



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

B01D 63/10 (2019.05); B01D 63/14 (2019.05); B01D 67/009 (2019.05); B01D 69/02 (2019.05); B01D 69/10 (2019.05); B01D 69/125 (2019.05); B01D 71/40 (2019.05); B01D 71/78 (2019.05); C07K 1/34 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018112487, 11.10.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.10.2016

Дата регистрации:  
30.08.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
23.10.2015 US 62/245,403

(45) Опубликовано: 30.08.2019 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 23.05.2018

(86) Заявка РСТ:  
US 2016/056326 (11.10.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2017/069965 (27.04.2017)

Адрес для переписки:  
105215, Москва, а/я 26, Рыбина Н. А.

(72) Автор(ы):

ХЕСТЕР, Джонатан Ф. (US),  
КАСТРО ФОРЕРО, Ангелинес А. (US),  
ДЖЕЛЛИУМ, Грегори М. (US),  
РАСМУССЕН, Джеральд К. (US),  
СЕШАДРИ, Каннан (US),  
УАЛЛЕР, Клинтон П., Джр. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЗМ ИННОВЕЙТИВ ПРОПЕРТИЗ  
КОМПАНИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 2010/155323 A1, 24.06.2010. US  
2015136698 A1, 21.05.2015. US 2015/099413 A1,  
09.04.2015. RU 2170136 C1, 10.07.2001. RU  
2131284 C1, 10.06.1999.

(54) Упорядоченный фильтрующий материал для очистки биоматериала

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологии очистки или отделения целевых биоматериалов из жидких смесей. Описан упорядоченный фильтрующий материал для очистки и/или выделения биоматериалов из жидкости, содержащий: (i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, причем анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и (ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана содержит множество гуанидильных групп. При этом первый

фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя. Описаны также фильтрующее устройство для очистки и/или выделения биоматериалов из жидкостей и способ фильтрации биологических жидкостей. Технический результат – обеспечение фильтрующего материала, обладающего высокой способностью к очистке клеточного дебриса из жидкости, высокой способностью к существенному восстановлению ДНК из жидкости, высокой степенью восстановления белка клетки-хозяина, при этом также минимизируя количество стадий процесса. 3 н. и 22 з.п. ф-лы, 7 ил., 4 табл., 19 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

**B01D 67/00** (2006.01)**B01D 69/10** (2006.01)**B01D 71/40** (2006.01)**B01D 71/78** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

**B01D 63/10** (2019.05); **B01D 63/14** (2019.05); **B01D 67/009** (2019.05); **B01D 69/02** (2019.05); **B01D 69/10** (2019.05); **B01D 69/125** (2019.05); **B01D 71/40** (2019.05); **B01D 71/78** (2019.05); **C07K 1/34** (2019.05)

(21)(22) Application: **2018112487, 11.10.2016**

(24) Effective date for property rights:  
**11.10.2016**

Registration date:  
**30.08.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**23.10.2015 US 62/245,403**

(45) Date of publication: **30.08.2019 Bull. № 25**(85) Commencement of national phase: **23.05.2018**

(86) PCT application:  
**US 2016/056326 (11.10.2016)**

(87) PCT publication:  
**WO 2017/069965 (27.04.2017)**

Mail address:  
**105215, Moskva, a/ya 26, Rybina N. A.**

(72) Inventor(s):

**HESTER, Jonathan F. (US),**  
**CASTRO FORERO, Angelines A. (US),**  
**JELLUM, Gregory M. (US),**  
**RASMUSSEN, Jerald K. (US),**  
**SESHADRI, Kannan (US),**  
**WALLER, Clinton P., Jr. (US)**

(73) Proprietor(s):

**3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY**  
**(US)**

(54) **ORDERED FILTER MATERIAL FOR BIOMATERIAL PURIFICATION**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to technology of purification or separation of target biomaterials from liquid mixtures. Described is an ordered filtration material for purification and / or extraction of biomaterial from liquid, containing: (i) a first filtering layer comprising an anion-exchange nonwoven substrate, the anion-exchange nonwoven substrate comprising a plurality of quaternary ammonium groups; and (ii) a second filter layer comprising a functionalised microporous membrane, wherein the functionalised microporous membrane contains a plurality of guanidyl

groups. First filtering layer is located upstream of the second filtering layer. Described also is a filtering device for purifying and/or extracting biomaterials from liquids and a method of filtering biological fluids.

EFFECT: technical result is providing a filter material having high ability to purify cellular debris from liquid, high capacity for substantial DNA recovery from liquid, high degree of recovery of host cell protein, while also minimizing the number of stages of the process.

25 cl, 7 dwg, 4 tbl, 19 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Раскрыт упорядоченный фильтрующий материал, содержащий функционализированный нетканый материал и функционализированную пористую мембрану. Упорядоченный фильтрующий материал полезен, например, для очистки биоматериала.

Уровень техники

Изготовление крупномасштабных или коммерческих количеств терапевтически полезных целевых биоматериалов, таких как белки, может быть достигнуто путем выращивания клеток, которые сконструированы для получения желаемого белка в биореакторах в контролируемых условиях. Используемая технология включает, например, ферментацию микроорганизмов, которые были изменены с использованием методов рекомбинантной ДНК, или культивирование клеток млекопитающих, которые были изменены с использованием гибридных методов. Клетки суспендируют в бульоне, который содержит соли, сахара, белки и различные факторы, необходимые для поддержания роста конкретных клеток. Желаемый продукт может быть либо секретирован клетками в бульон, либо сохранен в теле клетки. Затем собранный бульон обрабатывают для извлечения, очистки и концентрирования желаемого продукта.

Отделение или очистка данных целевых биоматериалов из неоднородной смеси, как оказалось, является сложной задачей, по меньшей мере, по следующим причинам: желаемый продукт часто представляет собой маленький процент от общей культуральной жидкости, которая содержит значительные количества частиц и растворимых загрязняющих веществ, и культуральная жидкость может содержать высокие концентрации соли.

В результате данных факторов необходимо использовать масштабную технологию производства и выделения целевого продукта для получения больших количеств очищенного продукта. Такая технология производства и выделения целевого продукта включает множество стадий обработки, которые происходят после производства целевого биоматериала, включая, например, центрифугирование, разрушение клеток, механическое просеивание, микрофильтрацию, ионообмен, фильтрацию с поперечным потоком, разделение по аффинности, стерилизацию, очистку и упаковку. Технология производства и выделения целевого продукта представляет собой значительную стоимость производства продуктов, полученных биологическими методами.

Для очистки или отделения целевых биоматериалов из жидких смесей были описаны различные фильтрующие изделия. Публикация патентной заявки США №2011/0207196 (Koehler et al.) описывает слой глубинного фильтра с неорганическим двойным гидроксидным слоем для удержания загрязняющих веществ, таких как ДНК, тогда как белки биотехнологических процессов пропускаются через него. Патент США №5,567,615 (Degen et al.) описывает способ разделения по аффинности, включающий динамическую фильтрацию, которая, как указывается, является особенно полезной для выделения биологически активных соединений. Публикация патентной заявки США №2012/0252091 (Rasmussen et al.) описывает субстрат, привитый полимером, который имеет аффинность к связыванию нейтральных или отрицательно заряженных биоматериалов.

Сущность изобретения

Желательно, чтобы фильтрующая среда повышала экономическую эффективность выделения и/или очистки биоматериалов из проб жидкости. Такая эффективность может обеспечиваться в виде увеличенной пропускной способности из-за уменьшения количества стадий способа увеличенной пропускной способности одной стадии и/или лучшего удаления загрязняющих веществ, что в результате приводит к уменьшенной

загрузке примесей в устройства для очистки на последующих стадиях (такие как хроматографические колонки или фильтры).

В одном аспекте, описывается упорядоченный фильтрующий материал, содержащий:

(i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, причем анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и

(ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана содержит множество гуанидильных групп;

при этом первый фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя.

В другом аспекте, описывается способ фильтрации биологической жидкости, включающий стадии, на которых:

(а) обеспечивают биологическую жидкость, причем биологическая жидкость содержит целевой биоматериал и загрязняющие вещества, и

(б) вводят в контакт биологическую жидкость с упорядоченным фильтрующим материалом, причем упорядоченный фильтрующий материал содержит: (i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, при этом анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и (ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана содержит множество гуанидильных групп; и при этом первый фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя.

Изложенная выше сущность изобретения не предназначена для описания каждого варианта осуществления. Детали одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения также изложены ниже в описании. Другие признаки, объекты и преимущества будут очевидны из описания и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

ФИГ. 1 представляет собой вид в перспективе иллюстративного варианта осуществления упорядоченного фильтрующего материала в соответствии с настоящим изобретением, сформированного в многослойное изделие, содержащее множество складок;

ФИГ. 2 представляет собой вид в поперечном сечении иллюстративного фильтрующего устройства, представленного в двояковыпуклой форме, и содержащего упорядоченный фильтрующий материал в соответствии с настоящим изобретением;

ФИГ. 3 представляет собой вид в перспективе и частичном разрезе иллюстративного фильтрующего устройства, представленного в инкапсулированной форме, и содержащего упорядоченный фильтрующий материал в соответствии с настоящим изобретением;

ФИГ. 4 представляет собой вид в поперечном сечении, взятый при 4-4 ФИГ. 3 иллюстративного фильтрующего устройства, представленного в инкапсулированной форме, и содержащего складчатый цилиндр для среды, содержащий упорядоченный фильтрующий материал в соответствии с настоящим изобретением;

ФИГ. 5 представляет собой вид в поперечном сечении, взятый при 4-4 ФИГ. 3 иллюстративного фильтрующего устройства, представленного в инкапсулированной форме, и содержащего сердечник, при этом упорядоченный фильтрующий материал в соответствии с настоящим изобретением спирально намотан вокруг сердечника;

ФИГ. 6 представляет собой график зависимости давления от пропускной способности

для примера 3 и сравнительных примеров C6-C8; и

ФИГ. 7 представляет собой изображение геля SDS-PAGE фугата СНО 4 и фильтрата из примеров 6-8 и сравнительного примера C11.

Хотя описанные выше фигуры 1-5 представляют несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, также рассматриваются другие варианты осуществления, как отмечено в обсуждении. Во всех случаях, настоящее изобретение представляет изобретение посредством представления, а не ограничений.

Детальное описание изобретения

Как используется в данной заявке, термин

«Алкил» означает линейный или разветвленный, циклический или ациклический, насыщенный одновалентный углеводород, содержащий от одного до приблизительно двенадцати атомов углерода, например, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, пентил и тому подобное.

«Алкилен» означает линейный насыщенный двухвалентный углеводород, содержащий от одного до приблизительно двенадцати атомов углерода, или разветвленный насыщенный двухвалентный углеводород, содержащий от трех до приблизительно двенадцати атомов углерода, например, метилен, этилен, пропилен, 2-метилпропилен, пентилен, гексилен и тому подобное.

«Алкенил» означает линейный ненасыщенный одновалентный углеводород, содержащий от двух до приблизительно двенадцати атомов углерода, или разветвленный ненасыщенный углеводород, содержащий от трех до приблизительно двенадцати атомов углерода.

«Алкеноил» означает алкенильную группу, которая содержит карбонильную ( $-C(=O)-$ ) группу.

«Арил» означает одновалентную ароматическую группу, такую как фенил, нафтил и тому подобное.

«Гуанидил» означает функциональную группу, выбранную из, по меньшей мере, одного из гуанидина и бигуанида.

«Гетероарилен» относится к двухвалентной группе, которая является ароматической и гетероциклической. Иными словами, гетероарилен включает, по меньшей мере, один гетероатом в ароматическом кольце, имеющем 5 или 6 членов. Приемлемыми гетероатомами являются, как правило, окси, тио или амино. Группа может иметь от одного до пяти колец, которые являются связанными, конденсированными или их комбинацией. По меньшей мере, одно кольцо является гетероароматическим, и какое-либо другое кольцо может быть ароматическим, неароматическим, гетероциклическим, карбоциклическим или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления, гетероарилен имеет вплоть до 5 колец, вплоть до 4 колец, вплоть до 3 колец, вплоть до 2 колец, или одно кольцо. Примеры гетероариленовых групп включают, но не ограничиваются приведенным, триазиндиил, пиридиндиил, пиримидиндиил, пиридазиндиил и тому подобное.

«Углеводородный радикал» включает арил и алкил.

«(Гетеро)углеводородный радикал» включает углеводородные алкильные и арильные группы, и гетероуглеводородные гетероалкильные и гетероарильные группы, где последняя содержит один или несколько цепных (в цепи) гетероатомов, таких как атомы кислорода или азота. Гетероуглеводородный радикал может необязательно содержать одну или несколько цепных (в цепи) функциональных групп, включая сложнэфирные, амидные, мочевиные, уретановые и карбонатные функциональные группы. Если не указано иное, неполимерные (гетеро)углеводородные группы, как правило, содержат

от 1 до 60 атомов углерода. Некоторые примеры таких гетероуглеводородных радикалов, как используется в данной заявке, включают, но не ограничиваются приведенным, метокси, этокси, пропокси, 4-дифениламинобутил, 2-(2'-феноксietокси) этил, 3,6-диоксагептил, 3,6-диоксагексил-6-фенил, в дополнение к тем, которые описаны для «алкила», «гетероалкила», «арила» и «гетероарила» выше.

Единственное число означает один или несколько.

«И/или» используется для обозначения одного или обоих указанных случаев, которые могут происходить, например, А и/или В включает, (А и В) и (А или В).

Кроме того, в данной заявке, описание диапазонов по конечным точкам включает все числа, включенные в пределы такого диапазона (например, от 1 до 10 включает 1,4, 1,9, 2,33, 5,75, 9,98 и т.д.).

Кроме того, в данной заявке, описание «по меньшей мере, один» включает все числа от одного и больше (например, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 25, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 100, и т.д.).

Настоящее изобретение обеспечивает упорядоченный фильтрующий материал, содержащий два различных субстрата, функционализированных различными функционализированными лигандами. Упорядоченный фильтрующий материал содержит, по меньшей мере, две различные функционализированные среды в определенном порядке. В одном варианте осуществления, (i) первый фильтрующий слой, который содержит нетканый субстрат, функционализированный четвертичными аммониевыми группами, расположен выше по потоку от (ii) второго фильтрующего слоя, который содержит микропористый мембранный субстрат, функционализированный гуанидильными группами.

Первый фильтрующий слой (i) представляет собой анионообменный нетканый субстрат, содержащий четвертичные аммониевые группы.

Нетканый субстрат представляет собой нетканое полотно, которое может включать нетканые полотна, изготовленные по любому из общеизвестных способов получения нетканых полотен. Как используется в данной заявке, термин «нетканое полотно» относится к ткани, которая имеет структуру отдельных волокон или филаментов, которые случайным образом и/или однонаправленно переплетены рогожкоподобным образом.

Например, волокнистое нетканое полотно может быть получено с использованием кардочесанного способа, суховоздушного формования, влажного формования, гидросплетения, скрепления прядением, электропрядения или плавления с раздувом, такого как прядение из расплава или плавление с раздувом, или их комбинаций. Волокна, полученные скреплением прядением, как правило, представляют собой волокна маленького диаметра, которые образованы путем экструдирования расплавленного термопластичного полимера в виде филаментов из множества мелких, обычно круглых капилляров фильеры с диаметром экструдированных волокон, которые быстро уменьшаются. Волокна, полученные плавлением с раздувом, как правило, образуются путем экструдирования расплавленного термопластичного материала через множество мелких, обычно круглых, капилляров головки в виде расплавленных нитей или филаментов в высокоскоростном, как правило, потоке нагретого газа (например, воздуха), который ослабляет филаменты расплавленного термопластичного материала для уменьшения их диаметра. После этого, волокна, полученные плавлением с раздувом, переносятся высокоскоростным газовым потоком и осаждаются на собирающей поверхности с образованием полотна из случайно распределенных волокон, полученных

плавлением с раздувом. Любое из нетканых полотен может быть получено из волокна одного типа или двух или более волокон, которые отличаются типом термопластичного полимера и/или толщиной.

5 Штапельные волокна также могут присутствовать в полотне. Присутствие штапельных волокон обычно обеспечивает более высокосортное, менее плотное полотно, чем полотно только из микроволокон, полученных плавлением с раздувом. Предпочтительно, присутствует не более, чем приблизительно 20 массовых процентов штапельных волокон, более предпочтительно не более, чем приблизительно 10 массовых процентов. Такие полотна, содержащие штапельное волокно, раскрыты в патенте США  
10 №4,118,531 (Hauser).

Нетканое изделие может необязательно дополнительно содержать один или несколько слоев холста. Например, какая-либо одна или обе основные поверхности, каждая, могут необязательно дополнительно содержать слой холста. Холст, который, как правило, представляет собой тканый или нетканый армированный материал, изготовленный из  
15 волокон, включают для обеспечения прочности нетканого изделия. Приемлемые материалы холста включают, но не ограничиваются приведенным, нейлон, сложный полиэфир, стекловолокно, полиэтилен, полипропилен, и тому подобное. Средняя толщина холста может варьироваться. Как правило, средняя толщина холста находится в диапазоне от приблизительно 25 до приблизительно 100 микрон, предпочтительно от приблизительно 25 до приблизительно 50 микрон. Слой холста необязательно может быть соединен с нетканым изделием. Для соединения холста с полимерным материалом могут быть использованы различные адгезивные материалы. Альтернативно, холст может быть термически скреплен с нетканым  
20 материалом.

Микроволокна нетканого субстрата, как правило, имеют эффективный диаметр волокна от, по меньшей мере, 0,5, 1, 2 или даже 4 микрон и не больше, чем 15, 10, 8 или даже 6 микрон, как рассчитывают в соответствии со способом, представленным в Davies, C.N., «The Separation of Airborne Dust and Particles», Institution of Mechanical Engineers, London, Proceedings 1B, 1952. Нетканый субстрат предпочтительно  
30 имеет основную массу в диапазоне от, по меньшей мере, 5, 10, 20 или даже 50 г/м<sup>2</sup>; и не больше, чем 800, 600, 400, 200 или даже 100 г/м<sup>2</sup>. Минимальная прочность на растяжение нетканого полотна составляет приблизительно 4,0 Ньютонов. Общеизвестно, что прочность на растяжение нетканых материалов является ниже в продольном направлении, чем в поперечном направлении из-за лучшего соединения волокон и переплетения в последнем.  
35

Более подробная информация о способе изготовления нетканых полотен может быть найдена в Wente, Superfine Thermoplastic Fibers, 48 INDUS. ENG. CHEM. 1342 (1956), или в Wente et al., Manufacture Of Superfine Organic Fibers (Naval Research Laboratories Report No. 4364, 1954).  
40

Упругость нетканого полотна измеряют по твердости, параметру, который определяет долю твердых веществ в объеме полотна. Более низкие значения твердости указывают на большую упругость полотна. Полезные нетканые субстраты имеют твердость менее, чем 20% или даже менее, чем 15%. Твердость представляет собой безразмерный параметр, как правило, представленный  $\alpha$ :  
45

$$\alpha = m_f \div \rho_f \times L_{\text{нетканый}}$$

где  $m_f$  представляет собой массу волокна на площадь поверхности пробы, при этом  $\rho_f$  представляет собой плотность волокна; и

$L_{\text{нетканый}}$  представляет собой толщину нетканого материала. Твердость используется в данной заявке для обозначения самого нетканого субстрата, а не функционализированного нетканого материала. Когда нетканый субстрат содержит смеси двух или больше видов волокон, индивидуальные твердости определяются для каждого вида волокна с использованием одного и того же  $L_{\text{нетканый}}$  и данные индивидуальные твердости суммируются вместе для того, чтобы получить твердость полотна,  $\alpha$ .

Нетканый субстрат может быть образован из волокон или филаментов, изготовленных из любого приемлемого термопластичного полимерного материала. Приемлемые полимерные материалы включают, но не ограничиваются приведенным, полиолефины, поли(изопрены), поли(бутадиены), фторированные полимеры, хлорированные полимеры, полиамиды, полиимиды, полиэфиры, поли(эфирные сульфоны), поли(сульфоны), поли(винилацетаты), сополимеры винилацетата, такие как поли(этилен)-со-поли(виниловый спирт), поли(фосфазены), поли(виниловые сложные эфиры), поли(виниловые простые эфиры), поли(виниловые спирты) и поли(карбонаты).

Приемлемые полиолефины включают, но не ограничиваются приведенным, поли(этилен), поли(пропилен), поли(1-бутен), сополимеры этилена и пропилена, альфа-олефиновые сополимеры (такие как сополимеры этилена или пропилена с 1-бутеном, 1-гексеном, 1-октеном и 1-деценом), поли(этилен-со-1-бутен) и поли(этилен-со-1-бутен-со-1-гексен).

Приемлемые фторированные полимеры включают, но не ограничиваются приведенным, поли(винилфторид), поли(винилиденфторид), сополимеры винилиденфторида (такие как поли(винилиденфторид-со-гексафторпропилен) и сополимеры хлортрифторэтилена (такие как поли(этилен-со-хлортрифторэтилен)).

Приемлемые полиамиды включают, но не ограничиваются приведенным: поли(иминоадипоилиминогексаметилен), поли(иминоадипоилиминодекаметилен) и поликапролактam. Приемлемые полиимиды включают поли(пиромеллитимид).

Приемлемые поли(эфирные сульфоны) включают, но не ограничиваются приведенным, поли(дифенилсульфоновый эфир) и поли(дифенилсульфон-со-дифениленоксидсульфон).

Приемлемые сополимеры винилацетата включают, но не ограничиваются приведенным, поли(этилен-со-винилацетат) и такие сополимеры, в которых, по меньшей мере, некоторые из ацетатных групп являются гидролизованными с получением различных поли(виниловых спиртов), включая поли(этилен-со-виниловый спирт).

Нетканый субстрат в соответствии с настоящим изобретением обрабатывают так, что он содержит четвертичную аммониевую функциональную группу, то есть,

$-N^+R^1R^2R^3X^-$ , где  $X^-$  представляет собой противоионную группу, часто галогенид (например,  $Cl^-$ ), сульфат, фосфат, нитрат, и тому подобное. В некоторых вариантах

осуществления,  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  аммониевой функциональной группы все представляют собой метил. В других вариантах осуществления, одна из  $R^1$ ,  $R^2$  или  $R^3$  групп представляет собой метил, и две другие представляют собой алкил, содержащий от 2 до 18, от 2 до 10, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомов углерода. В других вариантах

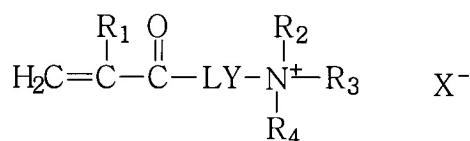
осуществления, две из  $R^1$ ,  $R^2$  или  $R^3$  групп представляют собой метил, и другая группа представляет собой алкил, содержащий от 2 до 18, от 2 до 10, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомов углерода. В еще других вариантах осуществления, по меньшей мере, две из  $R^1$ ,



$R^2$  и  $R^3$  групп объединяются с атомом азота, к которому они присоединены, с образованием гетероциклической группы. Гетероциклическая группа включает, по меньшей мере, один атом азота, и может содержать другие гетероатомы, такие как кислород или сера. Иллюстративные гетероциклические группы включают, но не ограничиваются приведенным, пиперидинил и морфолинил. Гетероциклическая группа может быть конденсирована с дополнительным кольцом, таким как бензол, циклогексен или циклогексан.

Четвертичная аммониевая группа ковалентно связывается с нетканым субстратом с использованием методов, известных в данной области техники. Как правило, четвертичную аммониевую группу прививают через связывающую группу непосредственно на нетканый субстрат или на нетканый субстрат, который обработан слоем праймера.

В одном варианте осуществления, нетканый субстрат прививают с использованием четвертичной аммониевой соли аминокрил(мет)акрилоильного мономера, такого как



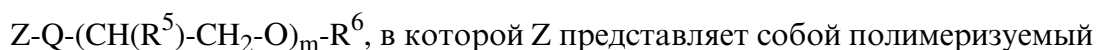
, Формула I

в которой  $R_1$  представляет собой водород или метил, предпочтительно метил; L представляет собой -O- или -NH-; и Y представляет собой алкилен (например, алкилен, содержащий от 2 до 10 атомов углерода, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомов углерода).  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой арил или алкил, предпочтительно  $C_1$ - $C_4$  алкил; и  $X^-$  представляет собой противоион.

Иллюстративные четвертичные соли аминокрил(мет)акрилоильных мономеров формулы I включают, но не ограничиваются приведенным, (мет)акриламидоалкилтриметиламмониевые соли (например, 3-метакриламидопропилтриметиламмония хлорид и 3-акриламидопропилтриметиламмония хлорид) и (мет)акрилоксиалкилтриметиламмониевые соли (например, 2-акрилоксиэтилтриметиламмония хлорид, 2-метакрилоксиэтилтриметиламмония хлорид, 3-метакрилокси-2-гидроксипропилтриметиламмония хлорид, 3-акрилокси-2-гидроксипропилтриметиламмония хлорид и 2-акрилоксиэтилтриметиламмония метилсульфат).

Такие мономеры, имеющие четвертичную аммониевую группу формулы I, могут быть непосредственно привиты к поверхности нетканого субстрата, или прививаемый аминокрил(мет)акрилоильный мономер, имеющий первичную, вторичную или третичную аминогруппу, может быть привит и затем преобразован в четвертичную аммониевую группу путем алкилирования. Такое производство анионообменных нетканых материалов описывается в патенте США №8,328,023 (Weiss et al.).

В одном варианте осуществления, привитый полимер, имеющий четвертичные аммониевые группы, полученные из мономера формулы I, дополнительно содержит звенья, полученные из монофункциональных этиленненасыщенных мономеров, имеющих поли(алкиленоксид)ную группу. Мономерные звенья, имеющие поли(алкиленоксид)ную группу, представлены формулой:



этиленненасыщенный фрагмент,  $R^5$  представляет собой H или  $C_1$ - $C_4$  алкильную группу; Q представляет собой  $N(R^5)$  или O; и  $R^6$  представляет собой H,  $C_1$ - $C_4$  алкильную группу, арильную группу, или их комбинации, и m представляет собой от 2 до 100, предпочтительно от 5 до 20. Полезный этиленненасыщенный фрагмент, Z, мономера может включать:

$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{R}^3 \\ \parallel \quad   \\ -\text{C}-\text{C}=\text{CH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ -\text{C}-\text{C}_r\text{H}_{2r}-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2 \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \quad \text{R}^3 \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \quad   \\ -\text{C}-\text{NR}^3\text{C}_r\text{H}_{2r}-\text{O}-\text{C}-\text{C}=\text{CH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{l} -\text{CH}=\text{CH}_2, \text{ и} \\ -\text{C}_{r_1}\text{H}_{2r_1}-\text{CH}=\text{CH}_2 \end{array}$

где  $R^3$  представляет собой H или  $-\text{CH}_3$ , и  $r=1-10$ .

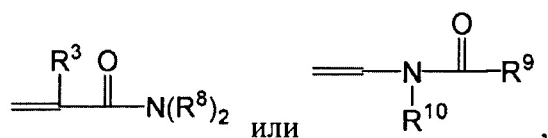
Примеры приемлемых монофункциональных поли(алкиленоксид)ных мономеров включают поли(этиленоксид) (мет)акрилат, поли(пропиленоксид) (мет)акрилат, поли(этиленоксид-пропиленоксид) (мет)акрилат и их комбинации. Такие мономеры предпочтительно включают одну нереакционноспособную концевую группу, такую как водород, ( $C_1$ - $C_4$ )алкокси, арилокси (например, фенокси) и ( $C_1$ - $C_4$ )алкиларилокси. Данные группы могут быть линейными или разветвленными. Данные мономеры могут иметь широкий диапазон молекулярных масс и являются коммерчески доступными из таких источников, как Sartomer Company, Exton, PA; Shinnakamura Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan; Aldrich, Milwaukee, WI; и Osaka Organic Chemical Ind., Ltd., Osaka, Japan.

В одном варианте осуществления, привитые полимеры, содержащие четвертичную аммониевую группу формулы I, кроме того получены из «гидрофильных мономеров». Как используется в данной заявке «гидрофильные мономеры» представляют собой такие полимеризуемые мономеры, имеющие смешиваемость с водой (воду в мономере), по меньшей мере, 1 мас. %, предпочтительно, по меньшей мере, 5 массовых % без достижения точки помутнения, которые исключают поли(алкиленоксид)ные мономеры и не содержат никаких кислотных функциональных групп или групп, которые замедляли бы прививающую полимеризацию. Примеры приемлемых гидрофильных мономеров включают 2-гидроксиэтил(мет)акрилат (НЭМА), 2-гидроксипропил(мет)акрилат, 3-гидроксипропил(мет)акрилат, 2,3-дигидроксипропил(мет)акрилат, 4-гидоксибутил(мет)акрилат, N-винилкапролактam, N-винилацетамид, N-винилпирролидон, акрилонитрил, тетрагидрофурфурилакрилат, акриламид, моно- или ди-N-алкилзамещенный акриламид, глицеринметакрилат и их комбинации. Предпочтительные полярные мономеры включают 2-гидроксиэтил(мет)акрилат (НЭМА), N-винилпирролидон, N-винилацетамид, метилакриламид и их смеси. В одном варианте осуществления, привитые полимеры, содержащие четвертичную аммониевую группу формулы I, представляют собой полимер, полученный из аминоксил (мет)акрилоильного мономера, поли(алкиленоксид)ного мономера и необязательно второго гидрофильного мономера. В одном варианте осуществления, привитый полимер получают из от 80 до 98 мас. % аминоксил (мет)акрилоильного мономера; от 2 до 20 мас. % поли(алкиленоксид)ного мономера; и от 0 до 10 мас. % гидрофильного мономера. Примеры приемлемых поли(алкиленоксид)ных мономеров включают поли(этиленоксид) (мет)акрилат, поли(пропиленоксид)(мет)акрилат, поли(этиленоксид-пропиленоксид) (мет)акрилат и их комбинации. Более подробная информация касательно такой прививки

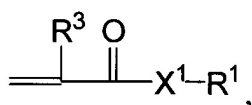
может быть найдена в патенте США №8,328,023 (Weiss et al.).

В одном варианте осуществления, привитые полимеры, содержащие четвертичную аммониевую группу формулы I, кроме того, получены из амидного мономера, оксимомера и необязательно поли(алкиленоксид)ного мономера. В одном варианте осуществления, привитый полимер получают из от 10 до 50 частей по массе мономера, содержащего четвертичную аммониевую группу; от 10 до 80 частей по массе амидного мономера; от 10 до 40 частей по массе оксимомера; и от 0 до 30 частей по массе поли(алкиленоксид)ного мономера.

Амидный мономер представляет собой гидрофильный мономер, содержащий (мет) акриламиды и N-виниламиды общих формул:



в которых  $\text{R}^3$  представляет собой -H или  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил; каждый  $\text{R}^8$  представляет собой H, алкильную или арильную группу,  $\text{R}^9$  и  $\text{R}^{10}$  представляют собой алкильные группы, или могут быть взяты вместе с образованием 5 или 6-членного кольца. Примеры приемлемых гидрофильных амидных мономеров включают N-винилкапролактam, N-винилацетамид, N-винилпирролидон, акриламид, моно- или ди-N-алкилзамещенный акриламид и их комбинации. Предпочтительные амидные мономеры включают N-винилпирролидон, N-винилацетамид, метилакриламид и их смеси. Оксимомер включает эпокси-функциональные и моноэфир-функциональные (мет)акрилаты и (мет) акриламиды, а также соединения общей формулы:



в которой:

$\text{R}^3$  представляет собой -H или  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил;  $\text{X}^1$  представляет собой - $\text{NR}^3$ - или -O-; и  $\text{R}^1$  представляет собой эпокси-функциональную или эфир-функциональную (гетеро) углеводородную группу. Более конкретно эфирная функциональная группа представляет собой низшую алкиленоксиалкильную группу. Предпочтительно,  $\text{R}^1$  группа основывается на линейно-цепочечном, разветвленном, циклическом или полициклическом углеводороде, содержащем от 2 до 30 атомов углерода, имеющем оксиановую (эпокси)группу. Более предпочтительно,  $\text{R}^8$  группа содержит от 3 до 10 атомов углерода, такая как глицидилметакрилат (GMA). Более подробная информация касательно такой прививки может быть найдена в публикации патентной заявки США №2015/0099413 (Berrigan et al.).

Средняя толщина первого фильтрующего слоя составляет предпочтительно, по меньшей мере, 0,1, 0,25 или даже 1 мм; и не больше, чем 5, 8 или даже 10 мм.

В одном варианте осуществления, первый фильтрующий слой содержит, по меньшей мере, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 или даже 5 ммоль четвертичных аммониевых групп на грамм первого фильтрующего слоя.

Второй фильтрующий слой (ii) представляет собой микропористый мембранный субстрат, функционализированный гуанидильными группами.

Микропористая мембрана представляет собой пористый полимерный субстрат (такой как лист или пленка), содержащий микропоры со средним размером пор потока,

который характеризуются стандартным тестовым методом ASTM No. F316-03, «Standard Test Methods for Pore Size Characteristics of Membrane Filters by Bubble Point and Mean Flow Pore Test», менее, чем 5 микрон. В одном варианте осуществления, микропористая мембрана имеет размер пор, соответствующий давлению, при котором поток газа составляет половину от потока при использовании сухой мембраны, по меньшей мере, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 или даже 1 микрон; и не больше, чем 5, 3 или даже 2 микрон. Желаемый размер пор может варьироваться в зависимости от применения. Микропористая мембрана может иметь симметричное или асимметричное (например, градиентное) распределение размера пор в направлении потока жидкости.

Микропористая мембрана может быть образована из любого приемлемого термопластичного полимерного материала. Приемлемые полимерные материалы включают, но не ограничиваются приведенным, полиолефины, поли(изопрены), поли(бутадиены), фторированные полимеры, хлорированные полимеры, полиамиды, полиимиды, полиэферы, поли(эфирные сульфоны), поли(сульфоны), поли(винилацетаты), сложные полиэферы, такие как поли(молочная кислота), сополимеры винилацетата, такие как поли(этилен)-со-поли(виниловый спирт), поли(фосфазены), поли(виниловые сложные эфиры), поли(виниловые простые эфиры), поли(виниловые спирты) и поли(карбонаты).

Приемлемые полиолефины включают, но не ограничиваются приведенным, поли(этилен), поли(пропилен), поли(1-бутен), сополимеры этилена и пропилена, альфа-олефиновые сополимеры (такие как сополимеры этилена или пропилена с 1-бутеном, 1-гексеном, 1-октеном и 1-деценом), поли(этилен-со-1-бутен) и поли(этилен-со-1-бутен-со-1-гексен).

Приемлемые фторированные полимеры включают, но не ограничиваются приведенным, поли(винилфторид), поли(винилиденфторид), сополимеры винилиденфторида (такие как поли(винилиденфторид-со-гексафторпропилен) и сополимеры хлортрифторэтилена (такие как поли(этилен-со-хлортрифторэтилен)).

Приемлемые полиамиды включают, но не ограничиваются приведенным, поли(иминоадиполииминогексаметилен), поли(иминоадиполииминодекаметилен) и поликапролактан. Приемлемые полиимиды включают, но не ограничиваются приведенным, поли(пиромеллитимид).

Приемлемые поли(эфир сульфоны) включают, но не ограничиваются приведенным, поли(дифенилэфир сульфон) и поли(дифенилсульфон-со-дифениленоксидсульфон).

Приемлемые сополимеры винилацетата включают, но не ограничиваются приведенным, поли(этилен-со-винилацетат) и такие сополимеры, в которых, по меньшей мере, некоторые из ацетатных групп являются гидролизованнными с получением различных поли(виниловых спиртов).

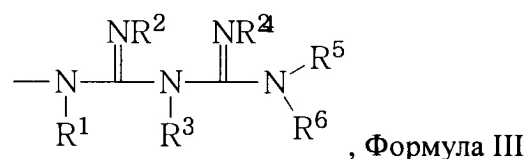
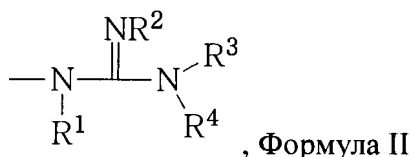
В одном варианте осуществления, микропористая мембрана представляет собой мембрану с фазовым разделением, вызванным растворителем (SIPS). SIPS мембраны часто изготавливают путем получения однородного раствора полимера в первом растворителе(ях), отливки раствора в желаемую форму, например, плоский лист или полое волокно, контактирования раствора отливки с другим вторым растворителем, который не является растворителем для полимера, но является растворителем для первого растворителя (то есть, первый растворитель смешивается со вторым растворителем, но не с полимером). Фазовое разделение индуцируется диффузией второго растворителя в раствор отлитого полимера и диффузией первого растворителя из раствора полимера и во второй растворитель, таким образом, осаждая полимер. Полимер-обедненную фазу удаляют, и полимер сушат для того, чтобы получить

пористую структуру. SIPS также называют фазовой инверсией, или фазовым разделением, индуцированным диффузией, или фазовым разделением, индуцированным не растворителем, такие методы широко известны в данной области техники.

Микропористые SIPS мембраны, кроме того, раскрыты в патентах США №№6,056,529 (Meyering et al.), 6,267,916 (Meyering et al.), 6,413,070 (Meyering et al.), 6,776,940 (Meyering et al.), 3,876,738 (Marinacchio et al.), 3,928,517 (Knight et al.), 4,707,265 (Knight et al.) и 5,458,782 (Hou et al.).

В другом варианте осуществления, микропористая мембрана представляет собой мембрану с фазовым разделением, индуцированным термически (TIPS). TIPS мембраны часто получают путем образования однородного раствора термопластичного материала и второго материала (такого как разбавитель), и необязательно включая зародышеобразующий агент, путем смешивания при повышенных температурах в оборудовании для пластикового компаундирования, например экструдере. Раствор может быть сформирован путем пропускания через диафрагму или экструзионную головку, и при охлаждении термопластичный материал кристаллизуется, и фаза отделяется от второго материала. Кристаллизованный термопластичный материал часто растягивается. Второй материал необязательно удаляют либо до, либо после растяжения, оставляя пористую полимерную структуру. Микропористые TIPS мембраны, кроме того, раскрыты в патентах США №4,529,256 (Shipman); 4,726,989 (Mrozinski); 4,867,881 (Kinzer); 5,120,594 (Mrozinski); 5,260,360 (Mrozinski); и 5,962,544 (Waller, Jr.). Некоторые иллюстративные TIPS мембраны содержат поли(винилиденфторид) (PVDF), полиолефины, таких как поли(этилен) или поли(пропилен), винил-содержащие полимеры или сополимеры, такие как сополимеры этилена-винилового спирта и бутадиен-содержащие полимеры или сополимеры, и акрилат-содержащие полимеры или сополимеры. TIPS мембраны, содержащие PVDF, кроме того, описываются в патенте США №7,338,692 (Smith et al.).

Микропористую мембрану в соответствии с настоящим изобретением обрабатывают таким образом, чтобы она содержала гуанидильную функциональную группу. Такие функциональные группы включают гуанидиновые группы формулы II или бигуанидиновые группы формулы III:

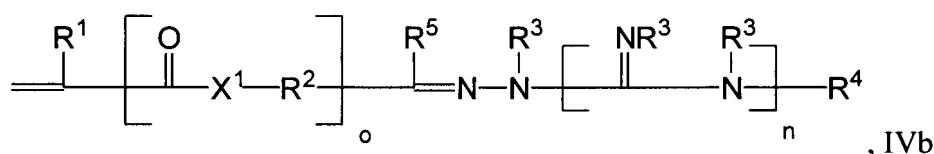
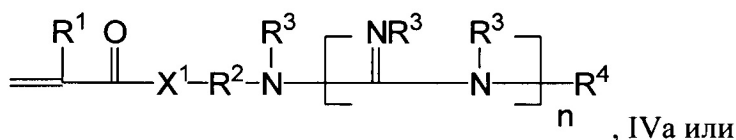


в которых  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$  и  $\text{R}^6$  независимо выбраны из H или углеводородного радикала, предпочтительно  $\text{C}_1\text{--C}_{12}$  алкила.

Гуанидильная функциональная группа ковалентно связывается с пористым мембранным субстратом с использованием методов, известных в данной области техники. Как правило, гуанидильную функциональную группу прививают через связывающую группу непосредственно на пористый мембранный субстрат или на мембранный субстрат, который обработан слоем праймера.

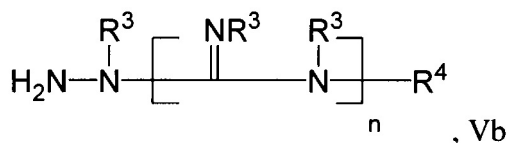
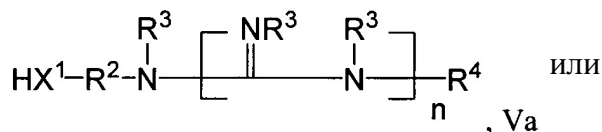
В одном варианте осуществления, пористую мембрану обрабатывают гуанидильными группами, полученными из лиганд-функциональных мономерных звеньев формулы

IVa или b:



в которых  $\text{R}^1$  представляет собой H или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил;  $\text{R}^2$  представляет собой (гетеро) углеводородную группу, необязательно содержащую сложный эфир, амид, уретан или мочевины, предпочтительно двухвалентный алкилен, содержащий от 1 до 20 атомов углерода; каждый  $\text{R}^3$  независимо представляет собой H или углеводородный радикал, предпочтительно  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил;  $\text{R}^4$  представляет собой H,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил или  $\text{-N(R}^3)_2$ ;  $\text{R}^5$  представляет собой H или углеводородный радикал, предпочтительно  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил или арил;  $\text{X}^1$  представляет собой  $\text{-O-}$  или  $\text{-NR}^3\text{-}$ , o означает 0 или 1, и n означает 1 или 2.

Такие гуанидил-содержащие мономеры могут быть получены путем конденсации алкенильного или алкеноильного соединения, как правило (мет)акрилоилгалогенида, (мет)акрилоилизоцианата или алкенилазлактона, с соединением формул Va или Vb:



в которых  $\text{R}^1$  представляет собой H или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил;  $\text{R}^2$  представляет собой (гетеро) углеводородную группу, необязательно содержащую сложный эфир, амид, уретан или мочевины, предпочтительно двухвалентный алкилен, содержащий от 1 до 20 атомов углерода; каждый  $\text{R}^3$  независимо представляет собой H или углеводородный радикал, предпочтительно  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил;  $\text{R}^4$  представляет собой H,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил или  $\text{-N(R}^3)_2$ ; и  $\text{X}^1$  представляет собой  $\text{-O-}$  или  $\text{-NR}^3\text{-}$ . Другие мономеры лиганда могут быть получены путем конденсации содержащего карбонил мономера, такого как акролеин, винилметилкетон, диацетонакриламид или ацетоацетоксиэтилметакрилат, необязательно в присутствии восстанавливающего агента, с соединением формул Va или Vb.

Публикация патентной заявки США №2012/0252091 (Rasmussen et al.) раскрывает обработку пористого субстрата поперечносшитым полиаминополимерным слоем, имеющим этиленненасыщенные полимеризуемые группы, затем прививку к данному слою праймера полимера, полученного из гуанидил-содержащих мономеров, описанных выше. Публикация патентной заявки США №2015/0136698 (Bothof et al.) раскрывает прививку субстрата с гуанидил-содержащими мономерами, описанными выше, в присутствии фотоинициатора типа II. Фотоинициатор типа II представляет собой

инициатор, который при активации актиническим излучением образует свободные радикалы за счет выделения водорода из второго (Н-донора) соединения для того, чтобы образовать фактический иницирующий свободный радикал. Такие фотоинициаторы известны в данной области техники.

5 В одном варианте осуществления, привитый полимерный слой, полученный из гуанидил-содержащего мономера, представляет собой гомополимер гуанидильных мономерных звеньев.

В одном варианте осуществления, привитый полимерный слой, полученный из гуанидил-содержащего мономера, представляет собой сополимер гуанидильных  
10 мономерных звеньев.

В дополнение к гуанидил-содержащему мономеру, в одном варианте осуществления, привитый полимерный слой, полученный из гуанидил-содержащего мономера, может быть получен из других мономеров, таких как многофункциональные (мет)акрилоильные мономеры, включая (мет)акрилатные и (мет)акриламидные мономеры. Примеры  
15 полезных многофункциональных (мет)акрилатов включают, но не ограничиваются приведенным, ди(мет)акрилаты, три(мет)акрилаты и тетра(мет)акрилаты, такие как этиленгликоль-ди(мет)акрилат, 1,6-гександиол-ди(мет)акрилат, поли(этиленгликоль) ди(мет)акрилаты, полибутадиен-ди(мет)акрилат, полиуретан-ди(мет)акрилаты, и пропоксированный глицерин-три(мет)акрилат, метиленбисакриламид,  
20 этиленбисакриламид, гексаметиленбисакриламид, диакрилоилпиперазин и их смеси. В одном варианте осуществления, полимерный слой может быть получен из гидрофильных мономеров, которые содержат, по меньшей мере, одну алкенильную группу, предпочтительно (мет)акрилоильную группу, и гидрофильную группу, включая поли (оксикалкен)овые и ионные группы, для обеспечения гидрофильности субстрата, или  
25 для обеспечения большей селективности субстрата при связывании биоматериалов. Гидрофильные ионные группы могут быть нейтральными и/или иметь положительный заряд. В одном варианте осуществления, сомономер с отрицательным зарядом может быть включен при условии, что он находится в достаточно малых количествах так, что это не мешает взаимодействию со связыванием гуанидильных групп.

30 В одном варианте осуществления, второй фильтрующий слой содержит, по меньшей мере, 0,01, 0,05, 0,1 или даже 0,5 ммоль; и не больше, чем 1, 1,5 или даже 2 ммоль гуанидильных групп на грамм функционализированной микропористой мембраны.

В одном варианте осуществления, толщина второго фильтрующего слоя составляет, по меньшей мере, 5, 10, 20, 25 или даже 50 микрон в толщину; и не больше, чем  
35 800, 500, 200 или даже 100 микрон в толщину.

Как раскрыто в данной заявке, комбинация первого и второго фильтрующих слоев используется в качестве фильтрующей среды. При использовании в фильтрационном применении, в одном варианте осуществления, может быть использован один или несколько слоев первого фильтрующего слоя. Когда используется несколько слоев  
40 первого фильтрующего слоя, каждый слой может иметь одинаковый, или отличающийся эффективный диаметр волокна, основную массу, твердость, количество привитого четвертичного аммония, прочность на растяжение и площадь поверхности. В некоторых вариантах осуществления, каждый последующий слой первого фильтрующего слоя может иметь меньший эффективный диаметр волокна, таким образом, что мелкие  
45 загрязняющие вещества могут удерживаться. Когда используется несколько слоев второго фильтрующего слоя, каждый слой может иметь симметричное или асимметричное (например, градиентное) распределение размера пор по направлению потока жидкости, и слои могут иметь одинаковый, или отличающийся размер пор,

соответствующий давлению, при котором поток газа составляет половину от потока при использовании сухого слоя, пористость, количество привитых гуанидильных групп, прочность на растяжение и площадь поверхности. В некоторых вариантах осуществления, каждый последующий слой второго фильтрующего слоя может иметь

5 меньший эффективный размер пор, таким образом, что мелкие загрязняющие вещества могут быть отфильтрованы.

Количество слоев первого фильтрующего слоя может варьироваться (или быть оптимизированным) исходя из матрицы пробы, и/или типа и/или количества загрязняющих веществ в биологической жидкости. Например, количество слоев первого

10 фильтрующего слоя может варьироваться для того, чтобы оптимизировать концентрацию присутствующих четвертичных аммониевых ионов исходя из количества клеточного дебриса и/или ДНК в пробе. Количество слоев второго фильтрующего слоя может варьироваться для того, чтобы оптимизировать концентрацию присутствующих гуанидильных групп исходя из количества белка клетки-хазяина в пробе.

15 В настоящем изобретении, первый фильтрующий слой размещается выше по потоку от второй фильтрующей мембраны. В одном варианте осуществления, второй фильтрующий слой находится выше по потоку от стадии хроматографического захвата, при этом целевая биомолекула сохраняется на среде и затем последовательно и преднамеренно высвобождается из среды для очистки и/или концентрирования целевой

20 биомолекулы. Такие стадии захвата могут включать хроматографическую колонку, такую как колонка с белком А.

В одном варианте осуществления, первый фильтрующий слой и второй фильтрующий слой содержатся в отдельных корпусах, при этом первый фильтрующий слой находится выше по потоку от второго фильтрующего слоя. Более предпочтительно, первый

25 фильтрующий слой и второй фильтрующий слой содержатся в одном корпусе.

В некоторых вариантах осуществления, микропористая, нефункционализированная эксклюзионная мембрана расположена между первым фильтрующим слоем и вторым фильтрующим слоем. Микропористая мембрана определена выше. Мембрана является нефункционализированной, что означает, что мембрана по существу лишена (то есть,

30 менее, чем 10, 1 или даже 0,1 мкмоль на грамм нефункционализированной эксклюзионной мембраны) ионнообменных функциональных химических групп. Мембрана представляет собой эксклюзионную мембрану, что означает, что она сохраняет частицы главным образом путем механического просеивания. Когда включено, нефункционализированная эксклюзионная мембрана предпочтительно имеет

35 размер пор в условиях образования пузырьков, как измеряют в соответствии со стандартным тестовым методом ASTM No. F316-03, «Standard Test Methods for Pore Size Characteristics of Membrane Filters by Bubble Point and Mean Flow Pore Test», меньше, чем у второго фильтрующего слоя.

В одном варианте осуществления, нефункционализированная эксклюзионная мембрана содержит асимметричную структуру пор. В одном варианте осуществления, нефункционализированная эксклюзионная мембрана содержит градиентную или

40 многозонную морфологию пор, при этом размер пор уменьшается от поверхности выше по потоку по направлению к поверхности ниже по потоку, обеспечивая высокую емкость загрузки частиц. Приемлемые типы микропористой, нефункционализированной

45 эксклюзионной мембраны включают те, которые описаны выше в качестве приемлемых субстратов для второго фильтрующего слоя.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает фильтрующее устройство, содержащее корпус, который имеет верхнюю стенку, нижнюю



стенку, в целом цилиндрическую боковую стенку, проходящую между верхней стенкой и нижней стенкой, фильтрующий элемент, расположенный внутри корпуса, содержащий входной патрубок и выходной патрубок, определяющие путь потока жидкости через фильтрующий элемент. Путь потока жидкости имеет часть выше по потоку, расположенную рядом с входным патрубком, и часть ниже по потоку, расположенную рядом с выходным патрубком, таким образом, что жидкость протекает через первый фильтрующий слой и затем через второй фильтрующий слой к выходному патрубку.

В одном варианте осуществления, первый и второй фильтрующие слои могут быть каждый в отдельности сконфигурированы как плоский или двояковыпуклый диск. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй фильтрующие слои могут быть каждый в отдельности складчатым.

Предпочтительно, первый и второй фильтрующие слои расположены в непосредственной близости, более предпочтительно первый фильтрующий слой и второй фильтрующий слой находятся в одном и том же корпусе фильтра. В одном варианте осуществления, первый и второй фильтрующие слои сконфигурированы в виде плоского или двояковыпуклого диска. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй фильтрующие слои являются складчатыми вместе. В одном варианте осуществления, второй фильтрующий слой обмотан вокруг сердечника, и первый фильтрующий слой обмотан вокруг второго фильтрующего слоя. Альтернативно, второй фильтрующий слой расположен на первом фильтрующем слое с образованием многослойной конструкции, при этом один слой многослойной конструкции обмотан вокруг окружности сердечника и соединяется вместе параллельно к оси сердечника, причем второй фильтрующий слой находится ниже по потоку от первого фильтрующего слоя. Иллюстративные варианты осуществления показаны на следующих фигурах.

ФИГ. 1 изображает иллюстративную фильтрующую среду 10, в соответствии с настоящим изобретением, содержащую первый фильтрующий слой 1 (нетканый материал с четвертичными аммониевыми группами) и второй фильтрующий слой 2 (пористую мембрану с гуанидильными группами). Необязательный, нефункциональный слой (не показан), такой как фильтр размера частиц, может быть расположен между первым фильтрующим слоем и вторым фильтрующим слоем. Как показано, фильтрующая среда 10 содержит множество складок 4. В некоторых вариантах осуществления, складчатая фильтрующая среда 10 может быть включена в фильтрующее устройство. Примеры конфигураций складывания и фильтрующих устройств, содержащих складчатую среду, могут быть найдены, например, в патенте США №6,521,011 (Sunder et al).

ФИГ. 2 изображает внутренний вид в поперечном сечении иллюстративного фильтрующего устройства 200 в соответствии с настоящим изобретением, содержащего упорядоченный фильтрующий материал в форме двояковыпуклой фильтрующей ячейки. Двояковыпуклая фильтрующая ячейка содержит два дискообразных участка фильтрующей среды, идентифицированные как упорядоченный фильтрующий материал 20А и упорядоченный фильтрующий материал 20В, между которыми находится внутренний объем 25. Упорядоченный фильтрующий материал простирается от внешнего уплотнения 27 до внутреннего уплотнения 24 в центральном сердечнике 26. Вместе, упорядоченный фильтрующий материал 20А и упорядоченный фильтрующий материал 20В обозначаются как фильтрующий пакет. В некоторых вариантах осуществления, фильтрующий пакет может быть карманоподобным расширением фильтрующей среды, например, сложенным на себя, не нуждающимся во внешнем уплотнении. Когда поток жидкости проходит снаружи фильтрующего устройства 200

до внутренней части 25, внешняя поверхность упорядоченного фильтрующего материала 20А и 20В (обозначенная как 201 на ФИГ. 2) представляет собой загрязненную сторону или сторону выше по потоку упорядоченного фильтрующего материала 20А и 20В, и внутренняя поверхность упорядоченного фильтрующего материала 20А и 20В

5 (обозначенная как 202 на ФИГ. 2) представляет собой фильтрующую сторону или сторону ниже по потоку упорядоченного фильтрующего материала. В таких условиях потока жидкости, упорядоченный фильтрующий материал 20А содержит первый фильтрующий слой 21А и второй фильтрующий слой 22А, тогда как упорядоченный фильтрующий материал 20В содержит первый фильтрующий слой 21В и второй  
10 фильтрующий слой 22В. Необязательный, нефункциональный слой (не показан), такой как фильтр размера частиц, может быть расположен между первым фильтрующим слоем и вторым фильтрующим слоем.

Центральный сердечник 26 имеет множество радиальных проходов 28, которые обеспечивают связь по текучей среде, в радиальном способе, между внутренней частью  
15 25 и устройством ступицы 23. Разделяющий элемент 29, который, например, состоит из множества ребер, простирается от устройства ступицы 23 во внутреннюю часть 25 между упорядоченными фильтрующими материалами 20А и 20В. Разделяющий элемент 29 представляет собой нефильтрующий элемент, который облегчает поток жидкости из внутренней части 25 через радиальные проходы 28 к устройству ступицы 23. Кроме  
20 того, разделяющий элемент 29 подавляет повреждение упорядоченного фильтрующего материала 20А и 20В во внутренней части 25, например, из-за давления упорядоченного фильтрующего материала 20А и 20В от жидкости, фильтруемой двояковыпуклой фильтрующей ячейкой 200. Как изображено на ФИГ. 2, разделяющий элемент 29 имеет внешний диаметр, меньший, чем внешний диаметр упорядоченных фильтрующих  
25 материалов 20А и 20В. В некоторых вариантах осуществления, разделяющий элемент 29 может иметь внешний диаметр, равный или немного больший, чем внешний диаметр упорядоченных фильтрующих материалов 20А и 20В, таким образом, что разделяющий элемент 29 инкапсулируется в пределах внешнего уплотнения 27.

Хотя Фиг. 2 описывается в операции, в которой поток жидкости проходит снаружи двояковыпуклой ячейки во внутреннюю часть, двояковыпуклая ячейка также может  
30 быть выполнена в обратном направлении, причем поток жидкости проходит из внутренней части и проходит наружу. Когда поток жидкости проходит в вышеописанном направлении, поверхность 202 будет представлять собой загрязненную сторону или сторону выше по потоку упорядоченного фильтрующего материала, и поверхность  
35 201 будет представлять собой фильтрующую сторону или сторону ниже по потоку упорядоченного фильтрующего материала. В таких условиях потока жидкости, первый фильтрующий слой будет расположен во внутренней части двояковыпуклой ячейки, а второй фильтрующий слой будет расположен ниже по потоку от первого фильтрующего слоя.

40 Примеры двояковыпуклых фильтрующих ячеек и способы изготовления двояковыпуклых фильтрующих ячеек могут быть найдены, например, в патентах США №№6,464,084 (Pulek); 6,939,466 (Pulek); 7,178,676 (Pulek et al.); и 6,712,966 (Pulek et al); и в публикации патентной заявки США №2011/0259812 (Marks et al). Двояковыпуклые фильтрующие ячейки могут быть использованы, например, в сочетании с системами  
45 фильтрации, описанными в публикации патентной заявки США №2011/0297604 (Bryan et al).

ФИГ. 3 представляет собой иллюстративное фильтрующее устройство 300, содержащее фильтрующую капсулу 33. Упорядоченный фильтрующий материал 30

инкапсулирован в фильтрующую капсулу 33, которая содержит входной патрубок для жидкости 35 и выходной патрубок для жидкости 36. Вентиляционный клапан 37 используется для вытеснения воздуха из фильтрующего устройства, в то время как спускной клапан 38 используется для слива с фильтрующего устройства после использования. Как видно на разрезе ФИГ. 3, фильтрующее устройство содержит перфорированный внутренний сердечник 34, который проходит соосно через фильтрующую капсулу 33, соединяющую по текучей среде упорядоченный фильтрующий материал 30 с выходным патрубком для жидкости 36. Упорядоченный фильтрующий материал 30 показан простирающимся от фильтрующей капсулы 33, чтобы показать элементы фильтрующего устройства, однако в использовании, упорядоченный фильтрующий материал расположен между перфорированным внутренним сердечником 34 и перфорированным внешним контуром 39, который можно видеть на ФИГ. 3 и 4. Входной патрубок для жидкости 35 соединен по текучей среде с перфорированным внешним контуром 39. При работе, жидкость входит во входной патрубок для жидкости 35, затем последовательно проходит через перфорированный внешний контур 39, упорядоченный фильтрующий материал 30, перфорированный внутренний сердечник 34, и затем выходит из выходного патрубка для жидкости 36. Перфорированный внешний контур 39 может представлять собой сетку, перфорированную решетку и т.д., используемые для поддержки упорядоченного фильтрующего материала, особенно в операциях обратной промывки. В зависимости от конструкции упорядоченного фильтрующего материала, фильтрующее устройство может не содержать перфорированный внешний контур.

Два различных цилиндра для среды для использования в фильтрующей капсуле 33 показаны на ФИГ. 4 и 5.

ФИГ. 4 изображает вид в поперечном сечении одного варианта осуществления фильтрующего устройства, в котором капсула среды содержит упорядоченный фильтрующий материал, содержащий множество складок 44. Упорядоченный фильтрующий материал 40, расположенный между перфорированным внешним контуром 39 и перфорированным внутренним сердечником 34, содержит первый фильтрующий слой 41 и второй фильтрующий слой 42. Второй фильтрующий слой 42 расположен ниже по потоку от первого фильтрующего слоя 41, где поток жидкости проходит от перфорированного внешнего контура 39, проходит через упорядоченный фильтрующий материал 40 в перфорированный внутренний сердечник 34. Пример модуля фильтров, содержащего цилиндр для среды, содержащий множество складок, может быть найден, например, в патенте США №6,315,130 (Olsen).

ФИГ. 5 изображает вид в поперечном сечении альтернативного варианта осуществления фильтрующего устройства, в котором капсула среды содержит упорядоченный фильтрующий материал, спирально намотанный вокруг внутреннего перфорированного сердечника 34. Упорядоченный фильтрующий материал 50, расположенный между перфорированным внешним контуром 39 и перфорированным внутренним сердечником 34, содержит второй фильтрующий слой 52, спирально намотанный вокруг внутреннего перфорированного сердечника 34, и первый фильтрующий слой 51, спирально намотанный вокруг второго фильтрующего слоя 52. Как показано на чертеже, жидкость течет от перфорированного внешнего контура 39, через упорядоченный фильтрующий материал 50, затем в перфорированный внутренний сердечник 34. В некоторых вариантах осуществления, дренажный слой может быть дополнительно обеспечен для облегчения потока жидкости между расположенными рядом слоями упорядоченного фильтрующего материала.

В одном варианте осуществления, первый и второй фильтрующие слои инкапсулированы пористым полотном для того, чтобы обеспечить поддержку и содействие в обработке. В фильтрационных приложениях, первый и второй фильтрующие слои могут быть расположены или вертикально, или горизонтально.

Упорядоченная фильтрующая среда в соответствии с настоящим изобретением может быть использована при очистке и/или выделении целевых биоматериалов из биологической жидкости. В одном варианте осуществления, упорядоченная фильтрующая среда в соответствии с настоящим изобретением может быть использована при очистке и/или выделении положительно заряженных белков, более предпочтительно моноклональных антител из собранной жидкости из биореактора или ферментера. Как правило, собранная жидкость содержит, в дополнение к моноклональным антителам, цельные клетки и нерастворимый клеточный дебрис и растворимые примеси, включая белковые примеси, такие как белки клеток-хозяев, ДНК и хроматин в культуральной среде.

Моноклональные антитела являются одними из наиболее используемых терапевтических белков в фармацевтической промышленности. Преимущества в развитии клеточной линии и оптимизации процессов культивирования клеток позволили повысить титры антител, что увеличивает плотность клеточной культуры и удлиняет продолжительность культивирования. Это переводит на более высокие уровни примеси, связанные с процессом, такие как белки клеток-хозяев и ДНК, липиды, коллоиды и клеточный дебрис. Данные более высокие уровни примесей представляют проблемы для восстановления, очистки и/или концентрирования моноклонального антитела. Как правило, обработка после сбора включает первичное восстановление моноклонального антитела, с последующим захватом моноклонального антитела на хроматографической колонке (например, с белком А или катионообменная хроматография), с последующим элюированием (и концентрированием) захваченного моноклонального антитела с хроматографической колонки, и заключительной очисткой элюата.

Аффинная хроматография с белком А является предпочтительной для захвата из-за высокоспецифического взаимодействия белка А с моноклональными антителами.

Поскольку колонки с белком А являются относительно дорогими, важно уменьшить количество примесей в собранном бульоне перед тем, как подвергать действию колонку с белком А для того, чтобы максимально увеличить срок ее службы. Кроме того, некоторые примеси могут удерживаться колонкой с белком А и элюироваться элюатом моноклонального антитела, что в результате приводит к дополнительной и/или более агрессивной заключительной очистке элюата.

Клеточный дебрис обычно относится к нерастворимым компонентам лизированных (разрушенных) клеток, включая липиды клеточной стенки, органеллы (например, митохондрии, лизосомы, везикулы и тому подобное) и белковые агрегаты. Как правило, клеточный дебрис является более крупным, преимущественно отрицательно заряженным материалом, который может засорять фильтры. Мутность является одним из способов измерения концентрации клеточного дебриса в жидкости, причем, чем выше значение мутности, тем больше присутствует клеточного дебриса. В одном варианте осуществления, собранная жидкость или клеточная культуральная жидкость имеет мутность, по меньшей мере, 40, 60, 80 или даже 100 NTU (нефелометрическая единица мутности) и не больше, чем 500, 400, 200 или даже 150 NTU. После прохождения через фильтрующую среду в соответствии с настоящим изобретением, мутность фильтрата часто составляет менее, чем 15, 10, 5 или даже 2 NTU.

Нежелательные белки, такие как белковые примеси и белки клеток-хозяев, также

обычно присутствуют в собранной жидкости. В одном варианте осуществления, собранная жидкость или клеточная культуральная жидкость имеет концентрацию белка клетки-хозяина, по меньшей мере, 50000; 100000 или даже 200000 нг/мл и не больше, чем 2000000; 1000000; или даже 500000 нг/мл. Данные растворимые белки являются меньшими по своей природе, и необходимым является их отделение от моноклональных антител.

ДНК представляет собой нуклеотидную последовательность, которая является схемой репликации клетки. В одном варианте осуществления, собранная жидкость или клеточная культуральная жидкость имеет концентрацию ДНК, по меньшей мере,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  или даже  $10^9$  пикограмм/мл. После прохождения через упорядоченную фильтрующую среду в соответствии с настоящим изобретением, ДНК фильтрата может быть уменьшена на значение логарифмического уменьшения 3 или больше, во много раз на значение логарифмического уменьшения 4 или больше, даже на значение логарифмического уменьшения  $\log 8$  или больше.

Для выделения и/или очистки целевой биомакромолекулы, такой как моноклональное антитело, каждое из загрязняющих веществ должно быть удалено до достаточных уровней. Часто культуральная среда содержит буферы, электролиты и/или сахара, которые могут влиять на производительность фильтра. В одном варианте осуществления, собранная жидкость или клеточная культуральная жидкость имеет проводимость, по меньшей мере, 10 миллисименс/см (мС/см), или даже 15 мС/см, и самое большее не больше, чем 25 мС/см или даже 35 мС/см. В некоторых вариантах осуществления, в которых упорядоченный фильтрующий материал используется в процессе очистки и/или выделения, входной патрубков для жидкости (то есть, жидкости, подлежащей фильтрованию) может иметь более высокую или меньшую проводимость в зависимости от предыдущих стадий обработки. В одном варианте осуществления, входной патрубков для жидкости имеет проводимость, по меньшей мере, 1 мС/см, или даже 0,5 мС/см, и, по меньшей мере, не больше, чем 40 мС/см или даже 50 мС/см. Иногда, во время традиционного выделения/очистки моноклональных антител, технологический раствор разбавляется для уменьшения ионной концентрации, поскольку высокие концентрации солей могут препятствовать определенным методам, таким как ионный обмен.

В представленной заявке было обнаружено, что когда нетканый субстрат, функционализированный четвертичными аммониевыми группами, расположен выше по потоку от микропористой мембраны, функционализированной лигандами, имеющими гуанидиновые или бигуанидные группы, может быть изготовлено фильтрующее устройство, которое обладает высокой способностью к очистке клеточного дебриса из жидкости, высокой способностью к существенному восстановлению ДНК из жидкости, и высокой степенью восстановления белка клетки-хозяина, при этом также минимизируя количество стадий процесса.

При использовании в очистке моноклональных антител, первый фильтрующий слой может служить для удаления цельных клеток и клеточного дебриса, и растворимых загрязняющих веществ, таких как ДНК и некоторые белки клеток-хозяев. Второй фильтрующий слой содержит гуанидильные группы, которые могут связывать отрицательно заряженные загрязняющие вещества, особенно отрицательно заряженные белки клеток-хозяев, позволяя положительно заряженным веществам, таким как моноклональные антитела (mAb), проходить.

В одном варианте осуществления, упорядоченная фильтрующая среда в соответствии с настоящим изобретением может быть использована для эффективного удаления

клеточного дебриса, ДНК и белка клетки-хозяина, в присутствии высоких концентраций солей, что позволяет очистку и/или выделение целевых биомакромолекул, таких как mAb.

Как будет проиллюстрировано в приведенных ниже примерах, было обнаружено, что использование многослойной конструкции, содержащей первый фильтрующий слой выше по потоку от второго фильтрующего слоя, дает неожиданно лучшую пропускную способность по сравнению с фильтрами, содержащими только четвертичные аммониевые группы или гуанидильные группы. Кроме того, было обнаружено, что комбинация этих двух фильтрующих слоев, в которой первый фильтрующий слой находится выше по потоку от второго фильтрующего слоя, обеспечивает улучшенную пропускную способность, и может продлить срок службы комбинации фильтрующих сред. Улучшенная пропускная способность может быть получена не только из-за улучшенной пропускной способности через фильтрующую среду, но также при удалении одной или нескольких стадий процесса при очистке или выделении биологического материала, и/или более эффективного уменьшения загрязняющих веществ для минимизации воздействия загрязняющих веществ на процессы ниже по потоку, тем самым увеличивая время жизни компонента ниже по потоку. При разворачивании в начале процесса очистки белка, например, во время первоначального осветления собранной клеточной культуральной жидкости, или ее центрифугированного фугата, фильтрующая среда в соответствии с настоящим изобретением может также служить для ограничения времени воздействия целевого белка (например, mAb) на загрязняющие вещества жидкости (например, ферменты протеазы), которые могут ухудшить качество целевого белка.

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения включают следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Упорядоченный фильтрующий материал содержащий:

- (i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, причем анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и
- (ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана содержит множество гуанидильных групп;

при этом первый фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя.

Вариант осуществления 2. Упорядоченный фильтрующий материал по варианту осуществления 1, в котором первый фильтрующий слой содержит, по меньшей мере, 0,1 ммоль четвертичных аммониевых групп на грамм первого фильтрующего слоя.

Вариант осуществления 3. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором второй фильтрующий слой содержит, по меньшей мере, 0,01 ммоль гуанидильных групп на грамм второго фильтрующего слоя.

Вариант осуществления 4. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором анионообменный нетканый субстрат имеет эффективный диаметр волокна от 1 до 6 микрон.

Вариант осуществления 5. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором второй фильтрующий слой имеет размер пор, соответствующий давлению, при котором поток газа составляет половину от потока при использовании сухого слоя, от 0,1 до 5 микрон.

Вариант осуществления 6. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из

предыдущих вариантов осуществления, в котором первый фильтрующий слой содержит полимер, привитый к поверхности нетканого субстрата, при этом полимер содержит взаимополимеризованные мономерные звенья из:

(a) от 80 до 98 мас. % аминоалкил(мет)акрилоильного мономера;

(b) от 2 до 20 мас. % поли(алкиленоксид)ного мономера; и

(c) от 0 до 10 мас. % второго гидрофильного мономера.

Вариант осуществления 7. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из вариантов осуществления 1-6, в котором второй фильтрующий слой содержит полимер, привитый к поверхности нетканого субстрата, при этом полимер содержит

взаимополимеризованные мономерные звенья:

(a) от 10 до 50 мас. % мономера лиганда, содержащего четвертичный аммоний;

(b) от 10 до 80 мас. % амидного мономера;

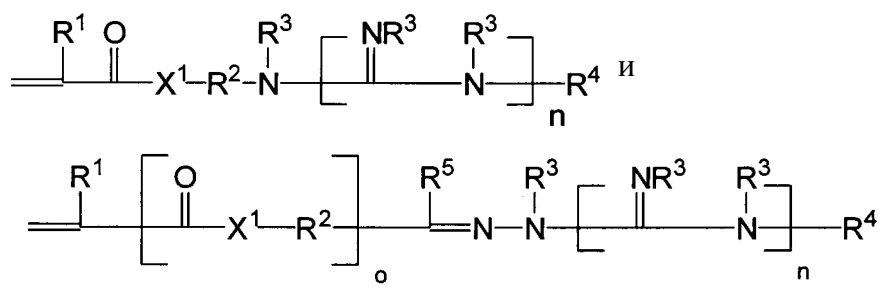
(c) от 10 до 40 мас. % оксимономера; и

(d) от 0 до 30 мас. % поли(алкиленоксид)ного мономера.

Вариант осуществления 8. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором функционализированная микропористая мембрана содержит TIPS мембрану.

Вариант осуществления 9. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из вариантов осуществления 1-8, в котором функционализированная микропористая мембрана содержит SIPS мембрану.

Вариант осуществления 10. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором функционализированная микропористая мембрана содержит свободнорадикально привитый (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной функциональной группой, при этом (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной функциональной группой содержит, по меньшей мере, один из:



в которых

$\text{R}^1$  представляет собой H или  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил;

$\text{R}^2$  представляет собой (гетеро)углеводородную группу;

каждый  $\text{R}^3$  независимо представляет собой H или углеводородный радикал;

$\text{R}^4$  представляет собой H,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{12}$  алкил или  $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ ;

$\text{R}^5$  представляет собой H или углеводородный радикал;

$\text{X}^1$  представляет собой -O- или  $-\text{NR}^3$ -;

o означает 0 или 1, и

n означает 1 или 2.

Вариант осуществления 11. Упорядоченный фильтрующий материал по варианту осуществления 10, в котором свободнорадикально привитый (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной функциональной группой привит к слою праймера,

расположенному на микропористой мембране, при этом слой праймера содержит поперечносшитый полиаминный полимер, имеющий этиленненасыщенные полимеризуемые группы, причем поперечносшитый полиаминный полимер, имеющий этиленненасыщенные полимеризуемые группы, представляет собой продукт реакции:

- 5 (а) полиаминного полимера; (b) полифункционального поперечносшивающего агента для полиаминного полимера; и (с) мономера, имеющего реакционноспособную в отношении амина функциональную группу и этиленненасыщенную полимеризуемую группу.

Вариант осуществления 12. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из вариантов осуществления 10-11, в котором свободнорадикально привитый (мет) акрилоильный мономер с гуанидильной функциональной группой привит на микропористую мембрану в присутствии фотоинициатора типа II.

Вариант осуществления 13. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором первый фильтрующий слой

15 контактирует со вторым фильтрующим слоем.

Вариант осуществления 14. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий многослойное изделие, при этом многослойное изделие содержит первый фильтрующий слой и второй фильтрующий слой.

20 Вариант осуществления 15. Упорядоченный фильтрующий материал по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий нефункционализированный фильтрующий слой, расположенный между первым фильтрующим слоем и вторым фильтрующим слоем.

Вариант осуществления 16. Упорядоченный фильтрующий материал по варианту осуществления 15, в котором нефункционализированный фильтрующий слой

представляет собой микропористую, нефункционализированную эксклюзионную мембрану.

Вариант осуществления 17. Упорядоченный фильтрующий материал по варианту осуществления 16, в котором микропористая, нефункционализированная эксклюзионная

30 мембрана имеет асимметричную пористую структуру.

Вариант осуществления 18. Упорядоченный фильтрующий материал по варианту осуществления 16, в котором микропористая, нефункционализированная эксклюзионная мембрана имеет размер пор, соответствующий давлению, при котором поток газа составляет половину от потока при использовании сухой мембраны, менее, чем второй

35 фильтрующий слой.

Вариант осуществления 19. Фильтрующее устройство, содержащее входной патрубок для жидкости;

выходной патрубок для жидкости; и

40 фильтрующую среду, соединяющую по текучей среде входной патрубок для жидкости и выходной патрубок для жидкости, при этом фильтрующая среда содержит (i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, причем анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и (ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана

45 содержит множество гуанидильных групп; и при этом первый фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя, фильтрующей среды.

Вариант осуществления 20. Фильтрующее устройство по варианту осуществления 19, в котором фильтрующая среда сформирована в цилиндре для среды, содержащем



множество складок.

Вариант осуществления 21. Фильтрующее устройство по варианту осуществления 19, дополнительно содержащее сердечник, при этом второй фильтрующий слой намотан вокруг сердечника, а первый фильтрующий слой намотан вокруг второго фильтрующего

5 слоя.

Вариант осуществления 22. Фильтрующее устройство по варианту осуществления 19, при этом фильтрующее устройство дополнительно содержит

разделяющий элемент;  
кромочное уплотнение;

10

причем разделяющий элемент содержит  
центральный сердечник, связанный по текучей среде с входным патрубком для  
жидкости;

первую сторону; и  
вторую сторону; и

15

при этом фильтрующая среда дополнительно содержит  
первый диск среды, расположенный на первой стороне разделяющего элемента и  
имеющий внешнюю кольцеобразную кромку и внутреннюю кольцеобразную кромку;  
и

20

второй диск среды, расположенный на второй стороне разделяющего элемента и  
имеющий внешнюю кольцеобразную кромку и внутреннюю кольцеобразную кромку;  
и

причем внешние кольцеобразные кромки первого и второго дисков среды соединены  
с помощью кромочного уплотнения, и внутренние кольцеобразные кромки первого и  
второго дисков среды соединены с центральным сердечником, и при этом сторона  
25 выше по потоку первого и второго диска среды содержит первый фильтрующий слой.

Вариант осуществления 23. Способ фильтрации биологической жидкости, при этом способ включает стадии, на которых:

(а) обеспечивают биологическую жидкость, причем биологическая жидкость содержит  
целевую биомолекулу и загрязняющие вещества, и

30

(б) вводят в контакт биологическую жидкость с упорядоченным фильтрующим  
материалом по любому из предыдущих вариантов осуществления с получением  
фильтрата.

Вариант осуществления 24. Способ по варианту осуществления 23, в котором  
биологическая жидкость имеет проводимость, по меньшей мере, 10 мС/см.

35

Вариант осуществления 25. Способ по любому из вариантов осуществления 23-24,  
в котором биологическая жидкость имеет мутность, по меньшей мере, 40 NTU.

Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 23-25,  
в котором биологическая жидкость имеет концентрацию белка клетки-хозяина от 100000  
нг/мл до 2000000 нг/мл.

40

Вариант осуществления 27. Способ по любому из вариантов осуществления 23-26,  
в котором биологическая жидкость имеет концентрацию ДНК, по меньшей мере,  $10^5$   
пг/мл.

Вариант осуществления 28. Способ по любому из вариантов осуществления 23-27,  
в котором фильтрат имеет мутность менее, чем 15 NTU.

45

Вариант осуществления 29. Способ по любому из вариантов осуществления 23-28,  
в котором биологическая жидкость имеет первую концентрацию белка клетки-хозяина,  
и фильтрат имеет вторую концентрацию белка клетки-хозяина, при этом вторая  
концентрация белка клетки-хозяина является, по меньшей мере, на 50% меньшей, чем

первая концентрация белка клетки-хозяина.

Вариант осуществления 30. Способ по любому из вариантов осуществления 23-29, в котором биологическая жидкость имеет первую концентрацию ДНК, и фильтрат имеет вторую концентрацию ДНК, при этом вторая концентрация ДНК является, по меньшей мере, на 3 log меньшей, чем первая концентрация ДНК.

Вариант осуществления 31. Способ по любому из вариантов осуществления 23-30, дополнительно включающий стадию, на которой вводят в контакт фильтрат с хроматографической колонкой, функционализированной белком А.

Вариант осуществления 32. Способ по любому из вариантов осуществления 23-31, в котором целевая биомолекула представляет собой белок.

Вариант осуществления 33. Способ по варианту осуществления 32, в котором целевая биомолекула представляет собой положительно заряженный белок.

Вариант осуществления 34. Способ по варианту осуществления 33, в котором положительно заряженный белок представляет собой моноклональное антитело.

## ПРИМЕРЫ

Если не указано иное, все части, проценты, соотношения и т.д. в примерах и в остальной части описания приведены по массе, и все реагенты, используемые в примерах, были получены или являются доступными от общих поставщиков химических веществ, таких как, например, Sigma-Aldrich Company, Saint Louis, Missouri, или могут быть синтезированы согласно общепринятым способам.

Данные сокращения используются в следующих примерах: см = сантиметр; г = граммы; мл = миллилитр; мин = минуты; мкл = микролитры; ммоль = миллимоль; мас. = масса; пг = пиктограммы; кПа = килопаскаль; кВ = киловольт; кГр = килогрей; и °C = градусы Цельсия.

## Материалы

Метакриламидопропилтриметиламмония хлорид (МАРТАС, 50% мас./мас. раствор в воде), метиленбисакриламид (МБА), бензофенон и метанол были получены от Sigma-Aldrich.

4-(3-сульфопропилокси)бензофенона натриевая соль (S-BP) может быть получена, как описано в японском патенте №47040913, Teijin Ltd.

N-(3-диметиламинопропил)метакриламид (DМАРМА) и N-винилпирролидон (NVP) были получены от TCI Americas, Inc., Portland, Oregon.

Изоцианатоэтилметакрилат агматин сульфат натрия (IEM-Ag) может быть получен, как описано в публикации патентной заявки США №2011-0033633.

Глицидилметакрилат (GMA) был получен от Dow Chemical Corporation, Deer Park, Texas.

Нейлоновые мембранные субстраты (№080ZN, армированная нейлон-6.6 мембрана, номинальный размер пор - 0,8 микрометра) были получены от 3M Purification, Inc., Meriden, CT.

Субстраты из полипропиленового выдувного микроволокна (PP BMF) получали с использованием способа выдувания из расплава и они имели эффективный диаметр волокна 4,3 микрометра, основную массу 90 грамм на квадратный метр и твердость 10%.

## Измерения

Массовый процент привитого полимера и измерение плотности прививки для функциональных нетканых материалов

Для функциональных нетканых материалов, описанных ниже, массовый процент привитого функционального полимера измеряли следующим образом. По меньшей

мере, пять дисков диаметром 47 мм вырезали из пробы высушенного функционального нетканого материала. Диски сушили до постоянной массы по рычажным весам со шкалой, проградуированной в процентах влажности (Mettler-Toledo MJ33, доступным от Metier-Toledo, LLC, Columbus, Ohio) при 90°C, и постоянную сухую массу регистрировали как  $m_f$ . Массу равной площади субстрата PP BMF регистрировали как  $m_i$ . Затем массовый процент привитого полимера рассчитывали как

$$\text{Мас. \% привитого полимера} = \frac{m_f - m_i}{m_f} \times 100\%$$

Массовый процент привитого функционального полимера затем использовали для оценки количества миллимолей мономера, привитого к нетканому субстрату, путем умножения массового процента функционального полимера на общую массу пробы известной площади, умножая результат на массовый процент функционального мономера лиганда в растворе покрытия по отношению к общему мономеру, и разделив на молекулярную массу функционального мономера лиганда. Плотность прививки затем нормализовали путем деления на исходную массу нетканого субстрата и выражали в виде миллимолей привитого мономера на грамм субстрата (ммоль/г).

Измерение плотности прививки для функциональных мембран

Нейлоновые мембранные субстраты уравнивали в течение минимум 18 часов в камере с низкой влажностью (Sanpia Dry Keeper, Sanplatec Corporation, доступная от VWR International) при относительной влажности (отн. влаж.) 20-25 процентов (%), перед тем как прививать. Субстраты удаляли из камеры с низкой влажностью, сразу взвешивали и затем подвергали реакции свободнорадикальной прививки, как описано ниже, для ряда мономеров, содержащих лигандную функциональную группу. После процесса промывания и сушки субстраты снова уравнивали в камере с низкой влажностью в течение минимум 18 часов, удаляли из камеры и сразу же взвешивали заново для того, чтобы получить измерение прироста массы во время реакции прививки. Прирост массы затем использовали для оценки количества миллимолей мономера, привитого к мембранному субстрату путем деления прироста массы на молекулярную массу мономера. Плотность прививки затем нормализовали путем деления на исходную массу мембранного субстрата и выражали в виде миллимолей привитого мономера на грамм субстрата (ммоль/г).

рН и проводимость

Значения рН и проводимости проверочных жидкостей были охарактеризованы с использованием Beckman Coulter pH 570 рН и электрохимического измерительного прибора, доступного от Beckman Coulter, Inc., Brea, California.

Мутность

В экспериментах по фильтрации мутность проверочных жидкостей и обработанных жидкостей измеряли с использованием турбидиметра (доступный под торговым названием «ORION AQUAFAST AQ4500 TURBIDIMETER») от Thermofisher Scientific). Турбидиметр обеспечивает значения мутности в стандартных нефелометрических единицах мутности (NTU).

Количественная оценка концентрации белка клетки-хозяина (HCP) с помощью ELISA

Количественную оценку CHO HCP проводили с использованием иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA), специфичного для CHO HCP (набор CHO HCP ELISA, 3G, полученный от Cygnus Technologies, Southport, NC). Перед анализом пробы разбавляли буфером (буфер для разбавления пробы, полученный от Cygnus Technologies) для достижения концентрации в пределах диапазона калибровочной кривой.

Сообщали об уменьшении % НСР, который представляет собой концентрацию НСР, определяемую по разнице концентрации НСР в проверочной жидкости (фугат CHO) за вычетом концентрации НСР в фильтрате, деленной на концентрацию НСР в проверочной жидкости (фугат CHO) и сообщали в виде процента.

#### 5 Натрия додецилсульфат-полиакриламидный гель-электрофорез (SDS-PAGE)

Аликвоты для ненативного электрофореза растворяли в предварительно смешанном буфере для пробы белка (буфер для пробы 2X Laemmli, полученный от Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA), содержащем β-меркаптоэтанол. Пробы прогнали при 200 вольтах в течение 30 минут в заранее приготовленном 12% трис-глициновом геле (доступном  
10 под торговым названием «CRITERION TGX PRECAST GEL» от Biorad Laboratories Inc.) для отделения различных белков в аликвоте. После завершения электрофореза гель окрашивали с использованием набора для окрашивания серебром от ThermoFisher Scientific.

#### Количественная оценка концентрации ДНК

15 Количественную оценку CHO ДНК проводили с использованием количественной полимеразной цепной реакции (количественной ПЦР), используя анализ, специально предназначенный для CHO ДНК (доступный под торговым названием «RESDNASEQ QUANTITATIVE CHO DNA KIT» от ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Перед  
20 количественной ПЦР, ДНК выделяли из проб с использованием набора для подготовки (доступный под торговым названием «PREPSEQ RESIDUAL DNA SAMPLE PREPARATION KIT» от ThermoFisher Scientific) для предотвращения помех от компонентов клеточной культуральной среды.

Уменьшение ДНК сообщали как LRV (значение логарифмического уменьшения), где концентрация ДНК, определенная в фильтрате, была разделена на концентрацию  
25 ДНК в проверочной жидкости (фугат CHO) и затем был взят десятичный логарифм от полученного в результате отношения.

#### Получение материалов

##### Мембрана 1: Четвертичная аммониевая функциональная мембрана

Четвертичную аммониевую функциональную («Q-функциональную») мембрану 1  
30 получали следующим образом. Раствор для покрытия: Раствор для покрытия получали путем смешивания МАРТАС (3,532 грамма 50% мас./мас. раствора в воде) и S-BP (250 микролитров 0,05 г/мл раствора в деионизированной воде), затем разбавляли до общего количества 20 грамм деионизированной водой.

Получение: Нейлоновый мембранный субстрат 18 см × 23 см помещали на лист из  
35 пленки на основе сложных полиэфиров, и раствор для покрытия наносили пипеткой на верхнюю поверхность субстрата. Раствору для покрытия давали впитаться в субстрат в течение приблизительно 1 минуты, и затем второй лист из пленки на основе сложных полиэфиров помещали поверх субстрата. 2,28 кг цилиндрической массы прокатывали  
40 поверх полученного в результате трехслойного сэндвича для того, чтобы выжать избыточный раствор для покрытия. Иницированную ультрафиолетом (УФ) прививку проводили путем облучения сэндвича с использованием УФ-стенда (Classic Manufacturing, Inc., Oakdale, MN), оснащенного 18 шариками [Sylvania RG2 40W F40/350BL/ECO, 10 выше и 8 ниже субстрата, 1,17 метра (46 дюймов) в длину, на расстоянии 5,1 см (2 дюйма) от центра], со временем облучения 15 минут. Листы на основе сложных полиэфиров  
45 удаляли, и полученный в результате функционализированный субстрат помещали в полиэтиленовую бутылку на 1000 мл. Бутылку заполняли 0,9 процентным (%) солевым раствором, герметично закрывали и встряхивали в течение 30 минут для того, чтобы вымыть какой-либо остаточный мономер или непривитый полимер. Солевой раствор

выливали, и функционализированный субстрат промывали в течение еще 30 минут свежим солевым раствором и затем промывали в течение 30 минут деионизированной водой (2 раза) и давали высохнуть.

Плотность прививки функциональной мембраны 1, как было определено, составляла 0,53 ммоль/г.

Мембрана 2А: Гуанидильная функциональная мембрана

Гуанидильную функциональную («G-функциональную») мембрану 2 получали следующим образом. Раствор для покрытия: Раствор для покрытия получали путем смешивания IEM-Ag (3,5 грамма), MBA (0,07 грамма) и бензофенона (0,125 грамма), затем разбавляли до общего количества 25 грамм метанолом. Смесь перемешивали в течение 30 минут, затем фильтровали. Нейлоновый мембранный субстрат затем покрывали раствором для покрытия, облучали, промывали и сушили, как описано выше для получения мембраны 1. Плотность прививки функциональной мембраны 2А, как было определено, составляла 0,51 ммоль/г.

Мембрана 2В: Гуанидильная функциональная мембрана

Гуанидильную функциональную («G-функциональную») мембрану 2В получали в соответствии с процедурой, описанной в заявке на патент США №2012/0252091, пример 42.

Мембрана 3: Третичноаминная функциональная мембрана

Третичноаминную функциональную («Т-функциональную») мембрану 3 получали следующим образом. Раствор для покрытия: Раствор для покрытия получали путем смешивания DMAPMA (0,851 грамма) и S-BP (250 мкл 0,05 г/мл раствора в деионизированной воде), затем разбавляли до общего количества 20 грамм деионизированной водой. Нейлоновый мембранный субстрат затем покрывали раствором для покрытия, облучали, промывали и сушили, как описано выше для получения мембраны 1. Плотность прививки функциональной мембраны 3, как было определено, составляла 0,41 ммоль/г.

Нетканый материал 1: Четвертичноаммониевый функциональный нетканый материал

Четвертичноаммониевый функциональный («Q-функциональный») нетканый материал 1 получали в соответствии с процедурой, описанной в U.S. 2015/0099413. Раствор для покрытия: Раствор для покрытия получали путем смешивания водного раствора МАРТАС (50% мас./мас. раствора в воде), NVP, GMA и деионизированной воды с получением водного раствора, содержащего 9 мас. % мономера МАРТАС, 11 мас. % NVP, 6 мас. % GMA и 74 мас. % воды. Раствор для покрытия продували воздухом, многократно открывая его крышку, закрывая крышку и встряхивая раствор в атмосфере азота внутри перчаточного бокса.

Получение: Лист PP BMF субстрата 30 см × 43 см продували воздухом внутри перчаточного бокса и вставляли в повторно герметизируемый пластиковый пакет, который герметично скрепляли. Герметично скрепленный пакет затем удаляли из перчаточного бокса и облучали до уровня дозы 40 кГр путем пропускания его через электронный пучок Energy Sciences, Inc. 'Electrocurtain' CB-300 при обработке за один проход со скоростью полотна приблизительно 5,5 метра/мин (18-19 футов/мин) и ускоряющим напряжением 300 кВ. Герметично скрепленный пакет затем возвращали в атмосферу азота внутри перчаточного бокса. Пакет открывали и равномерно насыщали 110 граммами продутого азотом раствора для покрытия, и пакет повторно герметично скрепляли после вытеснения большей части азота. Во время данных стадий уровень кислорода в перчаточном боксе обычно поддерживался ниже 40 долей на миллион (м.д.). Пробу выдерживали плашмя в пакете и насыщали раствором для

покрытия в течение приблизительно 16 часов. Функционализированный нетканый материал затем удаляли, промывали и сушили, как описано в U.S. 2015/0099413.

Массовый процент привитого функционального полимера, как было определено, составлял 62 процента (%), что соответствует плотности прививки МАРТАС 0,25 ммоль/г функционализированного нетканого материала или 0,66 ммоль/г нетканого субстрата.

Нетканый материал 2: Гуанидильный функциональный нетканый материал

Гуанидильный функциональный («G-функциональный») нетканый материал 2 получали следующим образом. Раствор для покрытия: Получали раствор для покрытия, содержащий 9 мас. % IEM-Ag, 11 мас. % NVP, 6 мас. % GMA и 74 мас. % деионизированной воды.

Получение: PP BMF субстрат затем инертно покрывали, облучали, промывали и сушили, как описано выше для получения нетканого материала 1. Массовый процент привитого функционального полимера, как было определено, составлял 69 процентов (%), что соответствует плотности прививки IEM-Ag 0,16 ммоль/г функционализированного нетканого материала или 0,52 ммоль/г нетканого субстрата.

Нетканый материал 3: Третичноаминный функциональный нетканый материал

Третичноаминный («Т-функциональный») нетканый материал 3 получали следующим образом. Раствор для покрытия: Получали раствор для покрытия, содержащий 9 мас. % DMAPMA, 11 мас. % NVP, 6 мас. % GMA и 74 мас. % деионизированной воды.

Получение: PP BMF субстрат затем инертно покрывали, облучали, промывали и сушили, как описано выше для получения нетканого материала 1. Массовый процент привитого функционального полимера, как было определено, составлял 61 процент (%), что соответствует плотности прививки DMAPMA 0,32 ммоль/г функционализированного нетканого материала или 0,84 ммоль/г нетканого субстрата.

Проверочные жидкости

Культивирование клетки яичника китайского хомячка проводили с использованием стандартных методов клеточного культивирования. Собранную жидкость собирали, центрифугировали и затем тестировали на проводимость или pH, мутность и концентрацию НСР с использованием ELISA. Различные культуры использовали в экспериментах, раскрытых в данной заявке, и профили для каждой из них описываются ниже.

Фугат CHO 1: CHO клеточную культуру собирали при плотности клеток

приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток/мл и жизнеспособности приблизительно 20%. Собранную жидкость центрифугировали (центрифуга Jouan GR4.22, доступная от Thermofisher Scientific) в течение приблизительно 4 минут при 4000 оборотах в минуту, получая фугат жидкости с мутностью 85,2 NTU, концентрацией НСР 169596 нанограмм на миллилитр (нг/мл) и проводимостью 11,8 мС/см.

Фугат CHO 2: CHO клеточную культуру собирали при плотности клеток

приблизительно  $1 \times 10^8$  клеток/мл, жизнеспособности приблизительно 60 и концентрации mAb 0,5 мг/мл. Собранную жидкость центрифугировали (центрифуга Jouan GR4.22, доступная от Thermofisher Scientific) в течение приблизительно 8 минут при 4000 оборотах в минуту, получая фугат жидкости с мутностью 83,4 NTU, концентрацией НСР 255688 нанограмм на миллилитр (нг/мл), концентрацией ДНК  $2,41 \times 10^8$  пг/мл и проводимостью 16,9 мС/см.

Фугат CHO 3: Клеточную культуру собирали при концентрации клеток

приблизительно  $1 \times 10^7$  клеток/мл и жизнеспособности приблизительно 20%. Жидкость

центрифугировали, получая фугат, имеющий мутность 81,0 NTU, концентрацию НСР 259840 нанограмм на миллилитр (нг/мл) и значение pH 6,8.

Фугат СНО 4: Клеточную культуру собирали при концентрации клеток

приблизительно  $1 \times 10^7$  клеток/мл и жизнеспособности приблизительно 20%. Жидкость центрифугировали, получая фугат, имеющий мутность 87,5 NTU, концентрацию НСР 265740 нанограмм на миллилитр (нг/мл) и значение pH 6,8.

Способы

Эксперименты по контрольной фильтрации с использованием 25-мм корпусов фильтров

Проверочные жидкости клеток СНО использовали для проведения тестирований по фильтрации на различных комбинациях нетканых материалов и мембранной среды с использованием фильтрующих акриловых корпусов с номинальным диаметром 25 мм, как показано далее. Диски диаметром 25 мм из функционального нетканого материала и функциональной мембранной среды вырезали из высушенных проб среды, описанных выше. Для каждой тестируемой комбинации среды, шесть дисков из определенной функциональной мембранной среды помещали в нижней части акрилового корпуса фильтра. Затем четыре диска из определенной функциональной нетканой среды помещали поверх функциональной мембранной среды в держателе. Затем собирали акриловый корпус. Акриловый корпус был приспособлен для обеспечения кромочного уплотнения вокруг контура среды с помощью уплотнительного кольца, определяющего эффективную площадь фильтрации (EFA)  $2,84$  квадратных сантиметра ( $\text{см}^2$ ), таким образом, что проверочная жидкость будет протекать во входной патрубке корпуса, затем через четыре слоя функциональной нетканой среды, затем через шесть слоев функциональной мембранной среды, затем из выходного патрубка корпуса. Вентиляционный клапан, расположенный вблизи входного патрубка для жидкости, позволял вентиляцию корпуса воздухом перед тестированием.

Контрольные фильтрации проводили с использованием фильтрующей скрининговой системы PENDOTECH, доступной от PendoTECH, Princeton, New Jersey.

Автоматизированный модуль насоса обеспечивал постоянную скорость потока контрольного раствора в корпус фильтра. Падение давления в корпусе фильтра контролировали с использованием датчика давления, расположенного выше по потоку от входного патрубка корпуса. Массу жидкости, собранной из выходного патрубка корпуса фильтра контролировали с использованием баланса массы. В какой-либо данный момент времени, суммарное количество жидкости, обработанной через корпус фильтра, характеризовалось единицами литров жидкости, обработанной на квадратный метр EFA ( $\text{л/м}^2$ ).

Перед каждым тестированием фильтра корпус фильтра сначала вентилировали и промывали со скоростью потока  $3$  мл/мин  $250$  л/м<sup>2</sup>  $25$  миллимолярного (мМ) раствора хлорида натрия в деионизированной воде. Затем подачу жидкости меняли на проверочную жидкость СНО, и приступали к тестированию фильтра, также со скоростью потока  $3$  мл/мин. Во время тестирования фильтра падение давления увеличивалось по мере того, как мембрана загружалась твердыми частицами в проверочной жидкости. Тестирование фильтра прекращали, когда давление достигало  $172$  кПа ( $25$  фунтов на квадратный дюйм), и суммарное количество жидкости, обработанной за это время, регистрировали как пропускную способность. Пробы жидкости из выходного патрубка для каждого тестирования фильтра собирали в отдельных аликвотах по приблизительно  $25$  миллилитров ( $88$  л/м<sup>2</sup>), точную массу каждой из которых измеряли и регистрировали.

Измеряли мутность каждой аликвоты, и выбранные аликвоты тестировали на концентрацию НСР и/или ДНК, как описано выше. Среднюю мутность из выходного патрубка для каждого тестирования фильтра рассчитывали как взвешенное среднее значение мутности каждой из аликвот, взвешенных по массе аликвот.

Эксперименты по контрольной фильтрации с использованием 47-мм корпусов фильтров

Проверочные жидкости клеток СНО использовали для проведения тестирований по фильтрации на различных комбинациях нетканых материалов и мембранной среды с использованием фильтрующих корпусов с номинальным диаметром 47 мм, как показано далее. В каждом контрольном эксперименте сконструировали четыре фильтрующих блока, каждый из которых имел либо один акриловый корпус фильтра с номинальным диаметром 47 мм, либо два таких корпуса фильтра, расположенных последовательно. Диски диаметром 47 мм из среды вырезали из высушенных проб среды, описанных выше. Диски из среды помещали внутри корпусов фильтров в конкретных комбинациях, как описано в приведенных ниже примерах. Затем собирали корпуса. Каждый акриловый корпус был приспособлен для обеспечения кромочного уплотнения вокруг контура среды с помощью уплотнительного кольца, определяющего EFA 13,85 квадратных сантиметра (см<sup>2</sup>). Вентиляционный клапан, расположенный вблизи входного патрубка для жидкости, позволял вентиляцию корпуса воздухом перед тестированием.

В фильтрующих блоках, в которых использовали один корпус фильтра, корпус фильтра был устроен таким образом, что проверочная жидкость проходила во входной патрубок для жидкости корпуса, затем через фильтрующую среду внутри корпуса, затем из выходного патрубка для жидкости корпуса. В фильтрующих блоках, в которых использовали два корпуса фильтра, корпуса фильтров были устроены таким образом, что проверочная жидкость проходила во входной патрубок для жидкости первого корпуса, затем через фильтрующую среду внутри первого корпуса, затем из выходного патрубка для жидкости первого корпуса, затем во входной патрубок для жидкости второго корпуса, затем через фильтрующую среду внутри второго корпуса, затем из выходного патрубка для жидкости второго корпуса.

Контрольные фильтрации проводили с использованием фильтрующей скрининговой системы с нормальным потоком (3M Purification, Inc., Meriden, CT). Автоматизированный модуль насоса обеспечивал постоянную скорость потока контрольного раствора в каждый фильтрующий блок. Датчик давления был расположен выше по потоку каждого корпуса фильтра каждого фильтрующего блока, таким образом, чтобы можно было контролировать падение давления на каждом корпусе фильтра. В фильтрующих блоках с двумя последовательными корпусами фильтров, трехходовой клапан был установлен между первым корпусом фильтра и вторым корпусом фильтра, чтобы позволить периодический сбор проб из этого положения в фильтрующем блоке с помощью шприца. Массу жидкости, собранной из выходного патрубка последнего последовательного корпуса фильтра каждого фильтрующего блока, контролировали с использованием баланса массы. В какой-либо данный момент времени, суммарное количество жидкости, обработанной через корпус фильтра, характеризовалось единицами литров жидкости, обработанной на квадратный метр EFA (л/м<sup>2</sup>).

Перед каждым тестированием фильтра корпус фильтра сначала вентилировали и промывали со скоростью потока 4 мл/мин 250 л/м<sup>2</sup> 35 миллимолярного (мМ) раствора хлорида натрия в деионизированной воде. Затем подачу жидкости меняли на



проверочную жидкость СНО, и приступали к тестированию фильтра, со скоростью потока 3,7 мл/мин. Во время тестирования фильтра суммарное падение давления по фильтрующему блоку увеличивалось по мере того, как мембраны загружались твердыми частицами в проверочной жидкости. Тестирование каждого фильтра прекращали, когда суммарное давление (по всем последовательным корпусам в фильтрующем блоке) достигало 172 кПа (25 фунтов на квадратный дюйм), и суммарное количество жидкости, обработанной за это время, регистрировали как пропускную способность.

#### Примеры

#### Примеры 1-2; Сравнительные примеры C1-C5

Различные комбинации функциональных сред, как описано в таблице 1, были протестированы в способе экспериментов по контрольной фильтрации с использованием 25-мм корпусов фильтров, используя фугат СНО 1. Результаты касательно пропускной способности, средней мутности из выходного патрубка и уменьшения НСР для примеров 1-2 и сравнительных примеров C1-C5 представлены в таблице 1.

Таблица 1

Проба	Нетканый материал	Мембрана	Пропускная способность (л/м <sup>2</sup> )	Мутность из выходного патрубка	% уменьшения НСР				
					Аликвота				
					1	2	4	5	6
1	1	2A	470	3,3	97	86	44	-	11
C1	1	1	446	2,0	58	24	28	-	28
C2	2	2A	371	1,8	99	95	-	80	-
C3	2	1	410	1,7	96	88	-	52	-
C4	1	3	462	3,1	59	40	36	-	34
2	1	2A	340	2,6	-	91	37	-	-
C5	3	2A	286	4,8	-	89	-	22	-

«-» означает «не анализировали»

Принимая во внимание тот факт, что расположенная выше по потоку мембрана влияет на предельную пропускную способность фильтрующей среды, данные о пропускной способности из таблицы 1 были объединены и сопоставлены для нетканого материала 1, нетканого материала 2 и нетканого материала 3. Средняя пропускная способность при использовании нетканого материала 1 составляла 430 л/м<sup>2</sup>. Средняя пропускная способность при использовании нетканого материала 2 составляла 390 л/м<sup>2</sup>. Пропускная способность для нетканого материала 3 составляла 286 л/м<sup>2</sup>.

#### Пример 3: Сравнительные примеры C6-C8

Упомянутый выше эксперимент был переделан с использованием проверочного раствора с более высокой концентрацией НСР. Различные комбинации функциональных сред, как описано в таблице 2, были протестированы в способе экспериментов по контрольной фильтрации с использованием 25-мм корпусов фильтров, используя фугат СНО 2. Результаты касательно пропускной способности, средней мутности из выходного патрубка, % уменьшения НСР и значения логарифмического уменьшения (LRV) касательно уменьшения ДНК для примера 3 и сравнительных примеров C6-C8 представлены в таблице 2 ниже. Как упоминалось выше, падение давления в корпусе фильтра контролировали во время прохождения, учитывая массу собранной жидкости,

по которой может быть рассчитана пропускная способность ( $\text{л/м}^2$ ). Показанное на ФИГ. 6 представляет собой давление в виде функции от пропускной способности для примера 3 и сравнительных примеров С6-С8.

Таблица 2

Проба	Нетканый материал	Мембрана	Пропускная способность ( $\text{л/м}^2$ )	Мутность из выходного патрубка	% уменьшения НСР		Уменьшение LRV ДНК	
					Аликвота		Аликвота	
					1	2	1	2
3	1	2A	657	5,7	74	46	6,71	7,33
С6	2	2A	384	3,5	82	66	6,95	6,78
С7	2	1	357	3,1	77	46	7,53	6,32
С8	1	1	552	3,4	46	29	7,91	7,03

Примеры 4-5; Сравнительные примеры С9-С10

Различные среды были протестированы в фильтрующих блоках после способа экспериментов по контрольной фильтрации с использованием 47-мм корпусов фильтров, указанного выше.

Сравнительный пример С9 содержал только один корпус фильтра, в котором были установлены два стандартных класса глубинных фильтрующих сред (доступные под торговыми названиями «ZETA PLUS 60ZA» и «ZETA PLUS 90ZA» от 3M Co., St. Paul, MN, составленные из предварительно экстрагированного неорганического фильтрующего вспомогательного средства, целлюлозы и катионного полимерного связующего вещества). Корпус фильтра содержал 1 слой ZETA PLUS 60ZA выше по потоку от 1 слоя ZETA PLUS 90ZA.

Сравнительный пример С10 содержал два корпуса фильтра, расположенные последовательно. Первый (выше по потоку) корпус фильтра содержал четыре слоя нетканого материала 1. Второй корпус фильтра содержал одну 0,2-микронную, асимметричную, нефункционализированную нейлоновую эксклюзионную мембрану, которая не была функционализированной. Данный фильтрующий блок моделировал коммерчески доступный синтетический осветляющий фильтр, предназначенный для осветления клеточной культуры млекопитающих, 3M EMPHAZE AEX Hybrid Purifier, доступный от 3M Purification, Inc., Meriden, CT.

Пример 4 содержал два корпуса фильтра, расположенные последовательно. Первый (выше по потоку) корпус фильтра содержал четыре слоя нетканого материала 1. Второй корпус содержал одну 0,2-микронную, асимметричную, нефункционализированную нейлоновую эксклюзионную мембрану выше по потоку от 2 слоев мембраны 2В.

Пример 5 был такой же конфигурации, как и пример 4, за исключением того, что использовали 4 слоя мембраны 2В вместо 2.

Четыре фильтрующих блока одновременно подвергали испытанию с фугатом СНО 3 со скоростью потока 3,7 мл/мин. Пробы были взяты из каждого фильтрующего блока, в каждом из двух положений для анализа на НСР. Первое положение (если использовали два корпуса) было ниже по потоку от выходного патрубка корпуса 1, но выше по потоку от входного патрубка корпуса 2. Это позволило рассчитать уменьшение НСР, достигнутое при использовании среды в корпусе 1. Второе положение было ниже по

потоку от выходного патрубка корпуса 2. Это позволило рассчитать суммарное уменьшение НСР, достигнутое при использовании среды в обоих корпусах. Пробы были взяты из каждого фильтрующего блока в двух точках пропускной способности 145 л/м<sup>2</sup> и 220 л/м<sup>2</sup>, что позволило характеризовать уменьшение НСР, достигнутое в более ранней части прохождения и более поздней части прохождения, соответственно. Уменьшение НСР в каждом из положений и точках пропускной способности показано в таблице 3. Кроме того, показанное в таблице 3 ниже представляет собой суммарную пропускную способность и мутность накопленного фильтрата для примеров 4-5 и сравнительных примеров С9-10.

Таблица 3

Проба	% уменьшения НСР				Суммарная пропускная способность (л/м <sup>2</sup> )	Мутность (NTU)
	145 л/м <sup>2</sup>		220 л/м <sup>2</sup>			
	После корпуса 1	После корпуса 2	После корпуса 1	После корпуса 2		
С9	NA	26	NA	0	339	0,5
С10	33	26	28	33	422	3,0
4	34	69	31	35	397	4,5
5	26	74	30	68	365	2,8

«NA» означает «не определено»

Примеры 6-8: сравнительный пример С11

Различные среды были протестированы в фильтрующих блоках после способа экспериментов по контрольной фильтрации с использованием 47-мм корпусов фильтров, указанного выше.

Сравнительный пример С11 содержал только один корпус фильтра, в котором были установлены четыре слоя нетканого материала 1 выше по потоку от одной 0,2-микронной, асимметричной, нефункционализированный нейлоновой эксклюзионной мембраны. Данный фильтрующий блок моделировал коммерчески доступный синтетический осветляющий фильтр, предназначенный для осветления клеточной культуры млекопитающих, 3М EMPHAZE AEX Hybrid Purifier, доступный от 3M Purification, Inc., Meriden, CT.

Примеры 6-8 содержали два корпуса фильтра, расположенные последовательно, причем содержимое первого (выше по потоку) корпуса было идентично содержимому корпуса сравнительного примера С11. Второй корпус для примеров 6-8 содержал три, четыре и шесть слоев, соответственно, мембраны 2 В.

Четыре фильтрующих блока одновременно подвергали тестированию с фугатом СНО 4 со скоростью потока 3,7 мл/мин. Когда суммарное падение давления каждого из фильтрующих блоков достигало 172 кПа (25 фунтов на квадратный дюйм), суммарное количество жидкости, обработанной за это время, регистрировали в качестве пропускной способности. Измеряли мутность и концентрацию НСР суммарного объема накопленного фильтрата для каждого фильтрующего блока. Это позволило рассчитать уменьшение НСР, достигнутое с использованием каждого фильтрующего блока по всему прохождению. Пропускная способность, общая мутность и уменьшение НСР

для каждого из фильтрующих блоков показаны в таблице 4.

Таблица 4

Проба	Суммарная пропускная способность (л/м <sup>2</sup> )	Мутность (NTU)	% уменьшения НСП
C11	429	0,3	36
6	378	1,7	62
7	419	1,3	62
8	421	2,0	72

Аликвоты из фугата СНО 4 проверочной жидкости и каждого из объемов фильтратов из примеров 6-8 и сравнительного примера C11 анализировали с использованием SDS-PAGE. Полученный в результате гель показан на фигуре 7.

Предвидимые модификации и изменения настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники без отступления от объема и сущности настоящего изобретения. Настоящее изобретение не должно ограничиваться вариантами осуществления, которые изложены в настоящей заявке для иллюстративных целей. В той степени, в которой существует какой-либо конфликт или несоответствие между данным описанием, как написано, и раскрытием в каком-либо документе, упомянутом или включенном путем ссылки в данную заявку, данное описание, как указано, будет контрольным.

#### (57) Формула изобретения

1. Упорядоченный фильтрующий материал для очистки и/или выделения биоматериалов из жидкостей, содержащий:

(i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, причем анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и

(ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана содержит множество гуанидильных групп;

при этом первый фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя.

2. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что первый фильтрующий слой содержит по меньшей мере, 0,1 ммоль четвертичных аммониевых групп на грамм первого фильтрующего слоя.

3. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что второй фильтрующий слой содержит, по меньшей мере 0,01 ммоль гуанидильных групп на грамм второго фильтрующего слоя.

4. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что первый фильтрующий слой содержит полимер, привитый к поверхности нетканого субстрата, причем полимер содержит взаимополимеризованные мономерные звенья:

(a) от 80 до 98 мас. % аминоалкил(мет)акрилоильного мономера;

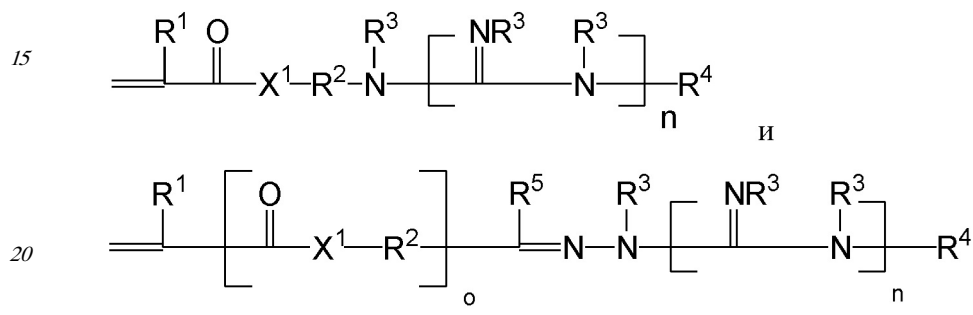
(b) от 2 до 20 мас. % поли(алкиленоксид)ного мономера; и

(с) от 0 до 10 мас. % второго гидрофильного мономера.

5. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что второй фильтрующий слой содержит полимер, привитый к поверхности нетканого субстрата, причем полимер содержит взаимополимеризованные мономерные звенья:

- 5 (a) от 10 до 50 мас. % мономера лиганда, содержащего четвертичный аммоний;  
(b) от 10 до 80 мас. % амидного мономера;  
(c) от 10 до 40 мас. % оксимономера; и  
(d) от 0 до 30 мас. % поли(алкиленоксид)ного мономера.

6. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что функционализированная микропористая мембрана содержит свободнорадикально привитый (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной функциональной группой, при этом (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной функциональной группой содержит по меньшей мере один из:



В КОТОРЫХ

R<sup>1</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил;

- 25 R<sup>2</sup> представляет собой (гетеро)углеводородную группу;  
каждый R<sup>3</sup> независимо представляет собой H или углеводородный радикал;  
R<sup>4</sup> представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил или -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>;  
30 R<sup>5</sup> представляет собой H или углеводородный радикал;  
X<sup>1</sup> представляет собой -O- или -NR<sup>3</sup>-;  
o означает 0 или 1, и  
n означает 1 или 2.

7. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 6, отличающийся тем, что  
свободнорадикально привитый (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной  
функциональной группой привит к слою праймера, расположенному на микропористой  
мембране, причем слой праймера содержит поперечносшитый полиаминный полимер,  
имеющий этиленненасыщенные полимеризуемые группы, при этом поперечносшитый  
полиаминный полимер, имеющий этиленненасыщенные полимеризуемые группы,  
представляет собой продукт реакции: (а) полиаминного полимера; (б)  
полифункционального поперечносшивающего агента для полиаминного полимера; и  
(с) мономера, имеющего реакционноспособную в отношении амина функциональную  
группу и этиленненасыщенную полимеризуемую группу.

8. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 6, отличающийся тем, что  
45 свободнорадикально привитый (мет)акрилоильный мономер с гуанидильной  
функциональной группой привит на микропористую мембрану в присутствии  
фотоинициатора типа II.

9. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что

дополнительно содержит нефункционализированный фильтрующий слой, расположенный между первым фильтрующим слоем и вторым фильтрующим слоем.

10. Фильтрующее устройство для очистки и/или выделения биоматериалов из жидкостей, содержащее

5 входной патрубком для жидкости;

выходной патрубком для жидкости; и

фильтрующую среду, соединяющую по текучей среде входной патрубком для жидкости и выходной патрубком для жидкости, при этом фильтрующая среда содержит (i) первый фильтрующий слой, содержащий анионообменный нетканый субстрат, причем  
10 анионообменный нетканый субстрат содержит множество четвертичных аммониевых групп; и (ii) второй фильтрующий слой, содержащий функционализированную микропористую мембрану, причем функционализированная микропористая мембрана содержит множество гуанидильных групп; и при этом первый фильтрующий слой расположен выше по потоку от второго фильтрующего слоя, фильтрующей среды.

15 11. Способ фильтрации биологической жидкости, при этом способ включает стадии, на которых:

(a) обеспечивают биологическую жидкость, причем биологическая жидкость содержит целевую биомолекулу и загрязняющие вещества, и

(b) вводят в контакт биологическую жидкость с упорядоченным фильтрующим  
20 материалом по любому из пп. 1-9 с получением фильтрата.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что целевая биомолекула представляет собой белок.

13. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что анионообменный нетканый субстрат имеет эффективный диаметр волокна от 1 до 6  
25 микрон.

14. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что второй фильтрующий слой имеет размер пор, соответствующий давлению, при котором поток газа составляет половину от потока при использовании сухого слоя, от 0,1 до 5 микрон.

30 15. Упорядоченный фильтрующий материал по п. 1, отличающийся тем, что дополнительно содержит нефункционализированный фильтрующий слой, расположенный между первым фильтрующим слоем и вторым фильтрующим слоем.

16. Фильтрующее устройство по п. 10, отличающееся тем, что фильтрующая среда сформирована в форме цилиндра из среды, содержащего множество складок.

35 17. Фильтрующее устройство по п. 10, отличающееся тем, что дополнительно содержит сердечник, при этом второй фильтрующий слой намотан вокруг сердечника, а первый фильтрующий слой намотан вокруг второго фильтрующего слоя.

18. Фильтрующее устройство по п. 10, отличающееся тем, что фильтрующее устройство дополнительно содержит:

40 разделяющий элемент;

кромочное уплотнение;

причем разделяющий элемент содержит

центральный сердечник, связанный по текучей среде с входным патрубком для жидкости;

45 первую сторону; и

вторую сторону; и

при этом фильтрующая среда дополнительно содержит

первый диск среды, расположенный на первой стороне разделяющего элемента и

имеющий внешнюю кольцеобразную кромку и внутреннюю кольцеобразную кромку;  
и

второй диск среды, расположенный на второй стороне разделяющего элемента и  
имеющий внешнюю кольцеобразную кромку и внутреннюю кольцеобразную кромку;

и

причем внешние кольцеобразные кромки первого и второго дисков среды соединены  
с помощью кромочного уплотнения, и внутренние кольцеобразные кромки первого и  
второго дисков среды соединены с центральным сердечником, и при этом сторона  
выше по потоку первого и второго дисков среды содержит первый фильтрующий слой.

19. Способ по п. 11, отличающийся тем, что биологическая жидкость имеет  
проводимость по меньшей мере 10 мС/см.

20. Способ по п. 11, отличающийся тем, что биологическая жидкость имеет мутность  
по меньшей мере 40 NTU.

21. Способ по п. 11, отличающийся тем, что биологическая жидкость имеет  
концентрацию белка клетки-хозяина от 100000 нг/мл до 2000000 нг/мл.

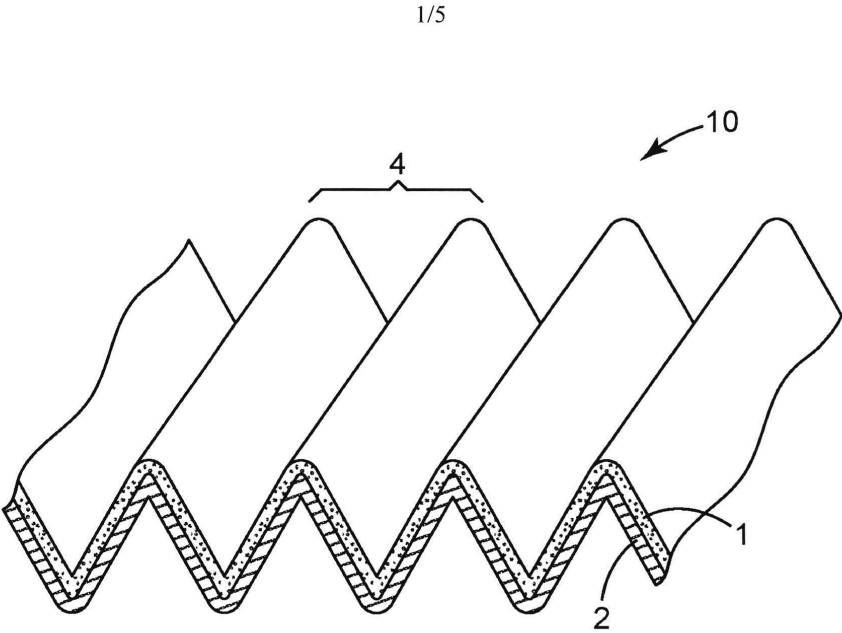
22. Способ по п. 11, отличающийся тем, что биологическая жидкость имеет  
концентрацию ДНК по меньшей мере  $10^5$  пг/мл.

23. Способ по п. 11, отличающийся тем, что фильтрат имеет мутность менее чем 15  
NTU.

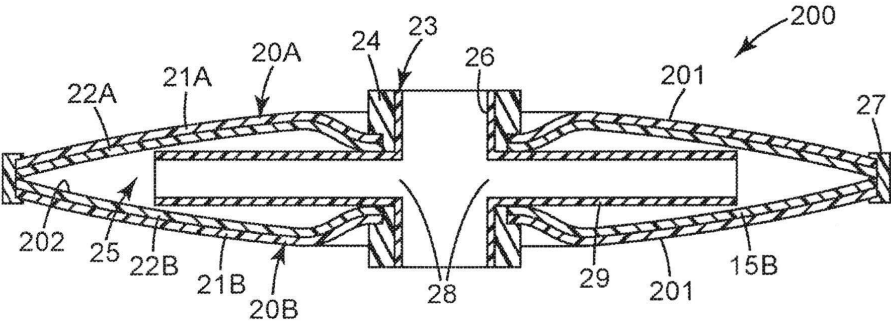
24. Способ по п. 11, отличающийся тем, что биологическая жидкость имеет первую  
концентрацию белка клетки-хозяина, и фильтрат имеет вторую концентрацию белка  
клетки-хозяина, при этом вторая концентрация белка клетки-хозяина является по  
меньшей мере на 50% меньшей, чем первая концентрация белка клетки-хозяина.

25. Способ по п. 11, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию, на  
которой вводят в контакт фильтрат с хроматографической колонкой,  
функционализированной белком А.

1



Фиг. 1

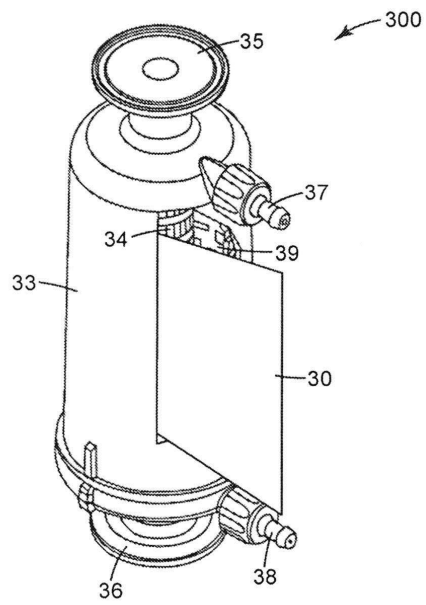


Фиг. 2

2

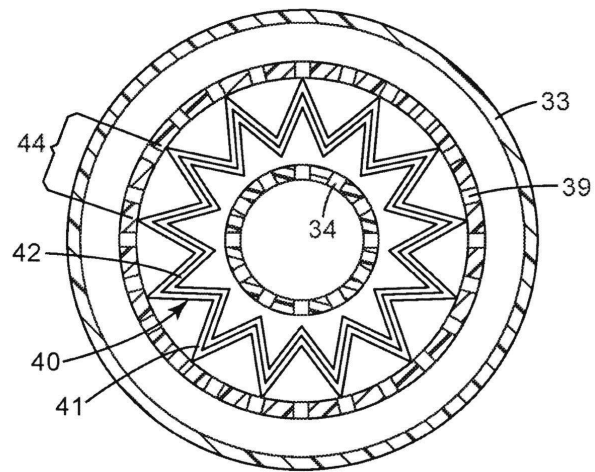


2/5

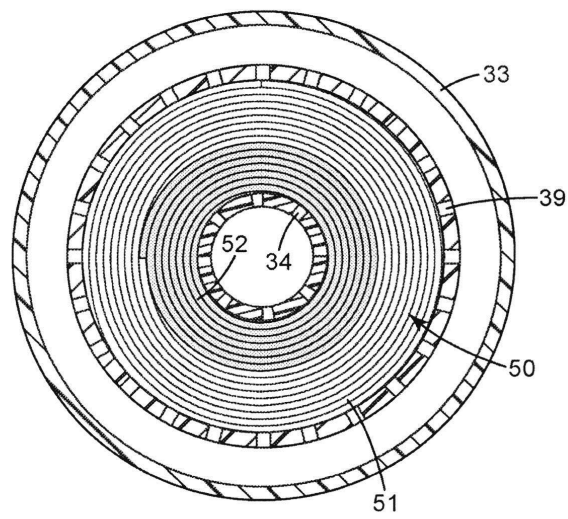


Фиг. 3

3/5

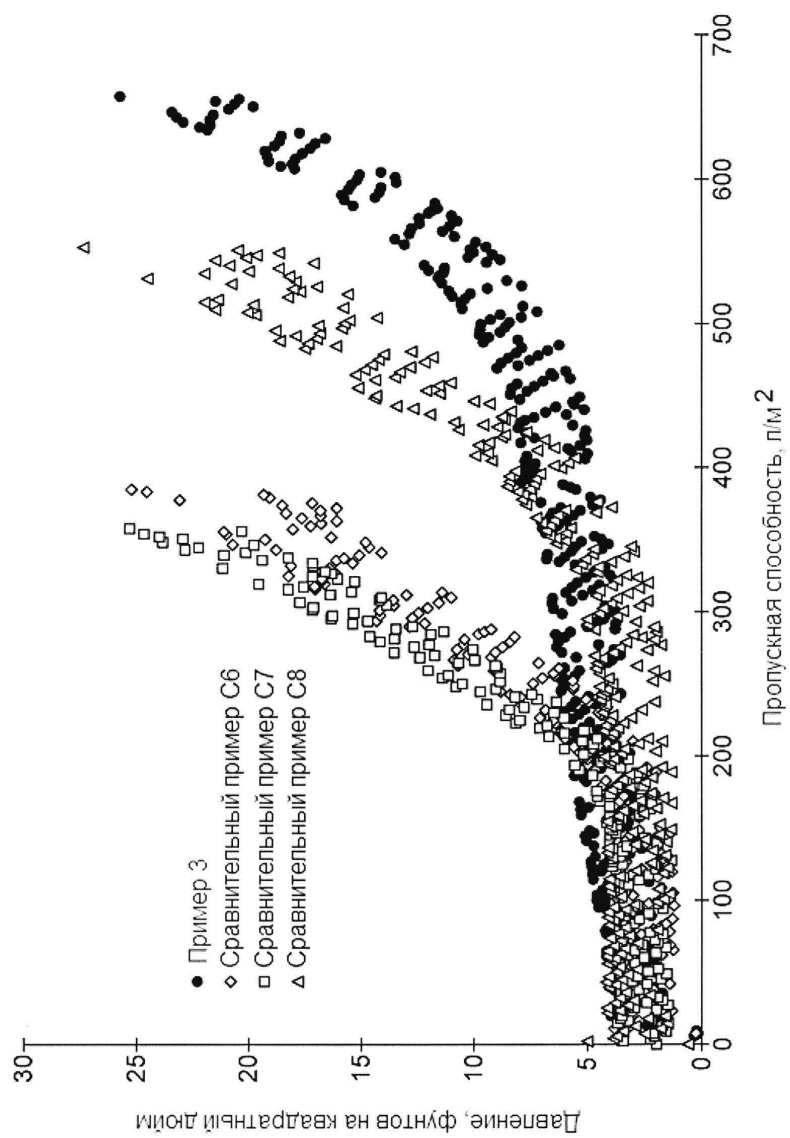


Фиг. 4



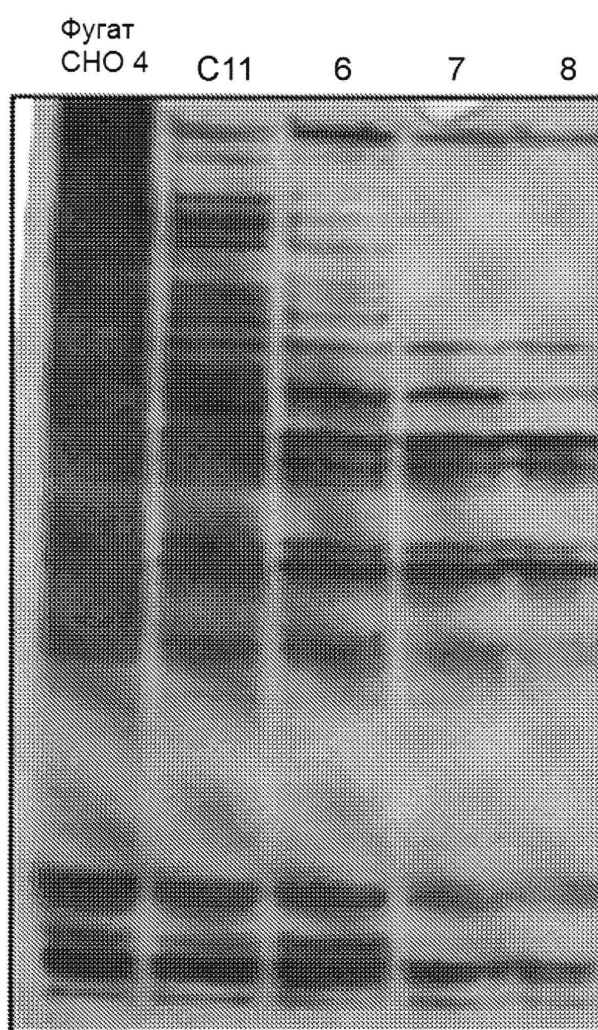
Фиг. 5

4/5



Фиг. 6

5/5



Фиг. 7