

- fazer com que um reagente escoe através do retentor de uma maneira cíclica; e/ou
- fazer com que um reagente escoe através do retentor para um período de tempo de 1 a 20 minutos.

[7]. O processo de acordo com [6] ou [7] adicionalmente compreendendo a etapa de tratar o produto da etapa (vi) com alcalino aquoso, e opcionalmente lavar o produto obtido desta forma com água.

[8] O processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, o meio de cromatografia de celulose funcionalizado sendo adequado para o uso em um método de cromatografia escolhido a partir da troca iônica, captura por afinidade ou interação hidrofóbica métodos.

[9] O processo de acordo com [8],

- o método de cromatografia sendo um método de troca catiônica, e o meio de cromatografia sendo funcionalizado com um ou mais grupos carboxilato, sulfonato ou fosfonato;

- o método de cromatografia sendo um método de troca aniônica, e o meio de cromatografia sendo funcionalizado com um ou mais grupo dietilamina ou amino quaternários, preferivelmente um ou mais grupos DEAE;

- o método de cromatografia sendo um método de cromatografia de captura por afinidade, e o meio de cromatografia sendo funcionalizado com uma ou mais

proteínas, peptídeos, anticorpos ou fragmentos do mesmo, corantes, histidina, ou grupos contendo um cátion de metal; ou

- o método de cromatografia sendo a interação hidrofóbica método de cromatografia, e o meio de cromatografia sendo funcionalizado com um ou mais grupos propil, butil, fenil, ou octil.

[10] O processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, em que um ou mais grupos hidroxila no meio de cromatografia de celulose são funcionalizados.

[11] O processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, as um ou mais nanofibras de celulose tendo um diâmetro médio de 10 nm a 1000 nm.

[12] O processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, a etapa de pressionar as uma ou mais folhas de não tecido empregando uma pressão de 0,01 a 5 MPa.

[13] O processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, a etapa de aquecer as uma ou mais folhas de não tecido empregando uma temperatura de 200 a 220°C.

[14] Um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero, (II) pressionar as uma ou mais nanofibras de polímero,

(III) aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero, e (IV) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (III) como um meio de cromatografia.

[15] Um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero, (II) opcionalmente pressionando as uma ou mais nanofibras de polímero, (III) opcionalmente aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero, e (IV) contatar o produto da etapa (I), (II) ou (III) de um modo em batelada pelo menos duas vezes com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (I), (II) ou (III) como um meio de cromatografia.

[16] Um processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado, processo o qual compreende (I) prover uma ou mais nanofibras de polímero, (II) opcionalmente pressionando as uma ou mais nanofibras de polímero, (III) opcionalmente aquecimento como uma ou mais nanofibras de polímero para fundir pontos de contato entre seções das uma ou mais nanofibras de polímero, (IV) posicionar o produto da etapa (I), (II) ou (III) em um retentor, e (V) fazer com que um reagente escoe através do

retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto da etapa (I), (II) ou (III) que funcionaliza o produto da etapa (I), (II) ou (III) como um meio de cromatografia.

[17] O processo de acordo com qualquer um de [14] a [16], o meio de cromatografia funcionalizado sendo adequado para o uso em um método de cromatografia definido na reivindicação [8] ou [9].

[18] O processo de acordo com qualquer um de [14] a [16], em que um ou mais grupo hidroxila, amino ou ácido carboxílicos no meio de cromatografia são funcionalizados.

[19] O processo de acordo com qualquer um de [14] a [16], o polímero sendo escolhido a partir de celulose, acetato de celulose, polisulfonas, poliamidas, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilonitrila, poliestireno, óxido de polietileno, e misturas dos mesmos.

[20] Um meio de cromatografia funcionalizado que pode ser obtido pelo processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores.

[21] Um processo para preparar um cartucho de cromatografia, processo o qual compreende realizar o processo de qualquer um de [1] a [19] e incorporar o produto obtido desta forma em um cartucho.

[22] Um cartucho de cromatografia que (a) que pode ser obtido pelo processo de [21], ou (b) que compreende um ou

mais meios de cromatografia funcionalizados de acordo com [20].

[23] Uso de um meio de cromatografia funcionalizado de acordo com [20] ou um cartucho de cromatografia de acordo com [22] na cromatografia.

[24] Um processo para isolar uma ou mais moléculas biológicas a partir de uma fase móvel, processo o qual compreende contatar uma ou mais moléculas biológicas em uma fase móvel com um meio de cromatografia funcionalizado de acordo com [20] ou um cartucho de cromatografia de acordo com [22].

[25] O processo de acordo com [24], que é um processo de cromatografia de troca iônica, captura por afinidade ou interação hidrofóbica.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparar um meio de cromatografia polimérico funcionalizado caracterizado pelo fato de que compreende:

(I) prover duas ou mais folhas de não tecido empilhadas uma sobre a outra, cada dita folha compreendendo uma ou mais nanofibras de polímero,

em que as nanofibras de polímero têm diâmetros médios de 10 nm a 1000 nm,

(II) simultaneamente aquecer e pressionar as pilhas de folha para fundir pontos de contato entre as nanofibras de folhas adjacentes, e

(III) contatar o produto pressionado e aquecido com um reagente que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que entre duas e trinta, preferencialmente entre cinco e vinte e cinto, das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I).

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que uma pressão (i) de 0,01 a 5 MPa, (ii) maior do que 1 kPa ou (iii) de não mais do que 500 kPa é aplicada à pilha de folhas na etapa (II).

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que cada folha não tecida consiste de uma única nanofibra de polímero, ou compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nanofibras de polímero.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o polímero é selecionado a partir do grupo que consiste de celulose, acetato de celulose, polisulfonas, poliamidas, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilonitrila, poliestireno, óxido de polietileno, e misturas dos mesmos.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as ditas nanofibras são nanofibras de acetato de celulose, e o produto pressionado e aquecido é tratado entre as etapas (II) e (III) para converter o acetato de celulose para celulose.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a pilha de folhas é aquecida em uma temperatura entre 190 e 220°C na etapa (II).

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a etapa (III) compreende contatar o produto pressionado e aquecido de um modo em batelada pelo menos duas vezes com um reagente que funcionaliza o produto pressionado e aquecido como um meio de cromatografia.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que cada etapa de contatar com um reagente de um modo em batelada compreendendo (a) contatar com o reagente, (b) isolar o produto da etapa (a) a partir do reagente, (c) opcionalmente tratar o produto da etapa (b) com alcalino aquoso, e (d) opcionalmente lavar o produto da etapa (b) ou o produto opcional da etapa (c) com água e/ou em que funcionalização em batelada é realizada entre duas a quatro vezes.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a etapa (III) compreende posicionar o produto pressionado e aquecido em um retentor, e (IV) fazer com que um reagente escoe através do retentor de forma que o reagente escoe em contato com o produto pressionado e aquecido que funcionaliza o produto da etapa (II) como um meio de cromatografia.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a etapa (IV) compreende:

- fazer com que um reagente escoe através do retentor sob pressão; e/ou

- fazer com que um reagente escoe através do retentor usando uma bomba; e/ou
  - fazer com que um reagente escoe através do retentor de uma maneira cíclica; e/ou
    - fazer com que um reagente escoe através do retentor por um período de tempo de 1 a 20 minutos.

12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o reagente funcionaliza o produto pressionado e aquecido de forma que o meio de cromatografia funcionalizado resultante é adequado para o uso em um método de cromatografia escolhido a partir do grupo que consiste de métodos de troca iônica, captura por afinidade, interação hidrofóbica e modo misto.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que

- o método de cromatografia é um método de troca catiônica, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo carboxilato, sulfonato ou fosfonato;
- o método de cromatografia é um método de troca aniônica, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo dietilamina ou amino quaternário;
- o método de cromatografia é um método de cromatografia de captura por afinidade, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com uma proteína, Proteína A, Proteína G, Proteína L, peptídeo, anticorpo ou fragmento do mesmo, corante, histidina, um grupo contendo um cátion de metal, ou ligante mimético ou sintético que mimetize a ação de um ligante proteico;
- o método de cromatografia é uma cromatografia por interação hidrofóbica e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo propil, butil, fenil ou octil; ou

- o método de cromatografia é um método de cromatografia de modo misto, e o reagente funcionaliza o meio de cromatografia com um grupo MEP, octilamina, N-benzil metil etanolamina ou N-benzoil-homocisteína.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o reagente funcionaliza um grupo hidroxila, amino ou ácido carboxílico no meio de cromatografia.

15. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o produto pressionado e aquecido é tratado para desproteger ou ativar qualquer grupo funcional no polímero antes da etapa de contatar com um reagente.

16. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que (A):

- entre cinco e vinte e cinco das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I), cada folha compreendendo 1, 2 ou 3 nanofibras de polímero, e cada folha tendo uma espessura de 5 a 40 µm, e/ou

- na etapa (II) uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero e uma pressão de 0,01 a 5 MPa são aplicados por 1 a 120 minutos de forma a obter um produto pressionado e aquecido tendo uma densidade média de 250 a 750 kg/m<sup>3</sup> e uma espessura de 0,05 a 10 mm;

ou (B)

- entre cinco a vinte das ditas folhas são empilhadas uma sobre a outra na etapa (I), cada folha consistindo de uma única nanofibra de polímero, e cada folha tendo uma espessura de 5 a 120 µm e uma densidade de área de 1 a 40 g/m<sup>2</sup>, e/ou

- na etapa (II) uma temperatura abaixo do ponto de fusão do polímero e uma pressão de 1 a 500 kPa são aplicados por 1 a 30 minutos de forma a obter um produto pressionado e aquecido tendo uma densidade média de 200 a 1000 kg/m<sup>3</sup> e uma espessura de 0,05 a 10 mm.

17. Meio de cromatografia funcionalizado caracterizado pelo fato de que pode ser obtido pelo processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16.

18. Processo para preparar um cartucho de cromatografia caracterizado pelo fato de que compreende realizar o processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16 e incorporar o produto obtido desta forma em um cartucho.

19. Cartucho de cromatografia caracterizado pelo fato de que (a) pode ser obtido pelo processo, como definido na reivindicação 18, ou (b) que compreende um ou mais meios de cromatografia funcionalizados, como definido na reivindicação 17.

20. Uso de um meio de cromatografia funcionalizado, como definido na reivindicação 17 ou de um cartucho de cromatografia, como definido na reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que é em cromatografia.

21. Processo para isolar uma ou mais moléculas biológicas a partir de uma fase móvel caracterizado pelo fato de que compreende contatar uma ou mais moléculas biológicas em uma fase móvel com um meio de cromatografia funcionalizado, como definido na reivindicação 17 ou um cartucho de cromatografia, como definido na reivindicação 19.

22. Processo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que é um processo de cromatografia de troca iônica, captura por afinidade ou interação hidrofóbica.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais moléculas biológicas são uma ou mais proteínas, polipeptídeos, anticorpos, aminoácidos, vírus, ácidos nucleicos, proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, vacinas virais ou plasmídeos de DNA.

Figura 1

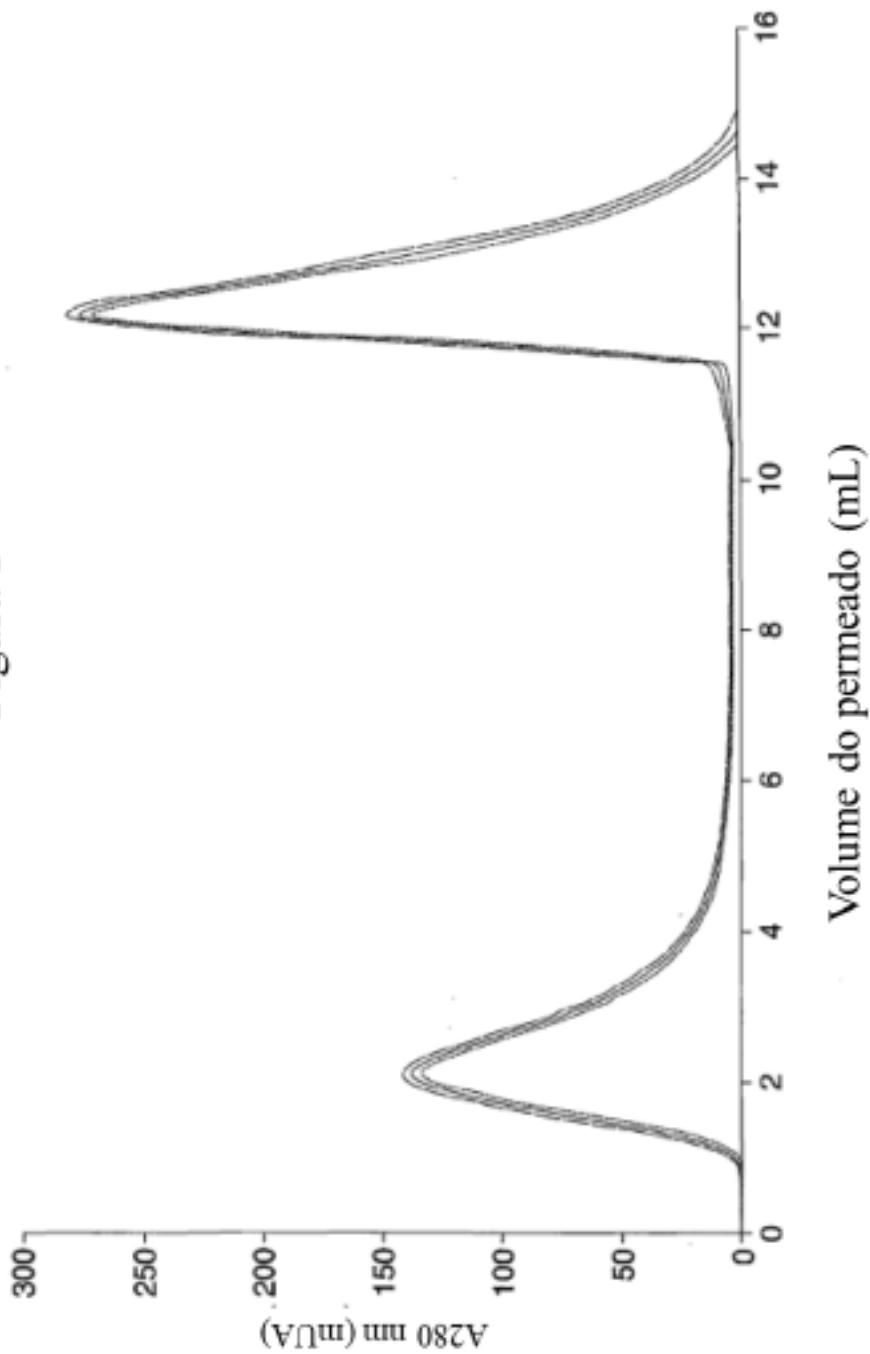


Figura 2

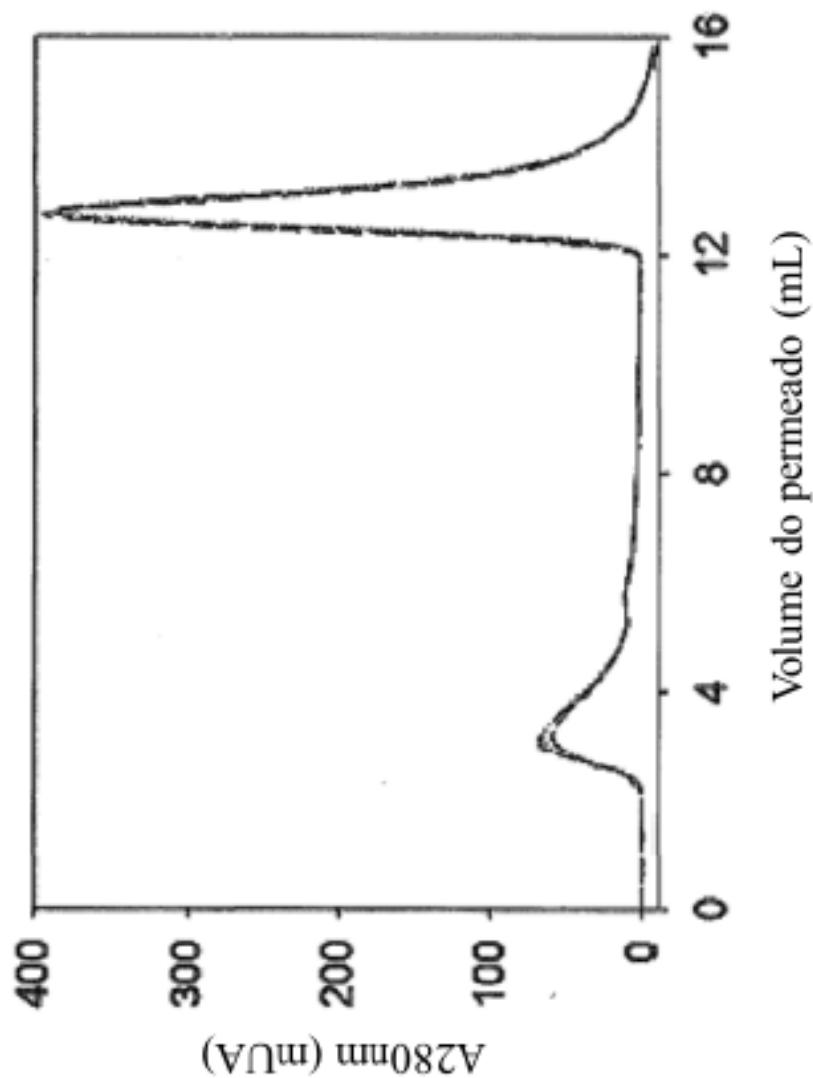


Figura 3

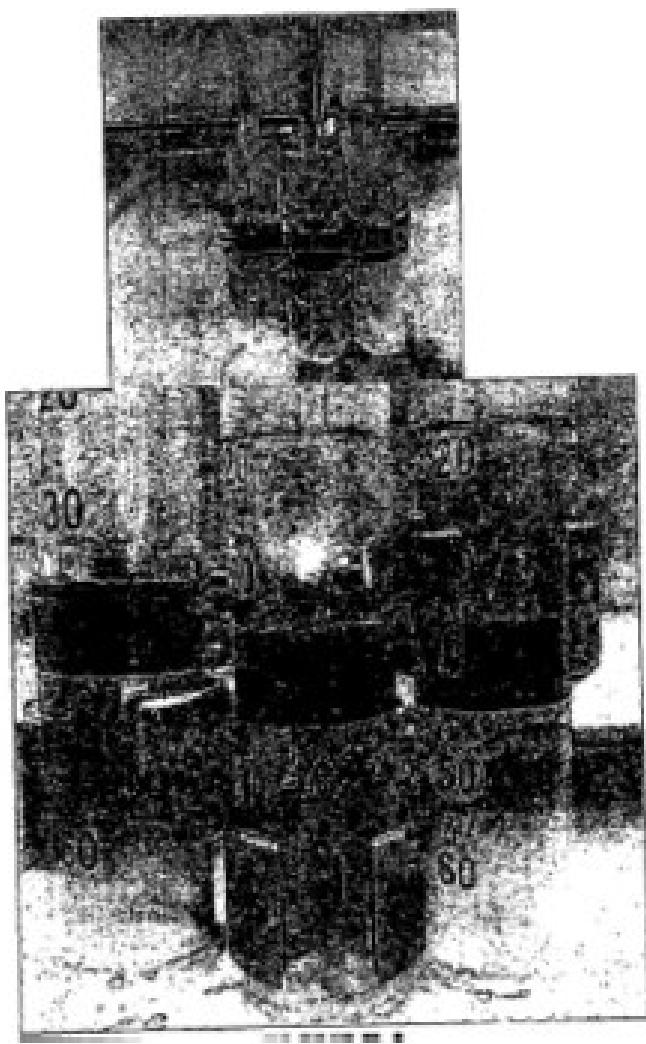
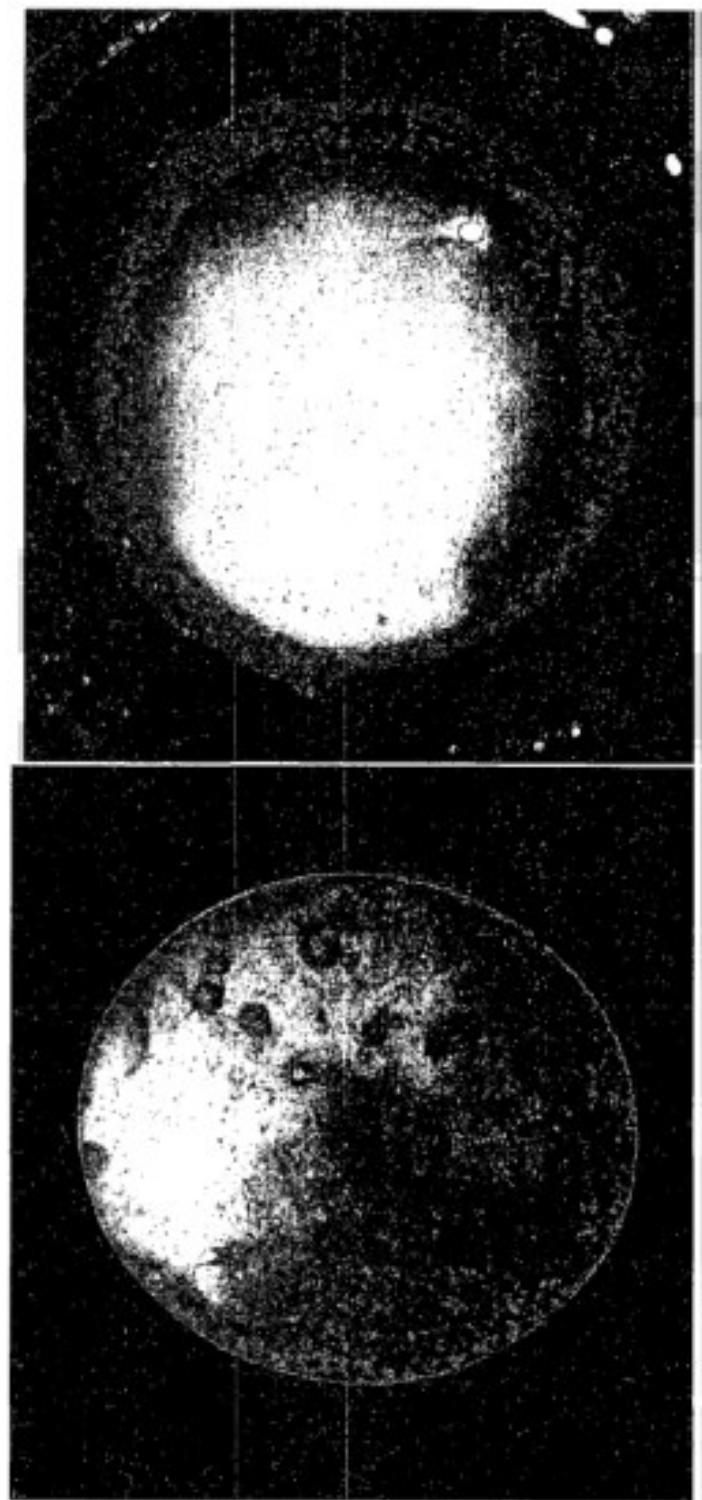


Figura 4



Após 10 minutos, “forno”

Após 120 horas, “prensa”

Figura 5

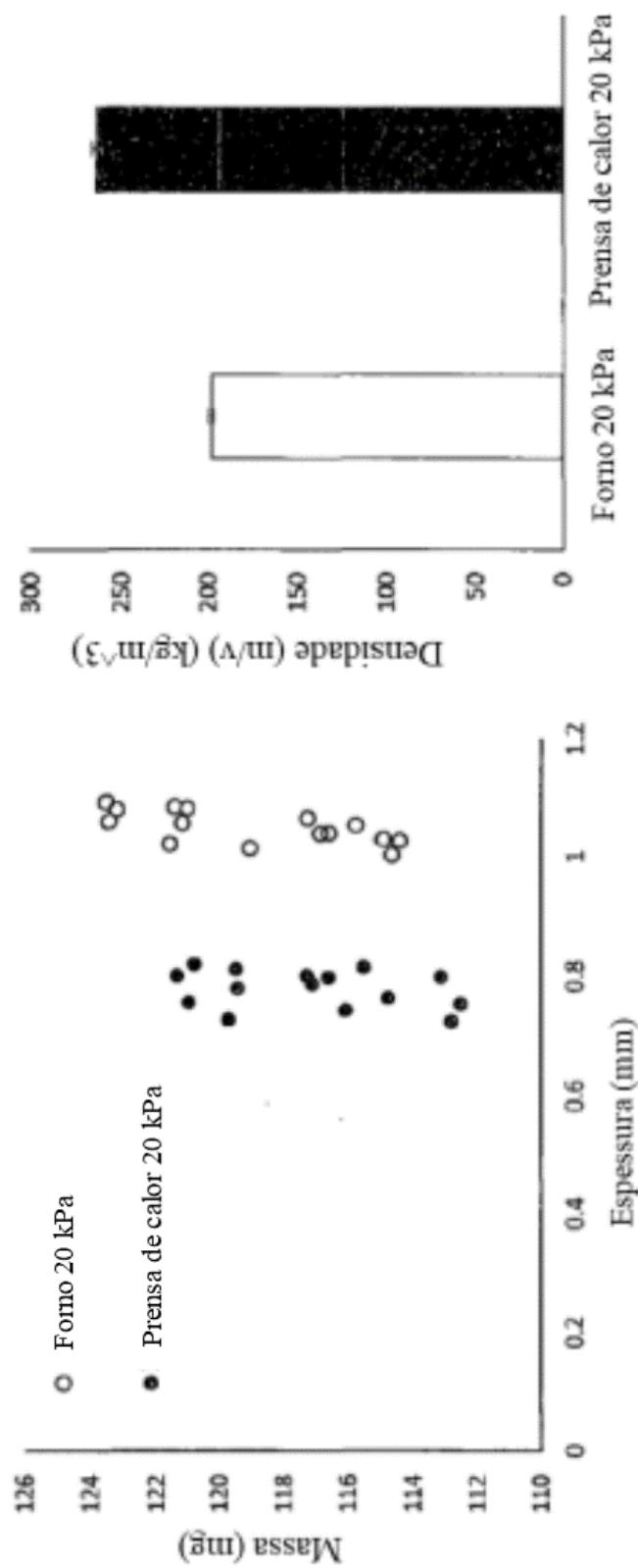


Figura 6

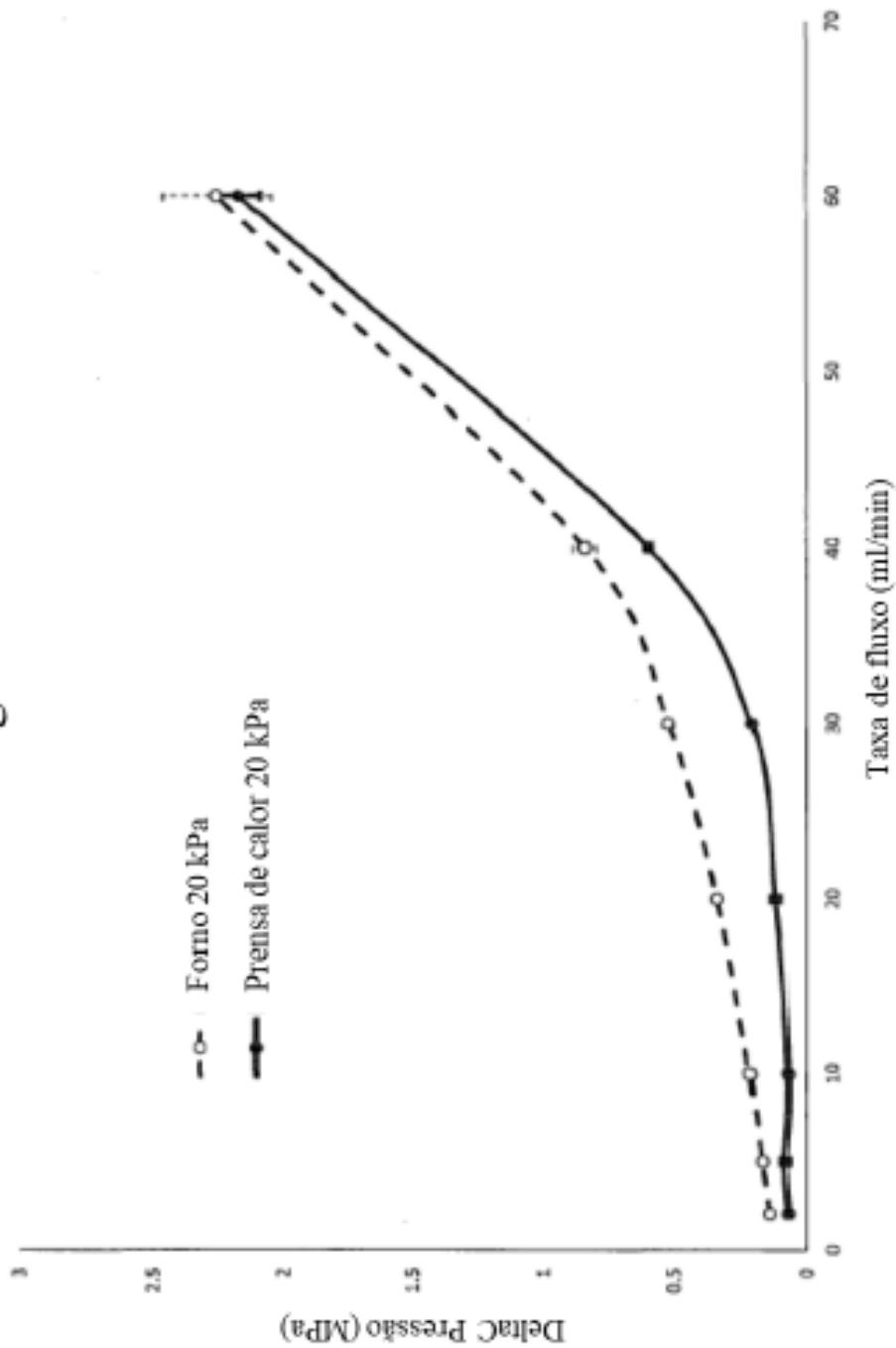


Figura 7

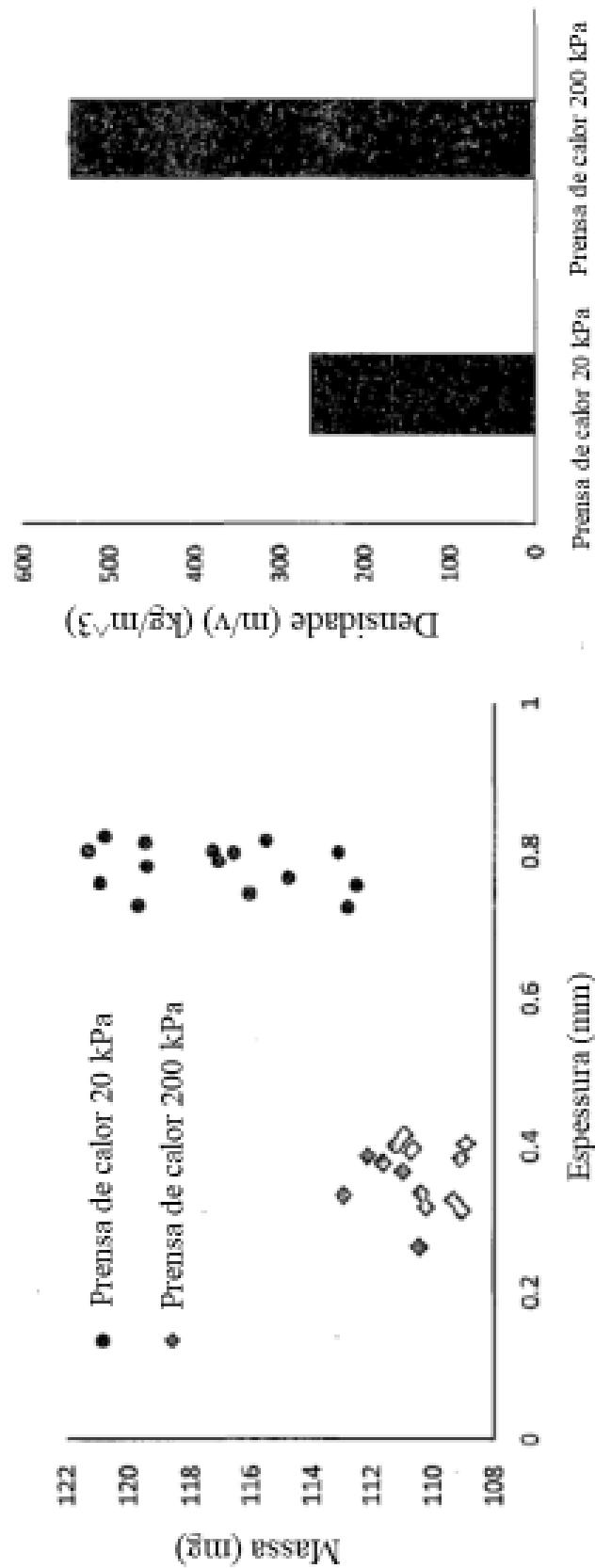


Figura 8

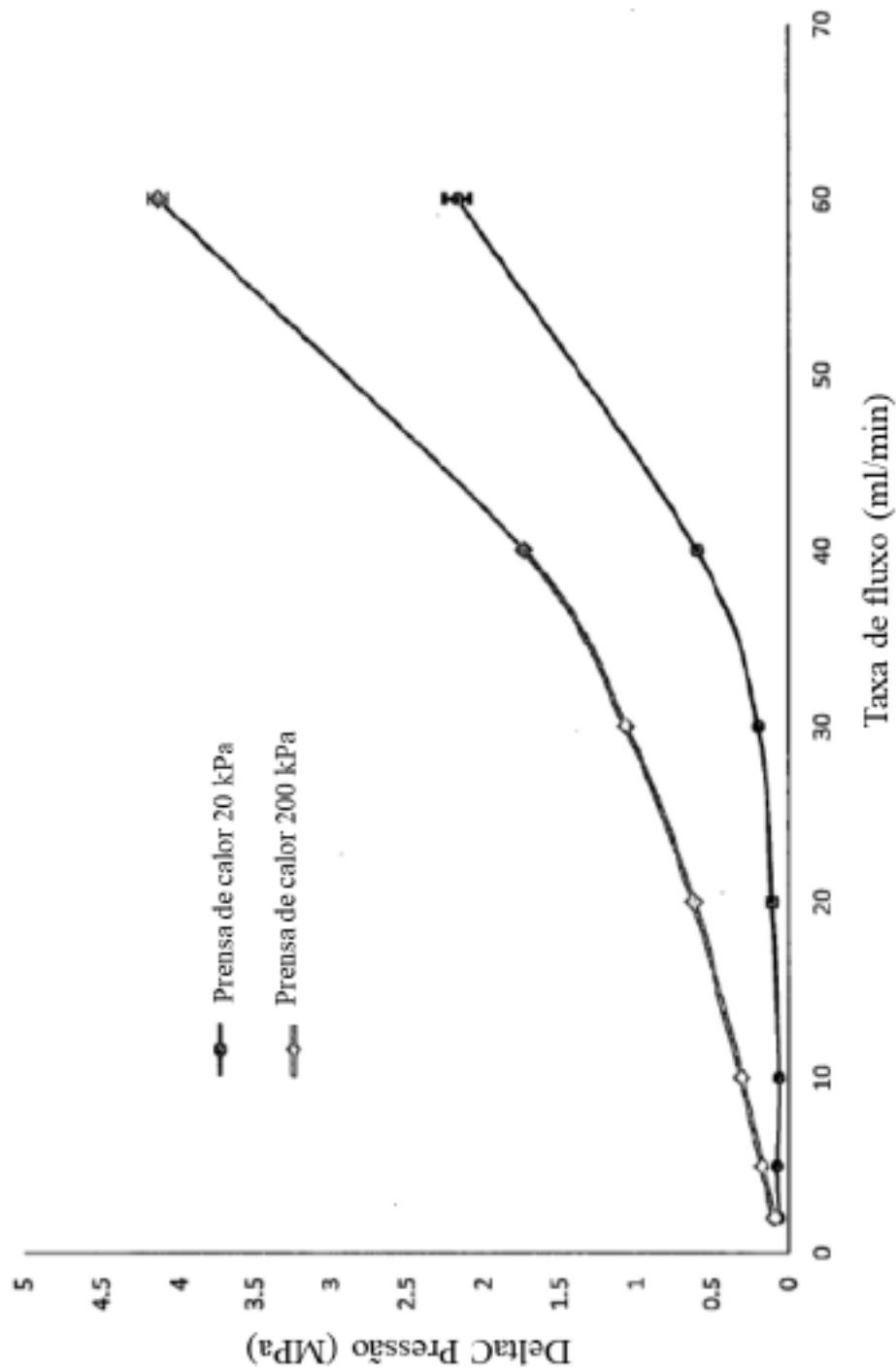


Figura 9

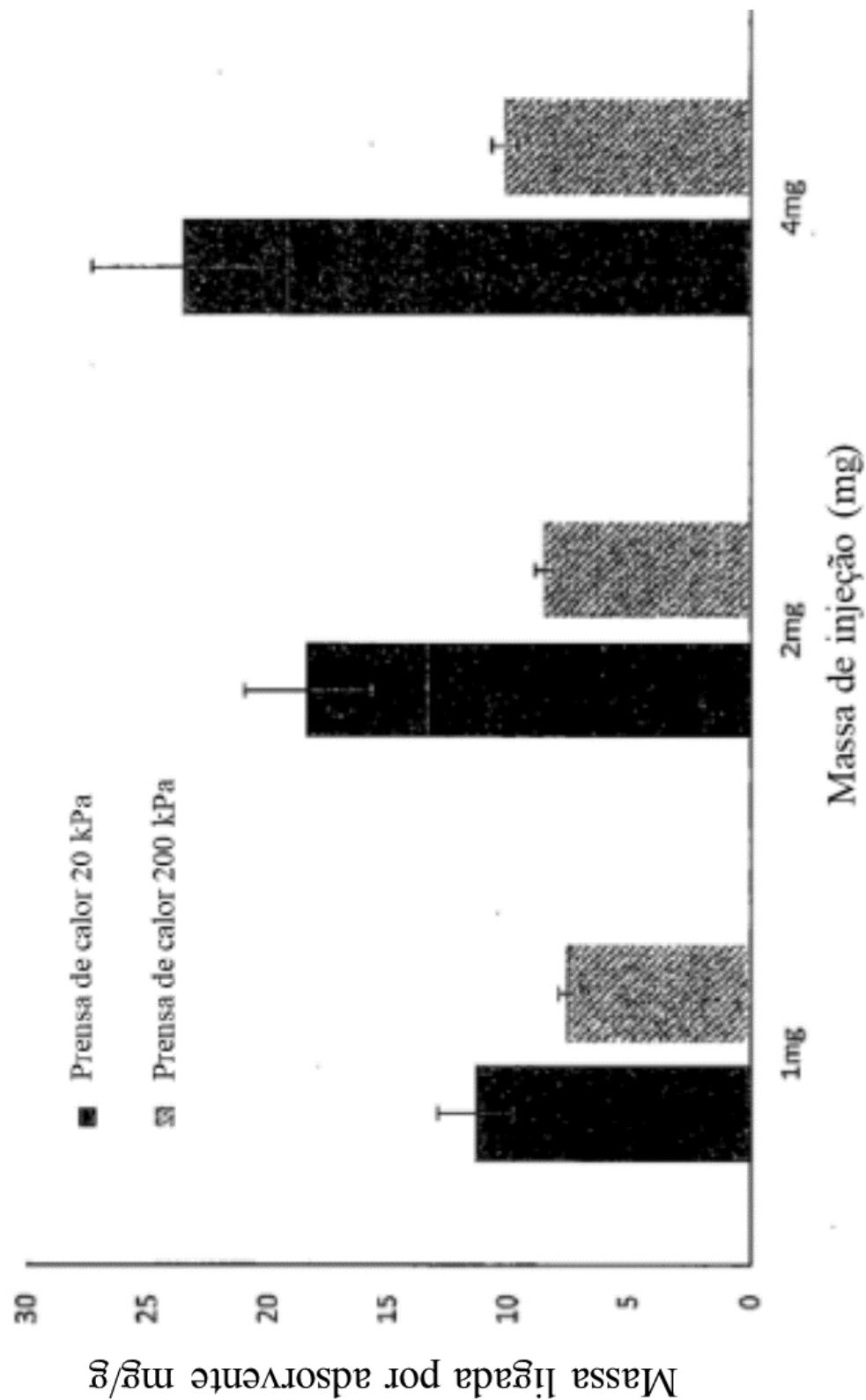


Figura 10

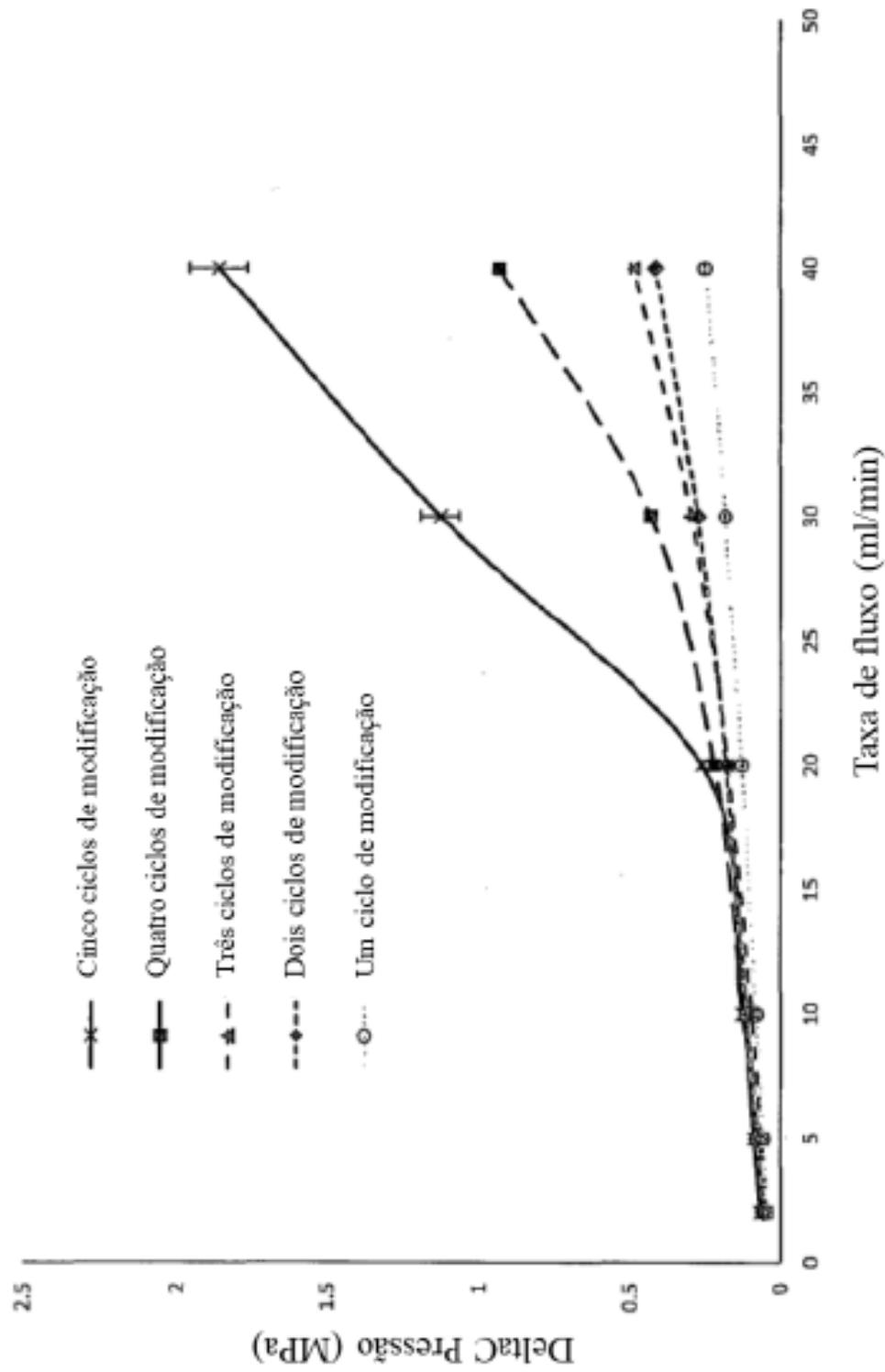


Figura 11

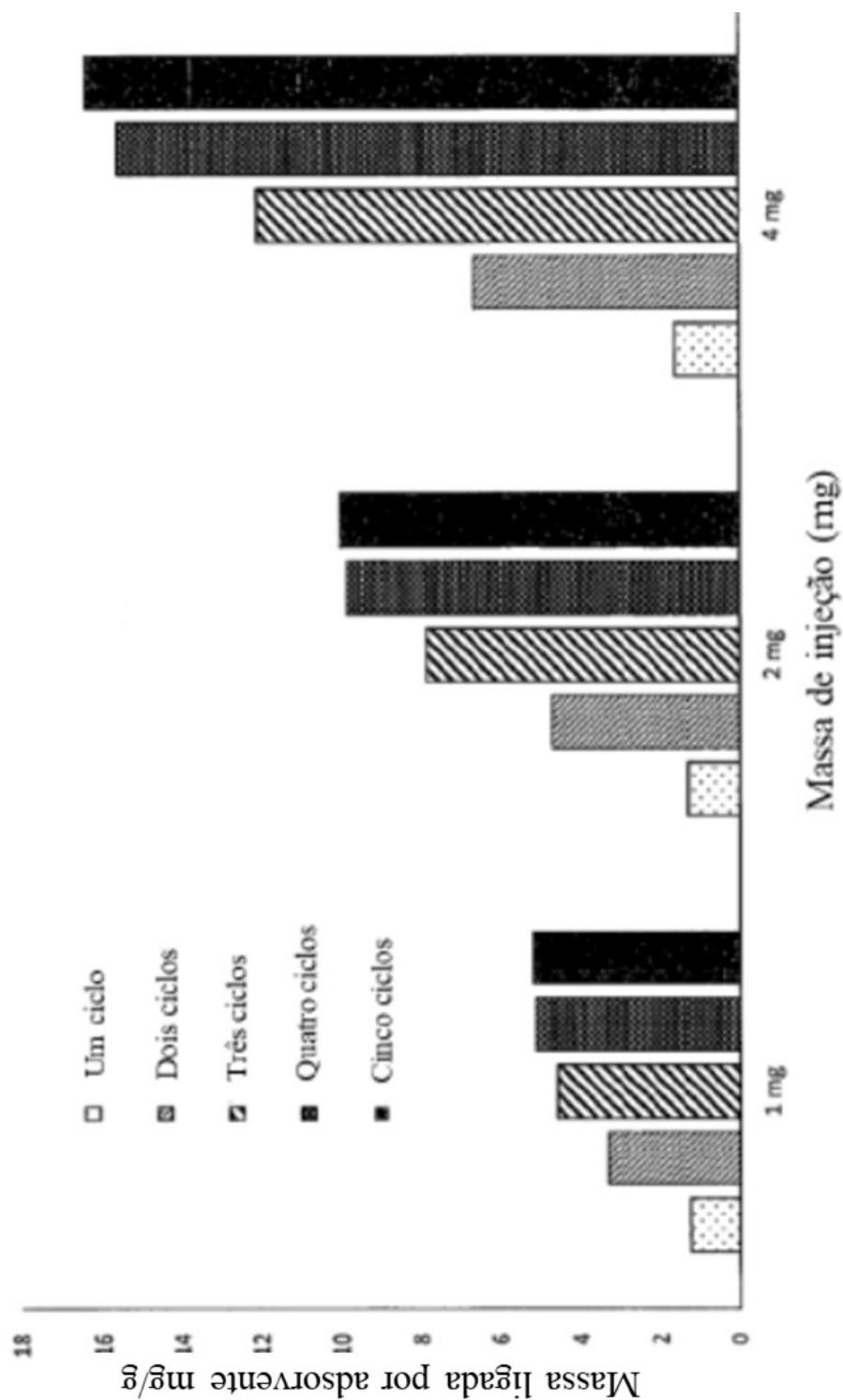


Figura 12

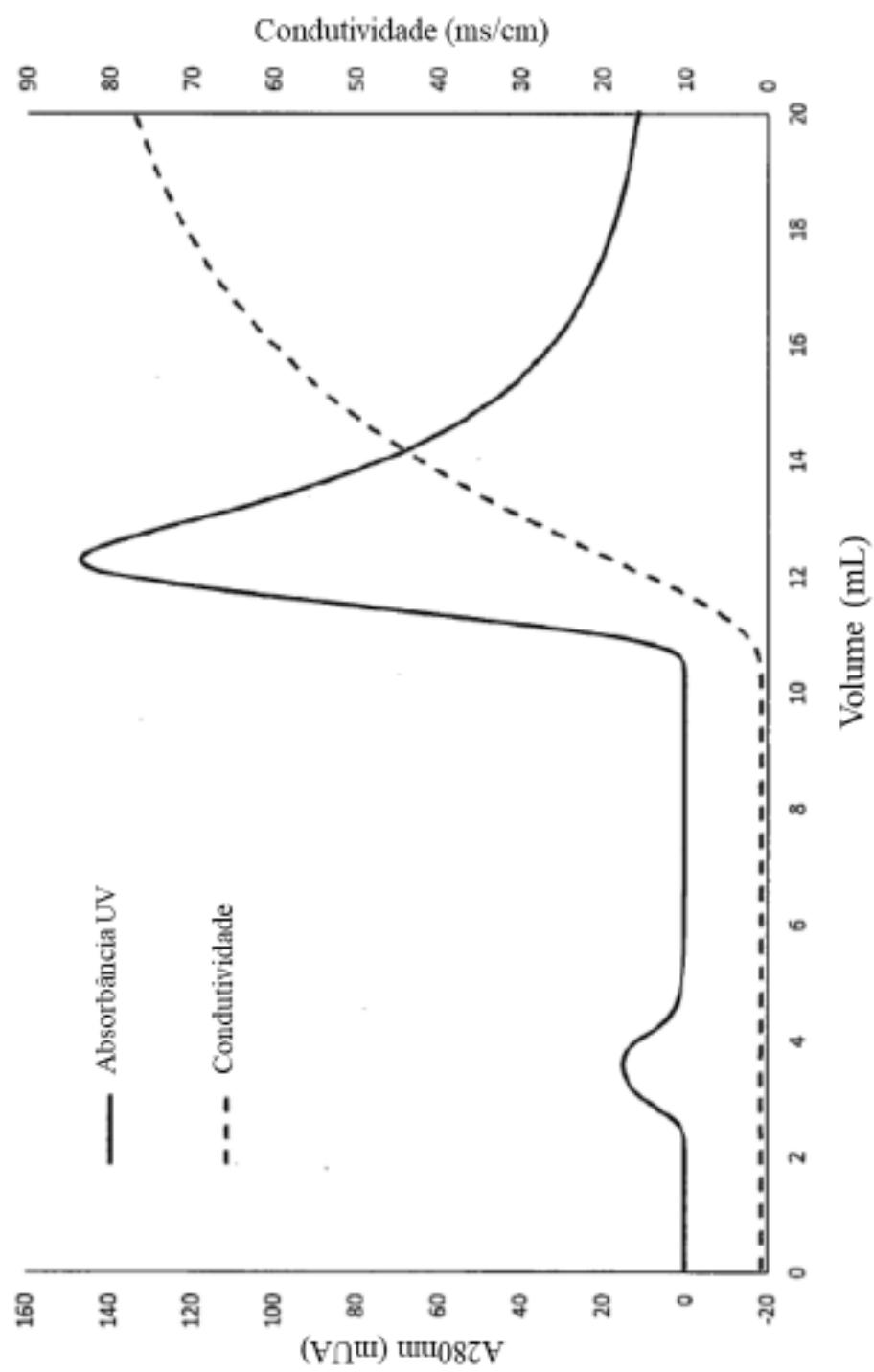


Figura 13

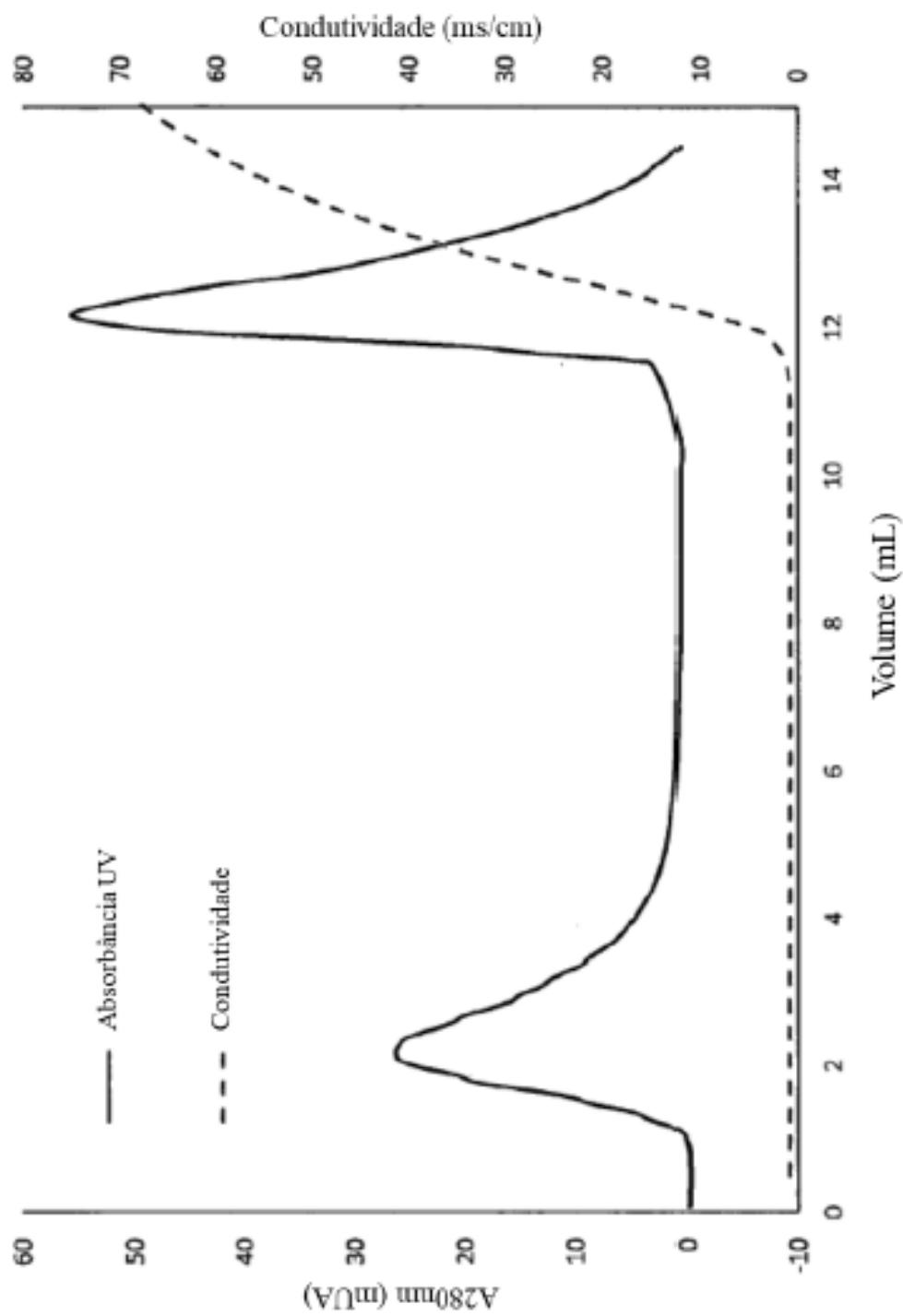


Figura 14

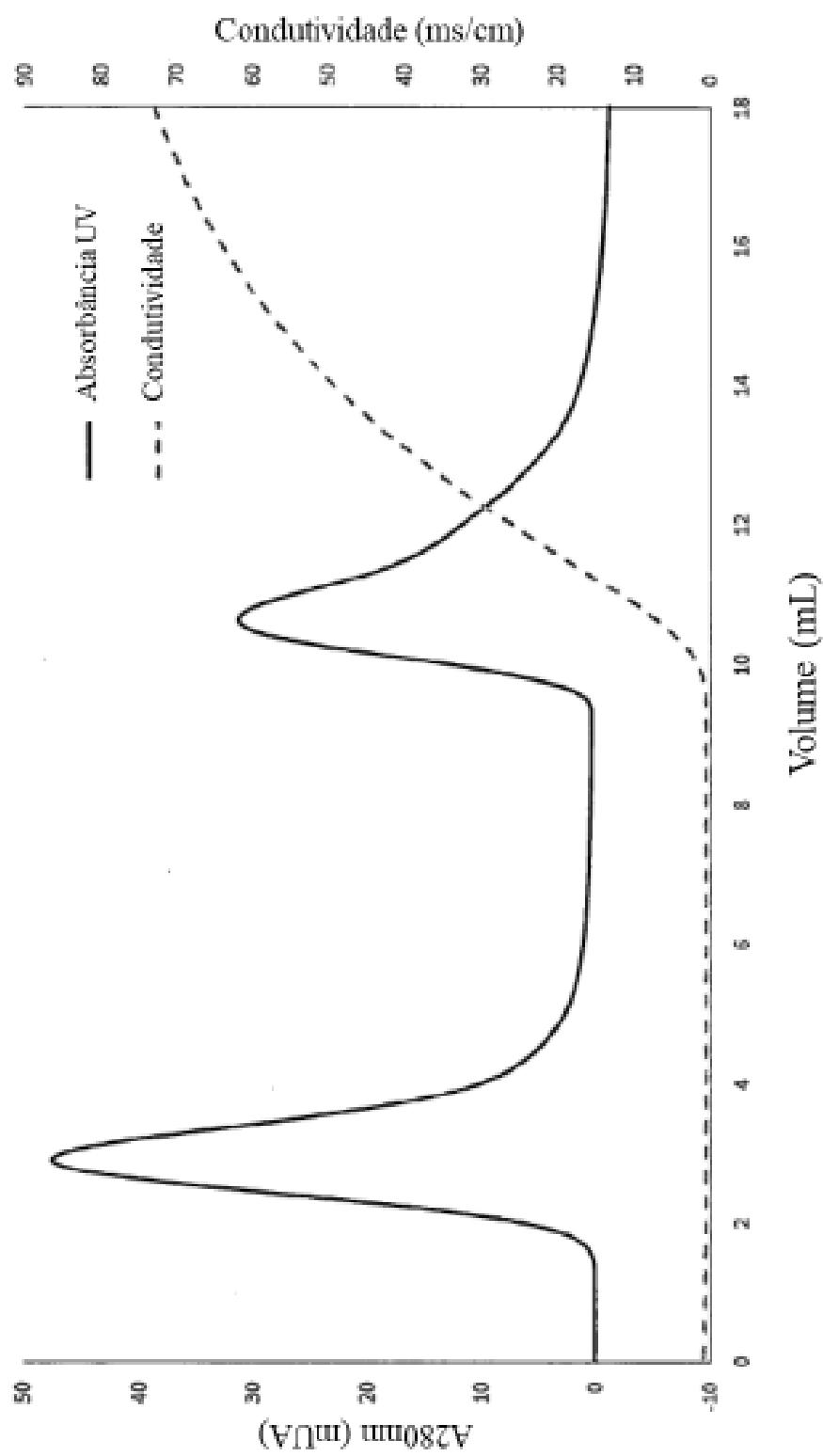


Figura 15

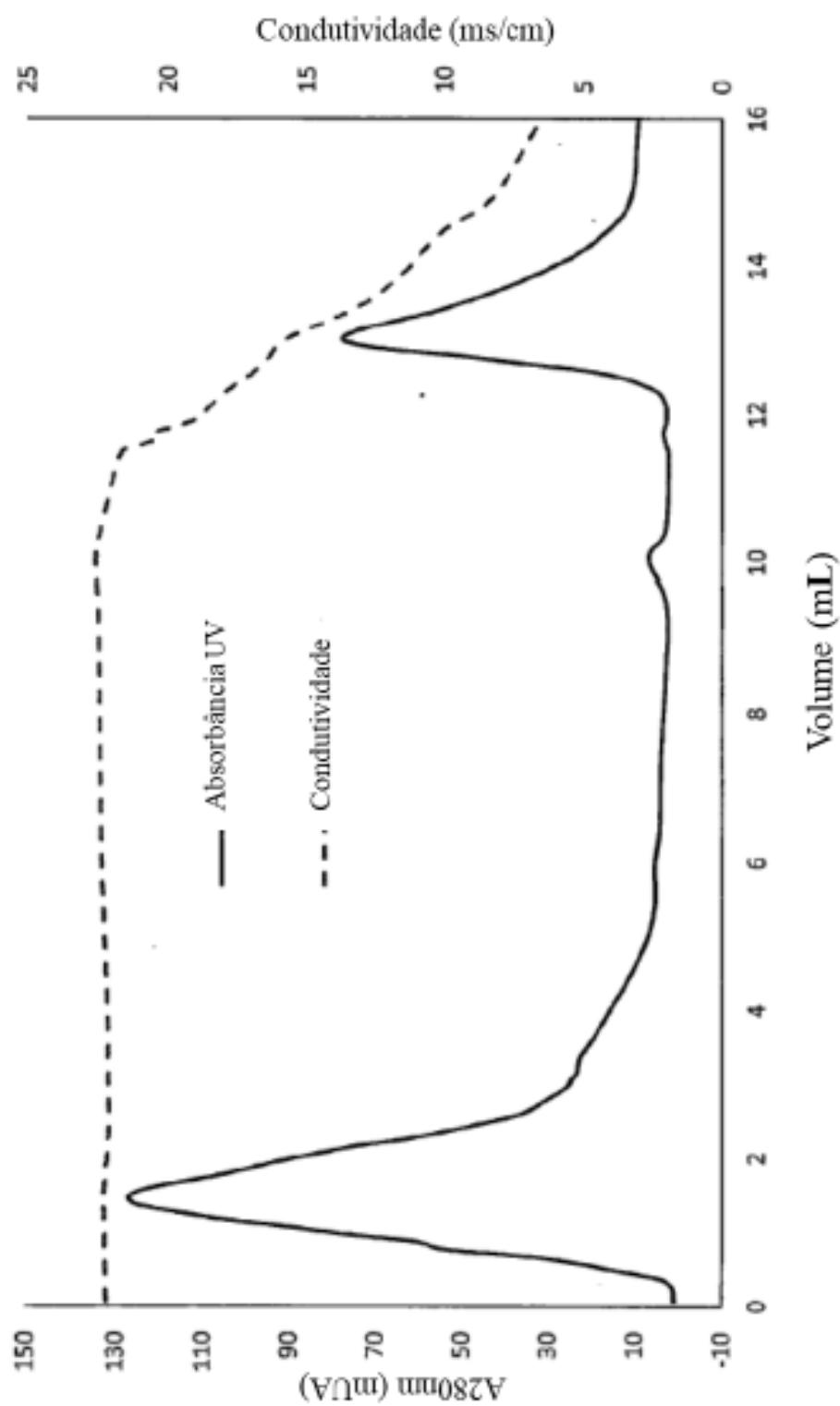


Figura 16

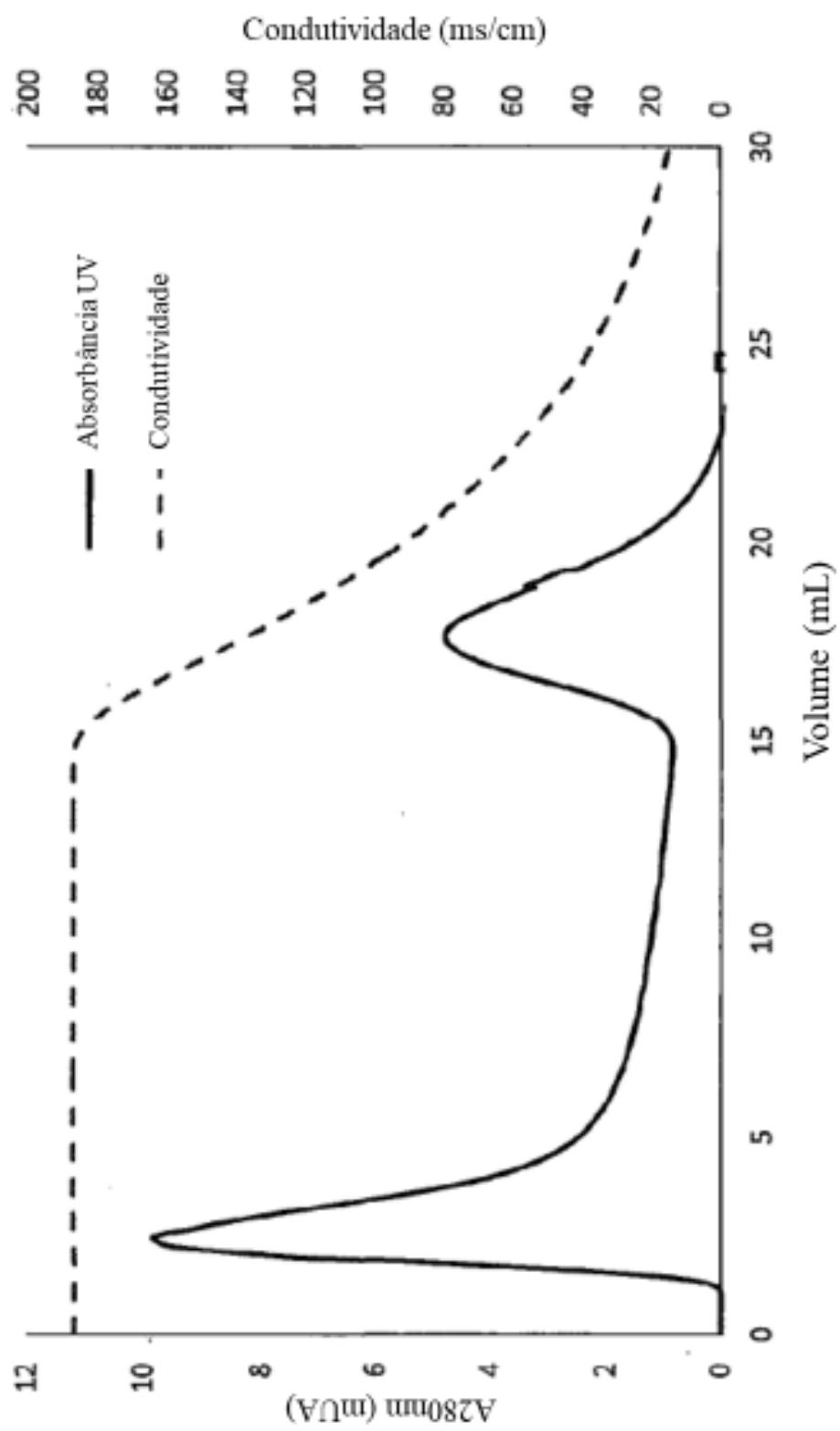


Figura 17

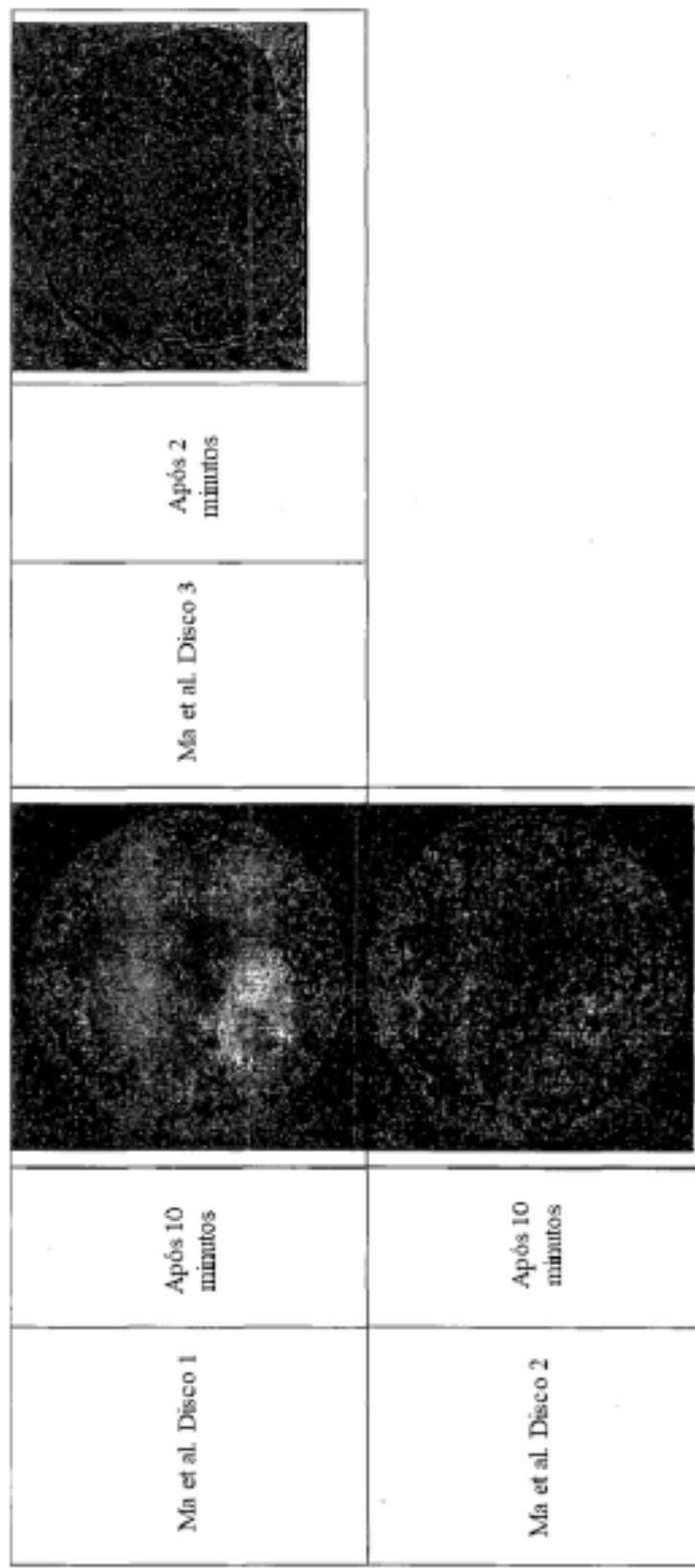


Figura 18

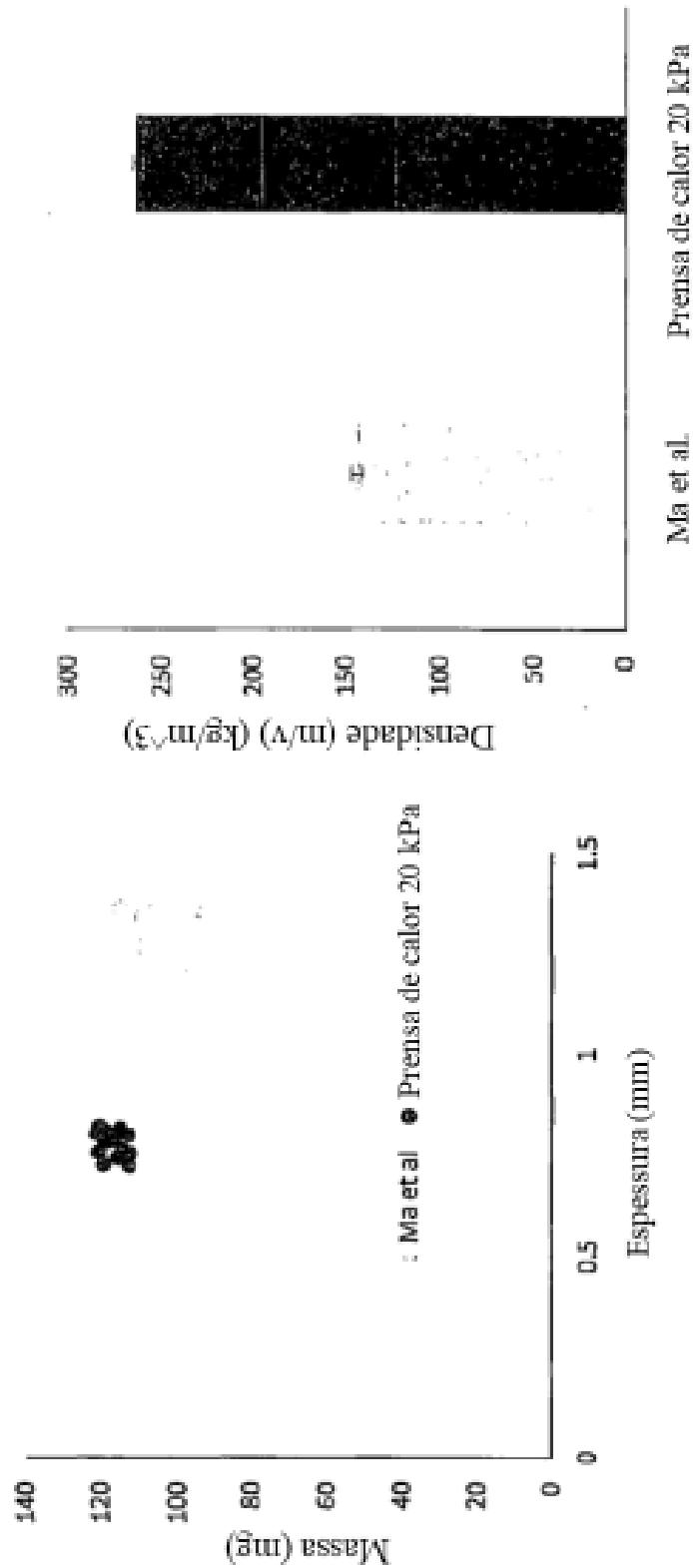


Figura 19

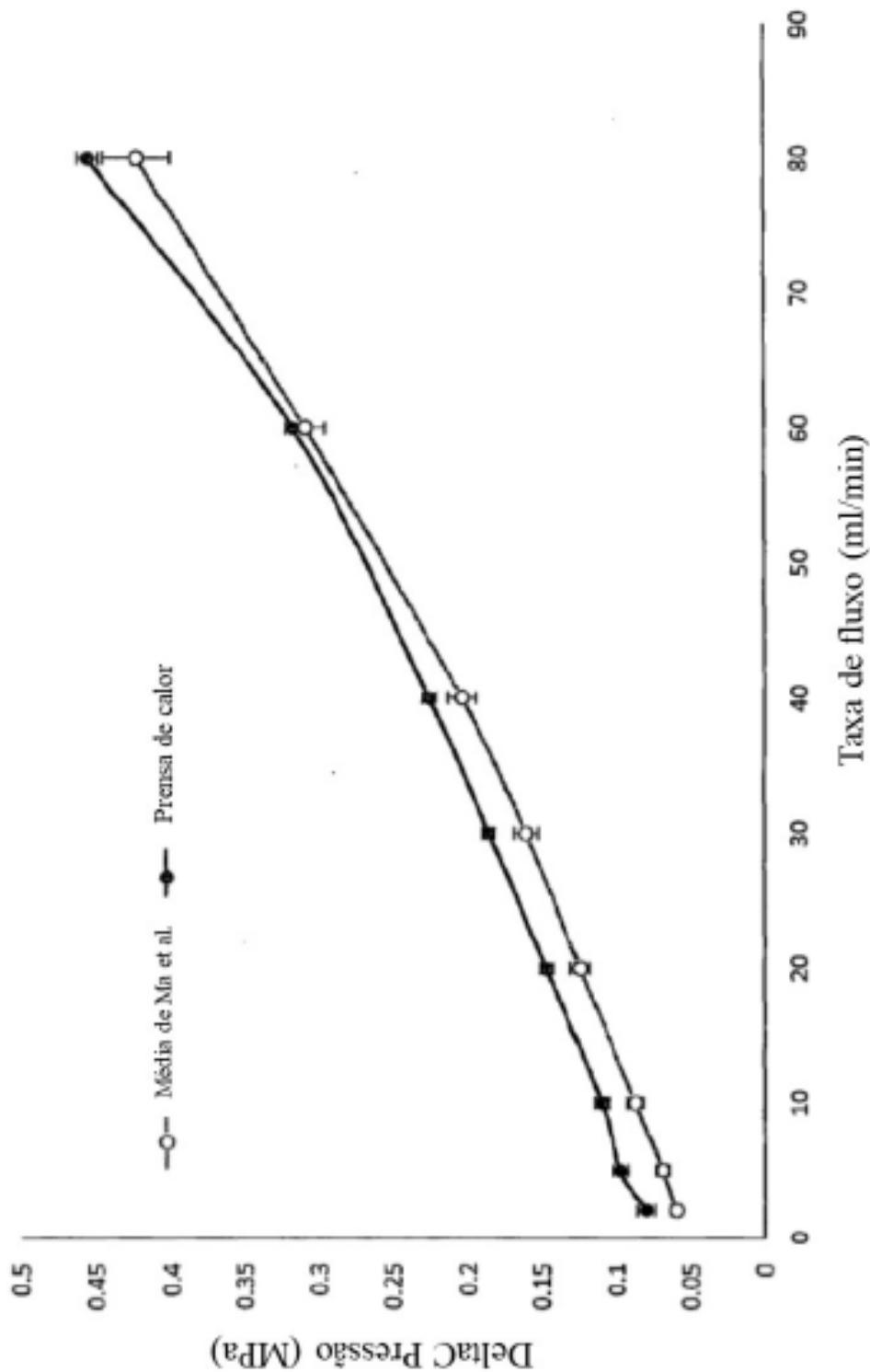


Figura 20

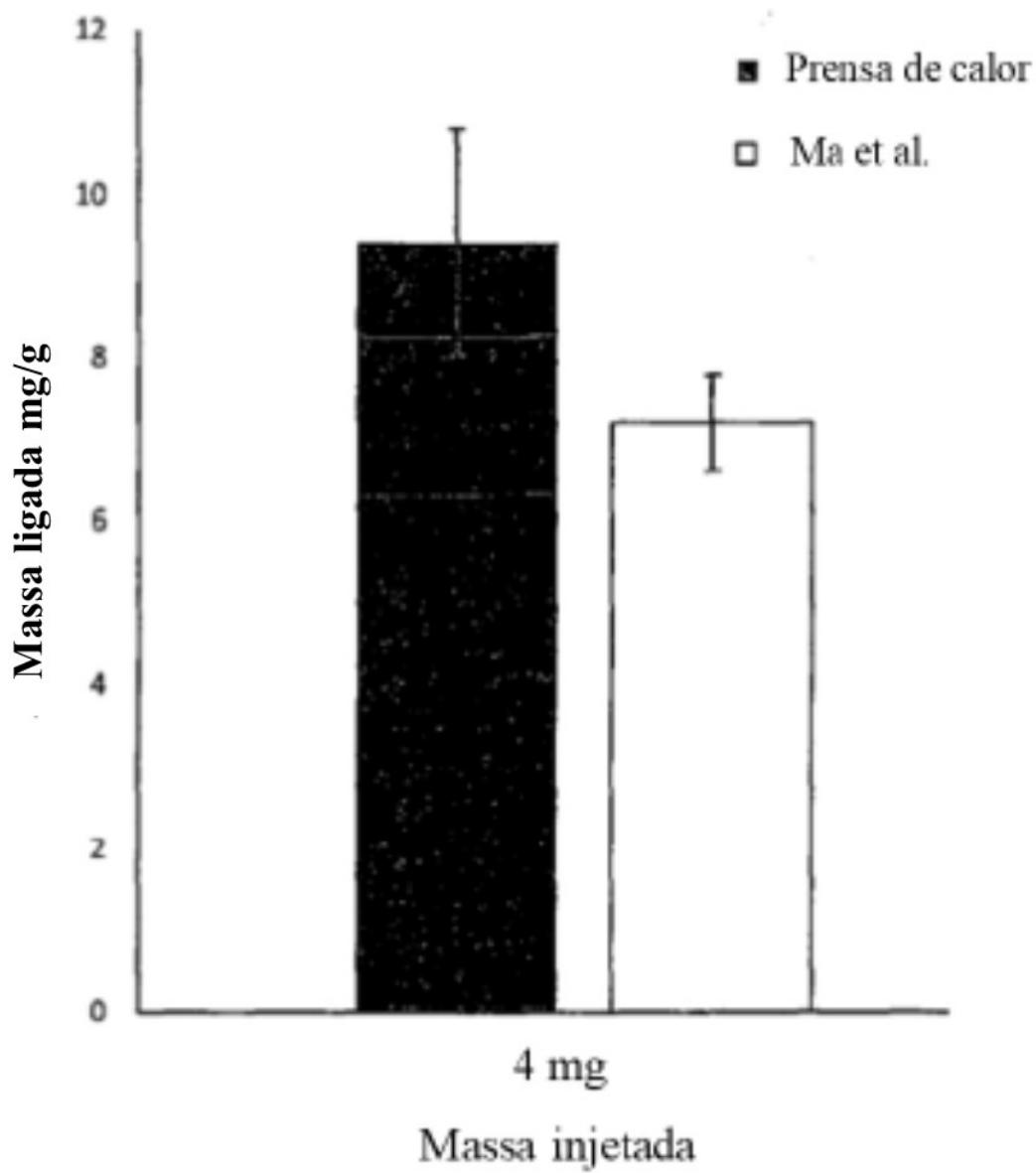


Figura 21

