



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 552**

51 Int. Cl.:

**B01D 67/00** (2006.01)

**B01D 69/02** (2006.01)

**B01D 69/12** (2006.01)

**B01D 71/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00947589 .8**

86 Fecha de presentación : **21.07.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1200179**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

54 Título: **Membranas de filtración cargadas y sus usos.**

30 Prioridad: **30.07.1999 US 146558 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

72 Inventor/es: **Van Reis, Robert, D.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 267 552 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Membranas de filtración cargadas y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a membranas de filtración cargadas y a su utilización para la separación de una proteína de un solvente, de solutos de bajo peso molecular o de una mezcla de proteínas. La modificación de las membranas para generar una carga incluye la modificación de los poros de la membrana para alterar la carga dentro de un poro y el tamaño del mismo. En consecuencia, la proteína se separa de otros solutos en una mezcla basándose en el tamaño, así como en la carga neta de la proteína y en la carga de la membrana.

**Antecedentes de la invención**

15 Una membrana de filtración que resulta útil para las separaciones de proteínas es una barrera selectiva sintética (frecuentemente polimérica) para la microfiltración (MF) o ultrafiltración (UF) industrial o a escala de laboratorio (ver Leos J. Zeman y Andrew L. Zydney, *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, 1996, Marcel Dekker, Inc., página 3). En estos procedimientos, determinados componentes del flujo de alimentación, tales como las proteínas, pasan a través de poros de la membrana hacia el interior de un filtrado, mientras que otras proteínas o componentes, habitualmente de mayor tamaño, resultan retenidos por la membrana en el retenido (ver Zeman y Zydney, *supra*, página 3).

La ultrafiltración de proteínas es un procedimiento de membrana controlado por presión utilizado para la concentración o purificación de soluciones de proteínas (Robert van Reis y Andrew L. Zydney, "Protein Ultrafiltration", en: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, M.C. Flickinger y S.W. Drew, editores, John Wiley & Sons, Inc., 1999, página 2.197). Las membranas de UF típicamente presentan un tamaño de poro medio de entre 10 y 500 Angstroms, que representa un tamaño intermedio entre el tamaño de poro medio de la ósmosis inversa y las membranas de microfiltración. La ultrafiltración separa solutos basándose en las diferentes en la tasa de filtración de diferentes componentes a través de la membrana en respuesta a una fuerza motriz de presión dada (R. van Reis y A.L. Zydney, *supra*, página 2.197). Las tasas de filtración de solutos, y de esta manera la selectividad de membrana, resultan determinados por interacciones tanto termodinámicas como hidrodinámicas (R. van Reis y A.L. Zydney, *supra*, página 2.197). La ultrafiltración con frecuencia se utiliza en el procesamiento corriente abajo para la concentración de proteínas, el intercambio de tampón y la desalación, la purificación de proteínas, la eliminación de virus y la clarificación (R. van Reis y A.L. Zydney, *supra*, página 2.197).

La purificación de proteínas también se consigue utilizando la filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF), recogiendo la proteína deseada en el retenido o en el filtrado, dependiendo de las tasas relativas de filtración (R. van Reis y A.L. Zydney, *supra*, página 2.197). La HPTFF resulta útil para separar proteínas de tamaño similar utilizando membranas semipermeables (ver, por ejemplo, R. van Reis *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 56:71-82, 1997, y R. van Reis *et al.*, *J. Memb. Sci.* 159:133-142, 1999). La HPTFF consigue una elevada selectividad mediante el control del flujo de filtrado y la mecánica de fluidos del dispositivo con el fin de minimizar el ensuciamiento y explotar los efectos de polarización de la concentración (R. van Reis *et al.*, *J. Memb. Sci.* 159:133-142, 1999).

A pesar del valor de estos procedimientos avanzados de filtración, existe una necesidad de características de membrana de filtración mejorada, de manera que la velocidad de separación se incremente sin sacrificar la selectividad de la membrana. Estas mejoras reducirían el coste de la separación e incrementarían el rendimiento de proteínas valiosas.

La patente US nº 4.604.204 describe la modificación covalente de membranas de acetato de celulosa mediante la adición de grupos cargados con el fin de alterar el tamaño de poro y la permeabilidad de la membrana. La patente GB nº 1.504.261 describe la modificación de membranas asimétricas de acetil celulosa con compuestos que portan grupos cargados o cargables, en particular de moléculas de pigmento reactivo yonogénico.

**Sumario de la invención**

55 La invención se refiere a membranas de filtración que poseen una carga neta, sea positiva o negativa, y además se refiere a procedimiento de preparación de membranas cargadas y de utilización de las mismas en la separación de una proteína de un soluto o de una mezcla de solutos, tales como sales, solutos tampón o proteínas. Las proteínas se separan basándose, en parte, en el tamaño de las proteínas, y, en parte, en la carga neta de las proteínas. Las membranas cargadas repelen las proteínas que presentan la misma polaridad de carga que la membrana, reteniendo de esta manera estas proteínas en el lado de corriente arriba de la membrana. Las proteínas pasan a través de los poros de la membrana si presentan una carga neta neutra o una polaridad opuesta a la de la membrana y son de tamaño menor al diámetro medio de poro. La propiedad de cribado de las membranas cargadas de la invención, medida como coeficiente de cribado, mejora drásticamente en comparación con una membrana no cargada, sin sacrificar la permeabilidad.

65 La filtración convencional de proteínas equilibra la permeabilidad de la membrana con el cribado de solutos. Idealmente la permeabilidad es elevada para permitir una rápida separación, mientras que el cribado es reducido para la retención selectiva de la proteína deseada. Sin embargo, utilizando membranas convencionales de filtración, un experto ordinario en la materia sacrifica permeabilidad para ganar selectividad, limitando de esta manera la velocidad

de separación y la recuperación de proteínas, respectivamente. Las membranas cargadas de la invención, por otra parte, proporcionan una elevada permeabilidad, acelerando de esta manera la separación, reduciendo simultáneamente el cribado, para una separación más selectiva y un rendimiento más elevado de la proteína deseada.

5 En un aspecto, la invención implica un procedimiento de preparación de una membrana de filtración de celulosa modificada covalentemente con un compuesto cargado tal como se expone en la reivindicación 1. Las membranas de filtración se encuentran disponibles comercialmente de diversas fuentes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, Millipore Corp., Bedford, MA, y Pall Filtron Corp., Northborough, MA. La membrana de filtración presenta grupos hidroxilos disponibles sobre la superficie de la membrana para la reacción con un compuesto derivatizante. Estos  
10 grupos hidroxilo son grupos de alcohol primario de una matriz de celulosa. La membrana es de celulosa, más preferentemente la membrana es de celulosa regenerada compuesta (CRC) (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.522.991 para una descripción de las membranas celulósicas). Una membrana de celulosa presenta las ventajas de características inherentes de bajo ensuciamiento, hidrofiliidad, la disponibilidad de grupos de alcohol primarios (de los grupos glucosa de la celulosa) para la reacción con un compuesto cargado, y la estabilidad bajo condiciones alcalinas. Una  
15 membrana de CRC presenta la ventaja adicional de la resistencia mecánica.

La membrana es una membrana de celulosa, preferentemente una membrana de CRC, modificada para presentar una carga neta (positiva o negativa), en la que se encuentra mejorado el rendimiento de permeabilidad frente a cribado. Por ejemplo, para una permeabilidad dada de la membrana, el coeficiente de cribado se reduce en por lo menos 1,5  
20 veces para una proteína retenida en el lado de corriente arriba de la membrana cuando la membrana y la proteína retenida presenta una polaridad de carga igual (positiva o negativa).

En otra realización, la invención implica una membrana, preferentemente una membrana de CRC, en la que una pluralidad de los grupos alcohol primario se encuentran unidos covalentemente a un compuesto cargado. Preferente-  
25 mente, el compuesto cargado retiene su carga bajo las condiciones utilizadas para separar la proteína de los solutos o de una mezcla de proteínas.

En otra realización, el compuesto cargado se encuentra cargado positivamente. La carga positiva puede producirse en cualquier compuesto que conserve su carga bajo las condiciones para la separación de proteínas. Por ejemplo  
30 la carga puede ser generada, aunque sin limitarse a ella, por una amina, por una amina cuaternaria, y similar. En el caso de que el compuesto sea una amina, preferentemente la amina presenta dos o tres grupos de alquilo inferior covalentemente unidos para conseguir una amina que sea capaz de mantener su polaridad de carga bajo las condiciones para la separación de proteínas. Preferentemente los grupos de alquilo inferior presenta entre uno y 8 átomos de carbono. Más preferentemente, los grupos alquilo son grupos metilo, etilo y propilo. Por ejemplo, el grupo amina del  
35 compuesto cargado positivamente puede ser una trialkilamina o dialquilamina, tal como trimetilamina, trietilamina, dietilaminoetilo, y similar.

En otra realización, el compuesto cargado se encuentra cargado negativamente. La carga negativa puede producirse en cualquier compuesto que conserve su carga bajo las condiciones para la separación de proteínas. Por ejemplo, la  
40 carga puede producirse, aunque sin limitarse a ellos, en un ácido, tal como un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, carboximetil sulfonato, metil sulfonato, y similar.

En todavía otra realización, el compuesto cargado comprende un brazo líncr entre el grupo cargado y el grupo unido covalentemente a un grupo reactivo de la membrana. En el caso de que la membrana sea una membrana de CRC,  
45 el brazo líncr separa el grupo cargado y un grupo de alcohol primario de la matriz celulósica con la que reacciona el líncr. El brazo líncr permite que el grupo cargado sobresalga de la superficie de la membrana. En el caso de que el compuesto cargado modifique la superficie de un poro de membrana, el brazo líncr permite que el compuesto sobresalga hacia la luz del poro, modificando de esta manera el tamaño del mismo. Los poros de membrana más grandes se reducirán de tamaño, los poros de tamaño menor se llenarán, y los poros todavía más pequeños no podrán  
50 ser penetrados por el compuesto debido a impedimentos estéricos y/o repulsión electrostática. En consecuencia, se estrecha la distribución de tamaños de poro de membrana, proporcionando una mejor separación de las proteínas.

En otra realización, el brazo líncr comprende una cadena alquilo de entre uno y veinte átomos de carbono, inclu-  
55 sive. La cadena alquilo puede encontrarse ramificada y la rama puede unir un primer grupo cargado con un segundo (o adicional) grupo cargado. El brazo líncr puede ser cualquier cadena de átomos o de grupos moleculares que sean ellos mismos inertes a las condiciones de reacción utilizadas para unir la carga a la membrana, e inertes a las condiciones para la separación de proteínas. La longitud del brazo líncr se selecciona de acuerdo con la modificación deseada de tamaño de poro. Preferentemente la longitud del brazo líncr permite que el compuesto cargado reactivo penetre y reaccione dentro de algunos de los poros, estrechando de esta manera la distribución de tamaños de los poros. Los  
60 brazos de líncr pueden incluir, aunque sin limitarse a ellos, carbohidratos, dextranos, sacáridos, péptidos (con cadenas laterales de aminoácidos cargados o no cargados), polímeros (tales como derivados polivinilo, derivados poliéter, y similares) y cadenas similares. En el caso de que la membrana de filtración sea hidrofílica y se utilicen condiciones acuosas de reacción para unir el compuesto cargado a la membrana, el brazo líncr preferentemente es hidrofílico y el compuesto cargado en su forma reactiva (de reacción con la membrana) es soluble en la solución acuosa de reacción.  
65

Por consiguiente, la invención puede comprender un brazo líncr que es una cadena alquilo de entre uno y veinte átomos de carbono de longitud, preferentemente de uno a diez, más preferentemente de uno a siete átomos de carbono. Alternativamente, el brazo líncr puede ser una cadena de carbohidrato o dextrano de entre uno y quince grupos sacá-

ridos, inclusive, preferentemente de entre uno y diez, y más preferentemente de entre uno y cinco grupos sacáridos. El brazo líker puede ser un péptido de entre uno y veinticinco aminoácidos, preferentemente de uno a quince, más preferentemente de uno a diez aminoácidos. Además, el brazo líker puede ser cualquier polímero de entre uno y quince unidades repetitivas que sea inerte a las condiciones de reacción y de separación. El brazo líker puede encontrarse ramificado, en el que cada rama es más corta que la longitud de la rama principal (el brazo líker) unido al grupo reactivo. Cada rama puede acabar en un grupo cargado y la carga de cada grupo cargado es de la misma polaridad (positiva o negativa).

En una realización, el compuesto cargado reactivo presenta la fórmula general X-L-Y, en la que X es un grupo reactivo que reacciona con un grupo reactivo en la membrana, L es el brazo líker, e Y es el grupo cargado. Por consiguiente, en el caso de que la membrana sea una membrana de CRC y los grupos reactivos en la membrana sean grupos de alcohol primario, X del compuesto cargado reactivo es un grupo que promueve la reacción con los grupos de alcohol primario bajo condiciones acuosas. Como tal, X preferentemente es un grupo saliente susceptible de ataque nucleofílico por un grupo de alcohol primario para formar un enlace éter entre la matriz carbohidrato celulósica y el brazo líker del compuesto cargado. De esta manera, son compuestos cargados reactivos que resultan útiles los haluros de alquilo, y el grupo reactivo es un haluro, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, cloruro, bromuro o yoduro.

La invención implica un procedimiento de preparación de una membrana cargada de la invención, comprendiendo el procedimiento la reacción de un compuesto cargado reactivo con un grupo hidroxilo sobre la membrana, de manera que la parte cargada del compuesto cargado se encuentre unido covalentemente a la membrana. Tras la reacción, la carga neta de la membrana es positiva o negativa. El compuesto cargado reactivo penetra en una pluralidad de poros de membrana y modifica la distribución de tamaños de los poros de manera que se estrecha la distribución de tamaño de los poros.

En el caso de que el grupo cargado sea positivo, el grupo cargado puede ser una amina, una amina cuaternaria, tal como un dialquilo o trialquilo, y similar. En el caso de que el grupo cargado sea negativo, el grupo cargado es un ácido, tal como un ácido sulfónico, un ácido carboxílico, un grupo carboximetilsulfonilo, y similares. El grupo cargado se selecciona como grupo que mantendrá su carga bajo las condiciones del procedimiento de separación de proteínas de la invención.

En otro aspecto, la invención implica un procedimiento de filtración por membrana para separar una proteína de un soluto o de una mezcla de solutos (tales como sales, solutos tampón, o proteínas) utilizando una membrana cargada de la invención. Preferentemente el procedimiento implica: (1) poner en contacto una proteína en una mezcla de solutos con una membrana celulósica cargada, más preferentemente una membrana de CRC que ha reaccionado con un compuesto cargado reactivo para generar un enlace, por medio de un brazo líker, con un grupo cargado, en el que la proteína que debe retenerse presenta una carga neta que es igual a la polaridad de carga de la membrana bajo las condiciones de separación, y (2) separar la proteína de por lo menos otro soluto o proteína diferente en la mezcla, en la que la otra proteína presenta una carga neta diferente o es neutro.

En una realización de la invención, previamente a poner en contacto una proteína en una mezcla con la membrana, el pH de la mezcla se modifica, causando que la carga neta de la proteína deseada sea igual a la polaridad de carga de la membrana. Simultáneamente, el cambio de pH provoca la separación de por lo menos un soluto de la proteína deseada de carga neutra u opuesta a la carga de la membrana. Durante las etapas de contacto y de separación, el soluto neutro pasa a través de la membrana cargada hacia el filtrado, mientras que la proteína cargada deseada resulta retenida en el lado de corriente arriba de la membrana. Esta realización de la invención puede repetirse para eliminar sucesivamente solutos de la mezcla de proteínas.

En una realización de la invención, el procedimiento de filtración es la ultrafiltración (ver generalmente van Reis y Zydney, "Protein Ultrafiltration", *supra*, página 2.197). En otra realización de la invención, el procedimiento de filtración es la filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (ver generalmente R. van Reis *et al.*, J. Memb. Sci. 159:133-142, 1999).

Dicho objetivo y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención resultarán evidentes a aquellos expertos en la materia tras la lectura de los detalles de las composiciones, procedimientos y usos, tal como se expone más completamente después.

### Descripción de los dibujos

La fig. 1 es un diagrama que muestra esferas cargadas que representan proteínas con una carga neta basada en los valores de pKa de los aminoácidos de superficie a un pH dado de las soluciones de separación (retenido y filtrado). Se proporciona un diagrama de la membrana de filtración con una carga neta positiva. El flujo de la solución de separación se produce en la dirección hacia abajo a través de la membrana, reteniendo proteínas con la misma carga que la membrana (positiva) en el retenido, mientras que las proteínas con carga neta neutra y negativa fluyen a través de la membrana con el filtrado.

La fig. 2 es un diagrama de una membrana de celulosa que reacciona con el compuesto cargado reactivo bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio. Los grupos -OH representan los alcoholes primarios de una matriz de CRC. Los alcoholes primarios reaccionan con el haluro de alquilo en este diagrama formando un enlace éter covalente que

conecta el grupo cargado con la matriz de celulosa. La fig. 2B es un diagrama similar de una membrana de celulosa en el que los alcoholes primarios reaccionan con un compuesto cargado reactivo, el 3-bromopropilsulfonato, formando un enlace éter covalente. En estos ejemplos, las reacciones son catalizadas por bases.

5 La fig. 3 es un diagrama que muestra un poro de una membrana de filtración que ha reaccionado con bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio. Se representa una vista ampliada de un poro para mostrar el compuesto cargado unido a la superficie del poro y sobresaliendo en el interior de la luz del poro. Como resultado de la modificación superficial, el tamaño de poro resulta efectivamente reducido. Además, la carga positiva del poro repele las proteínas de carga igual, incrementando la probabilidad de que la proteína resulte retenida respecto a las proteínas neutras en la mezcla.

10 La fig. 4 es un gráfico que muestra la relación entre la permeabilidad de membrana (eje x) y el cribado de proteínas (eje y) de diez membranas de filtración no cargadas disponibles comercialmente. El gráfico indica que la permeabilidad incrementada se corresponde a un incremento del cribado. El soluto de ensayo para las membranas comerciales, con un tamaño medio de 10 kD, era dextrano no cargado. "F" y "M" se refieren a los fabricantes de membranas Filtron y Millipore, respectivamente.

15 La fig. 5 es un gráfico que muestra la relación entre el flujo de filtrado (ml/min, eje x) y el cribado (eje y) para membranas no cargadas y membranas cargadas con valores de corte de PM de 300 kD y de 1.000 kD. El flujo es proporcionan a la permeabilidad de la membrana (ver Zeman y Zydney, *supra*, página 16). A medida que se incrementa el flujo, se incrementa el cribado. Sin embargo, al contrario que en las membranas convencionales, al añadir carga a la membrana, el coeficiente de cribado de una proteína de igual carga se reduce para un valor dado de flujo.

20 La fig. 6 es un gráfico que muestra la relación entre la permeabilidad de membrana (eje y) y el cribado (eje x) para una membrana no cargada con un tamaño medio de poro de 300 kD (rombos blancos) y una membrana no cargada con un tamaño medio de poro de 1.000 kD (círculos blancos) definiendo una línea continua. Una membrana cargada positivamente con un tamaño medio de poro de 300 kD (rombos negros) y una membrana cargada positivamente con un tamaño medio de poro de 1.000 kD (círculos negros) define una línea discontinua. La proteína soluto es anticuerpo monoclonal anti-HER2 recombinante cargada positivamente (rhuMAb HER2). Los datos indican que, para una permeabilidad dada, el cribado se reduce drásticamente (en el presente ejemplo en aproximadamente dos órdenes de magnitud) cuando la membrana presenta la misma carga que la proteína que se somete a ensayo.

30 Antes de describir las presentes membranas y procedimientos de filtración y los procedimientos para prepararlas, debe apreciarse que la presente invención no se encuentra limitada a las composiciones particulares de materia y procedimientos que se describen, debido a que estas composiciones y procedimientos pueden, evidentemente, variar. También debe apreciarse que la terminología utilizada en la presente memoria pretende describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitativa debido a que el alcance de la presente invención se encuentra limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

## 40 Descripción de las realizaciones

### Definiciones

La expresión "membrana de celulosa" se refiere a un polímero de celulosa sobre una membrana microporosa, en la que la celulosa son unidades repetitivas de D-glucosa. El grupo de alcohol primario del monómero de glucosa proporciona la especie reactiva sobre la membrana a la que se encuentra unido covalentemente el compuesto cargado.

50 La expresión "membrana de CRC" se refiere a una membrana de celulosa regenerada compuesta preparada mediante moldeo de celulosa sobre un sustrato microporoso para controlar el tamaño medio de poro y para limitar el número de defectos en la hoja de celulosa. Las membranas de CRC resultan preferentes en la práctica de la invención debido a que presentan una mayor resistencia mecánica que las membranas de celulosa, reteniendo simultáneamente las características de hidrofiliicidad y de ensuciamiento reducido de la celulosa que resultan útiles en las separaciones de proteínas.

55 La expresión "compuesto cargado" se refiere al compuesto unido a la membrana de filtración, en el que el compuesto comprende un grupo con una carga positiva o negativa bajo las condiciones utilizadas para separar una proteína de una mezcla de proteínas. De acuerdo con la invención, el compuesto cargado puede comprender además un brazo líinker entre la membrana y el grupo cargado de manera que el compuesto cargado sobresalga de la superficie de la membrana. En el caso de que el compuesto cargado sobresalga de la superficie de un poro hacia el interior de la luz del poro, el compuesto cargado modifica el tamaño efectivo del poro y modifica la distribución de tamaño de los poros de la membrana.

60 La expresión "compuesto cargado reactivo" se refiere al compuesto cargado previamente a la unión a la membrana, de manera que el compuesto cargado reactivo todavía retiene el grupo reactivo que promueve la reacción del compuesto cargado reactivo con la membrana. Por ejemplo, en el caso en que el compuesto cargado es un ión propiltrimetilamonio unido covalentemente a una membrana de CRC, el compuesto cargado reactivo puede ser bromuro de bromopropiltrimetilamonio. La unión covalente implica el desplazamiento nucleofílico del bromuro de alquilo por un alcohol primario de la matriz de celulosa (ver la fig. 2A, por ejemplo).

La expresión “brazo líncer” se refiere a la parte de la molécula de compuesto cargado entre la parte que reacciona o que ha reaccionado con un grupo reactivo sobre la superficie de una membrana de filtración, y el grupo cargado. Preferentemente, el brazo líncer es una cadena de átomos o de subunidades moleculares, cadena que es inerte a las condiciones de reacción utilizadas para unir covalentemente el compuesto cargado a la membrana, y que es adicionalmente inerte frente a las condiciones acuosas utilizadas durante la separación de proteínas. Un brazo líncer puede comprender, aunque no se limita a ellos, una cadena alquila de entre uno y veinte átomos de carbono, una cadena de carbohidrato de entre uno y quince grupos sacáridos (incluyendo, por ejemplo, ribosa y desoxirribosa), una cadena dextrano de entre uno y quince grupos sacáridos, una cadena de aminoácidos de entre uno y veinticinco aminoácidos, y otros polímeros (tales como aquellos utilizados para preparar la membrana misma) de entre una y veinticinco unidades repetitivas. En el caso de que el compuesto cargado comprenda una cadena de aminoácidos como brazo líncer y el grupo cargado sea el aminoácido terminal de la cadena, la cadena lateral del aminoácido terminal preferentemente es una cadena lateral cargada.

El término “cribado” se refiere a la proporción entre la concentración de un soluto particular en el filtrado (corriente abajo de la membrana) y la concentración del mismo soluto en la solución de alimentación (corriente arriba de la membrana) (ver Zeman y Zydneý, *supra*, página 308). Generalmente un valor elevado de cribado sugiere que el soluto pasa con facilidad a través de la membrana, mientras que un valor bajo de cribado sugiere que el soluto resulta en gran parte retenido por la membrana. En el caso de que se desee retener un soluto corriente arriba de la membrana, resulta preferente un coeficiente reducido de cribado.

El término “permeabilidad” se refiere a la tasa de filtración dividida por la caída de presión neta a través de la membrana. Por lo tanto, la permeabilidad es la inversa de la resistencia de la membrana. La permeabilidad de membrana está determinada principalmente por la distribución del tamaño de poro, por la porosidad (densidad de poros), por el grosor de la membrana y por la viscosidad del solvente. Generalmente, a medida que se incrementa la permeabilidad, se incrementa el cribado. Al mejorar el cribado debido a la adición de un compuesto cargado a la membrana, la mejora del cribado es una mejora relativa a una membrana con sustancialmente la misma permeabilidad (dentro del 50%, preferentemente del 30%, más preferentemente dentro del 10% la misma permeabilidad) que la membrana cargada, pero que carece del compuesto cargado. De esta manera, en el caso de que la mejora sea una reducción del cribado debido a que un soluto cargado, tal como una proteína, resulta retenido por una membrana de carga igual, el cribado es una reducción a la misma, o comparablemente a la misma, permeabilidad. En consecuencia, la tasa de filtración se mantiene, mientras que la selectividad de la membrana resulta mejorada.

La expresión “carga neta” en referencia a una membrana o a una carga de proteína se refiere a una carga que es predominantemente positiva o negativa, pero no se refiere a un valor específico para la serie de cargas positivas frente al número de cargas negativas sobre la membrana o proteína, a menos que se indique lo contrario. De manera similar, la expresión “carga igual” y “misma carga” se refieren a la situación en la que una proteína con una carga dada, positiva o negativa, se relaciona con una membrana o con otra proteína con una carga dada, sea positiva o negativa.

La expresión “mezcla de proteínas” se refiere a diversas proteínas de diferentes tamaños y cargas netas bajo condiciones de separación dadas de pH y fuerza iónica. De acuerdo con el procedimiento de separación de la invención, cuando la carga neta de una proteína de interés es conocida o se manipula mediante la modificación de las condiciones de pH para que presente una carga neta positiva o una carga neta negativa, la proteína puede separarse de proteínas neutras o de carga diferente pasando la mezcla de proteínas a través de una membrana de la invención con la misma carga que la proteína de interés (es decir, con una carga neta positiva o con una carga neta negativa). Por ejemplo, la invención contempla un procedimiento para separar una proteína deseada de por lo menos una proteína de una mezcla de proteínas en una solución tamponada acuosa, alterando el pH de la solución de manera que la proteína deseada presenta una carga neta y la proteína que debe separarse de ella es neutra o presenta una carga neta que es de sentido contrario a la carga neta de la proteína deseada. A continuación, la mezcla de proteína se pone en contacto con una membrana de filtración de celulosa cargada de la invención, en la que la proteína deseada y la membrana presentan cargas netas iguales. La proteína deseada se separa de la proteína neutra y de la proteína de carga contraria mediante la retención de la proteína deseada corriente arriba de la membrana y filtrando la proteína neutra o de carga contraria a través de la membrana. Este procedimiento se repite hasta que la proteína deseada se ha separado de un número seleccionado de proteínas de la mezcla.

La expresión “distribución de tamaños de poro” se refiere, básicamente, al número de poros que presentan un radio real,  $R$ , próximo a un radio teórico,  $r$ , expresado como función de densidad de probabilidad (ver Zeman, L.J. y Zydneý, A.L., *supra*, páginas 299-301). A medida que la desviación estándar de los radios de poro reales se incrementan, se incrementa la distribución de tamaño de poro. Resulta una distribución estrecha de tamaño de poro de una reducción de la desviación estándar de los poros respecto al valor teórico. Esto se consigue, por ejemplo, cuando los tamaños de algunos de los poros más grandes se reducen mediante la adición de compuesto cargado en los poros más grandes de una membrana cargada. La fig. 3 muestra un diagrama de esta reducción del tamaño de poro. El principio de intrusión líquido-líquido en los poros resulta útil para medir la distribución de tamaño de poro (ver R. van Reis y A.L. Zydneý, *supra*, página 2.201). De acuerdo con este principio, dos líquidos altamente inmiscibles, tales como las soluciones de una sal sulfato y un poli(etilenglicol) se ponen en contacto mediante mezcla para alcanzar la separación de equilibrio. La membrana que debe someterse a ensayo se activa con uno de los líquidos de manera que se llenan todos los poros. Tras drenar los canales de alimentación, se introduce el segundo líquido en el sistema. El primer líquido resulta desplazado fuera de los poros por el segundo líquido, y la tasa de flujo se mide como función de la presión transmembranal. Los datos resultantes proporcionan información sobre la distribución de tamaño de poro y

pueden correlacionarse con el valor de corte nominal de peso molecular (ver R. van Reis y A.L. Zydney, *supra*, página 2.201).

## Ejemplos

5 Los ejemplos siguientes se proporcionan para proporcionar a los expertos ordinarios en la materia una exposición y descripción completas de cómo preparar las composiciones de la invención y de cómo poner en práctica los procedimientos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que el inventor considera su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los datos utilizados (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.), pero deben incluirse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura se expresa en grados C y las reacciones químicas se llevaron a cabo a presión atmosférica.

### Ejemplo 1

#### 15 *Preparación de membranas de filtración cargadas*

Con fines ilustrativos, el presente ejemplo da a conocer membranas de CRC cargadas y procedimientos para su preparación. Se infiere que puede añadirse carga a una membrana mediante reacciones conocidas por el experto ordinario en la materia, de manera que el producto membrana resulte cargado y retenga selectivamente una proteína deseada en el retenido, y deje pasar proteínas no cargadas o de carga opuesta con el filtrado. El producto membrana cargada presenta las características de un coeficiente de cribado más bajo a una permeabilidad dada que una membrana no cargada, o una permeabilidad más elevada para un coeficiente de cribado dado.

Las membranas de CRC resultan preferentes debido a su hidrofiliidad, así como por su estabilidad mecánica frente a la presión negativa. La estabilidad bajo condiciones básicas permite un lavado y almacenamiento completos y rápidos. La hidrofiliidad de la membrana de CRC minimiza el ensuciamiento por proteínas y simplifica el lavado de la membrana. La membrana preferentemente se reaccionan con el compuesto cargado reactivo en una solución acuosa. Las condiciones de reacción acuosa resultan ventajosas debido a que se evitan los compuestos orgánicos inflamables y se eliminan más fácil y completamente los compuestos solubles en solución acuosa de una membrana de CRC cargada destinada a la utilización en aplicaciones farmacéuticas. Las membranas de CRC se obtuvieron de Millipore, Corp. (Bedford, M.A.). Las membranas de PM 300 kD se denominaron PLCMK. Las membranas de PM 1.000 kD se denominaron PLCXK.

Los grupos de alcohol primario de los grupos de D-glucosa de la celulosa son las dianas para la derivatización debido a que pueden reaccionar sin socavar la integridad de la matriz de celulosa. Los alcoholes primarios (R-OH) reaccionan con haluros de alquilo (R'-X, en la que X es Br, por ejemplo), produciendo éteres (R-O-R'). En el presente ejemplo, se hizo reaccionar una membrana de CRC con bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio 2 molar (tal como se muestra en diagrama en la fig. 2A) en NaOH 0,1 N a temperatura ambiente durante la noche. Las membranas reaccionadas se lavaron en agua destilada y se utilizaron para la filtración de proteínas en NaOH 0,1 N a temperatura ambiente. Las membranas eran estables bajo estas condiciones durante por lo menos seis meses.

El ión de amonio cuaternario presenta una carga positiva en solución acuosa de aproximadamente pH 2 a pH 10, inclusive. Este intervalo de pH corresponde al intervalo de pH en el que la mayoría de proteínas se encuentran estructuralmente intactas o resultan recuperables a un estado activo, haciendo que la amina cuaternaria resulte útil como grupo cargado del compuesto cargado. Los haluros, tales como los iones bromuro, cloruro y yoduro, resultan grupos reactivos útiles debido a que son buenos grupos salientes para el ataque nucleofílico por el oxígeno del alcohol primario. Sin embargo, debe apreciarse que pueden utilizarse otros grupos aniónicos bien conocidos por los expertos ordinarios en la materia para facilitar la reacción.

La reacción del haluro de alquilo directamente con el alcohol primario de la celulosa resulta ventajosa debido a que es una reacción en una etapa. Este procedimiento también presenta la ventaja de evitar la necesidad de derivatizar primero la membrana con un grupo nucleofílico fuerte que puede no haber reaccionado por completo durante etapas posteriores o puede requerir reacciones adicionales para eliminar o para desactivar el nucleófilo añadido. Otra ventaja del procedimiento es que se encuentran disponibles comercialmente muchos haluros de alquilo. De esta manera, el procedimiento de preparación de membranas cargadas de la invención resulta rápido y convenientemente, ahorrando de esta manera tiempos y costes.

Se produjeron membranas cargadas negativamente utilizando un procedimiento similar. El compuesto reactivo era ácido 3-bromopropano sulfónico 2 molar en NaOH 0,1 N. La reacción se muestra en diagrama en la fig. 2B, y las condiciones de reacciones fueron las dadas a conocer anteriormente para el bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio. El grupo ácido sulfónico sigue cargado negativamente en un intervalo de pH que resulta útil para muchas separaciones de proteínas.

Con el fin de verificar que una membrana de CRC cargada positiva o negativamente se encontraba derivatizada uniformemente, las membranas se tiñeron con un pigmento con una carga contraria a la de la membrana sometida a ensayo. Se enjuagaron extensivamente en agua destilada membranas de CRC-O-bromuro de propiltrimetilamonio y se sumergieron en solución acuosa de rojo Ponceau. El pigmento cargado negativamente tiñó uniformemente la membrana cargada positivamente, pero no tiñó una membrana de control que había sido expuesta a NaOH 0,1 N sin el

bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio. De manera similar, las membranas de CRC-O-ácido propano sulfónico se enjuagaron extensivamente en agua destilada y se sumergieron en solución acuosa de azul de metileno. El pigmento cargado positivamente tiñó la membrana cargada negativamente, pero no tiñó la membrana de control, que no había sido expuesta a NaOH 0,1 N en ausencia de ácido 3-bromopropano sulfónico. De esta manera, las membranas resultaron uniforme y extensivamente derivatizadas por los haluros de alquilo en el presente ejemplo.

## Ejemplo 2

### *Modificación de la distribución de tamaño de poro de membrana*

Los poros de membrana se infiltran con compuestos cargados reactivos cuando factores estéricos, tales como el tamaño y la longitud del brazo líncor, y factores electrostáticos, tales como la repulsión de cargas, lo permiten. De esta manera, de acuerdo con la invención, los poros de membrana suficientemente grandes para permitir la infiltración de un compuesto cargado reactivo dado se derivatizan con el compuesto cargado de manera que el tamaño de la luz de poro se reduzca. La fig. 3 muestra un diagrama de un poro de membrana con iones de propiltrimetilamonio unidos covalentemente a la pared del poro y sobresaliente hacia el interior de la luz.

La longitud del brazo líncor controla el grado con el que sobresale el compuesto cargado hacia el interior de la luz y reduce su diámetro efectivo. La carga produce una región cargada positivamente de la que resultará excluida una proteína de carga similar. De esta manera, una proteína deseada con una carga total igual a la de la membrana derivatizada resulta repelida por la superficie de la membrana así como por los poros de la misma, mejorando de esta manera la retención de la proteína deseada. Las proteínas neutras tenderán a pasar a través de los poros de membrana cargados junto con el filtrado, no resultando ni atraídos ni repelidos por la superficie o los poros de la membrana.

## Ejemplo 3

### *Procedimientos de utilización de una membrana de CRC cargada para separar proteínas*

*Utilizando membranas convencionales, la permeabilidad se sacrifica para un cribado mejorado, o se sacrifica el cribado para una permeabilidad mejorada.* En general, a medida que se incrementa la permeabilidad de una membrana, se incrementa el coeficiente de cribado. Esto refleja el hecho de que más de la proteína que debe retenerse pasa a través de una membrana altamente permeable, haciendo que el procedimiento de filtración sea más rápido, pero resulta menos selectivo (presenta un coeficiente de cribado elevado), resultando en un rendimiento más bajo de proteína deseada y una separación menos completa. La fig. 4 es un gráfico que demuestra que las membranas de ultrafiltración (UF) convencionales sacrifican el cribado por una permeabilidad mejorada. Las membranas de UF de la fig. 4 se sometieron a ensayo utilizando un ensayo estandarizado con una mezcla de dextrano (ver, por ejemplo, Zeman y Zydney, *supra*, páginas 183-88). Las membranas sometidas a ensayo eran de Pall Filtron (celulosa, Omega<sup>TM</sup> (polisulfona con modificación hidrofílica), Alpha<sup>TM</sup> (polietersulfona modificada para reducir el ensuciamiento), y Nova<sup>TM</sup> (polietersulfona) y Millipore (celulosa regenerada (RC), Biomax<sup>TM</sup> con malla A, Biomax<sup>TM</sup> con malla B, y PES (polietersulfona)).

*Las membranas cargadas de la invención reducen el coeficiente de cribado para una permeabilidad dada en comparación con una membrana no cargada.* Mediante la modificación de la carga de una membrana no cargada, se resuelve el problema de sacrificar el cribado por la permeabilidad (o viceversa). Las membranas de la invención presentan un cribado drásticamente mejorado para una permeabilidad dada en comparación con la membrana no cargada de control.

La fig. 5 muestra la relación entre el flujo de filtrado (ml/min, eje x) y el cribado (eje y) para membranas no cargadas y cargadas con valores de corte de PM de 300 kD o de 1.000 kD. A medida que el flujo se incrementa, un factor que es proporcional a la permeabilidad de la membrana (ver Zeman y Zydney, *supra*, página 16), se incrementa el cribado. Sin embargo, al contrario que en las membranas convencionales, cuando se añade carga, se reduce el coeficiente de cribado para un valor de flujo dado. A un flujo relativamente elevado, de 8 ml/minuto (ver "a" en la fig. 5), una membrana de CRC cargada de 1.000 kD (CRC 1000+) o una membrana de CRC cargada de 300 kD (CRC 300+) presenta un coeficiente de cribado aproximadamente 10 veces más bajo que la membrana no cargada de control. A un flujo menor, de 5 ml/minuto (ver "b" en la fig. 5), el coeficiente de cribado se reduce aproximadamente en 100 veces en ambas membranas de CRC cargadas, de 1.000 kD y de 300 kD. En el presente ejemplo, el compuesto cargado añadido sobre la superficie y los poros de la membrana de CRC era el ion propiltrimetilamonio. Las membranas se prepararon tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. La proteína era rhuMAb HER2 bajo condiciones que producen que se encuentre cargada positivamente, al igual que la membrana CRC+. El coeficiente de cribado se calculó utilizando la concentración de rhuMAb HER2 (ng/ml) en la solución de alimentación (conocida) dividido por la concentración de rhuMAb HER2 en el filtrado (determinado mediante ELISA).

El dato en el punto "b" de la fig. 5 se recalculó y se representó en el gráfico para mostrar la relación entre la permeabilidad y el cribado en la fig. 6. Estos datos también muestran que, para una permeabilidad dada, el cribado se reduce en 100 veces para ambas membranas de CRC, de valores de corte de PM de 300 kD y de 1.000 kD. De esta manera, puede seleccionarse una permeabilidad óptima para permitir la rápida separación, mejorando grandemente (y no perjudicando) el coeficiente de cribado de la membrana, y permitiendo mejorar la separación y el rendimiento de la proteína deseada. Estas mejoras drásticas e inesperadas en las propiedades de la membrana resultan de la adición de compuestos cargados a la superficie y poros de la membrana.

## ES 2 267 552 T3

*Separación de una mezcla de proteínas de acuerdo con la invención.* Se separó una mezcla de proteínas, cada una con un pI diferente, utilizando las membranas cargadas de la invención. En un primer ejemplo, se separaron dos proteínas. RhuMAb HER2, la proteína deseada, presenta un pI de 8,9. La albúmina de suero bovino (BSA), una impureza, presenta un pI de 4,8. Las proteínas se mezclaron en un tampón de pH 4,5 provocando que rhuMAb HER2 presentase una carga positiva, y BSA fuese neutra. Para la separación se utilizó una membrana cargada positivamente de la invención, tal como una membrana de CRC-O-propiltrimetilamonio. Las proteínas y tampón se pusieron en contacto con la membrana cargada positivamente. De las dos proteínas, sólo BSA pasó a través de la membrana hacia el filtrado debido a que no resultó repelida por la superficie positiva o los poros de la membrana. La proteína deseada, rhuMAb HER2 resultó retenida corriente arriba de la membrana cargada positivamente.

Una estrategia relacionada resulta útil para retener una proteína, tal como BSA en el presente ejemplo, que presenta un pI de 4,8, mientras que el producto proteína deseado, pro ejemplo Fab (por ejemplo Fab anti-VEGF), con un pI de 8,1, puede pasar a través de una membrana, produciendo la separación de las dos proteínas de tamaño similar, en este ejemplo de 68 kD y 45 kD, respectivamente. La separación se lleva a cabo utilizando un tampón de pH 8, provocando de esta manera que Fab sea neutra. La mezcla de BSA y proteína Fab en tampón de pH 8 se pone en contacto con una membrana de la invención de CRC-O-ácido propanosulfónico (cargada negativamente a pH 8), permitiendo que la proteína de pI más elevado (Fab, pI 8,1) pase a través de la membrana hacia el filtrado y reteniendo la proteína de pI más bajo, cargada negativamente (BSA, pI 4,8) corriente arriba de la membrana cargada negativamente.

Puede resultar preferente un gradiente de pH sobre el cambio escalonado de pH indicado anteriormente, aunque se sigue una estrategia similar para la retención y eliminación selectivas de proteínas.

La especificación anteriormente expuesta se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no debe considerarse limitada en su alcance a los ejemplos proporcionados, debido a que estos son ilustrativos de determinados aspectos de la invención, y cualquier composición o procedimiento que resulten funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la presente invención. En efecto, diversas modificaciones de la invención además de aquéllas mostradas y descritas en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encontrarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una membrana de filtración cargada, comprendiendo el procedimiento:

5 poner en contacto una membrana precursora de celulosa con un compuesto cargado reactivo; y

hacer reaccionar un grupo hidroxilo de superficie sobre la membrana precursora con un grupo reactivo del compuesto cargado, de manera que el compuesto cargado se encuentre unido covalentemente a la membrana precursora,

10 en el que el compuesto cargado sobresale hacia el interior de la luz del poro de manera que se estrecha la distribución de tamaño de poro de la membrana respecto a la de la membrana precursora,

15 en el que, para la membrana cargada y para un soluto proteína con carga igual, se mejora el cribado de soluto en por lo menos 1,5 veces comparado con la membrana precursora, y

20 en la que, para una solución que comprende el soluto proteína y un solvente, la permeabilidad de la membrana es sustancialmente igual para el solvente que en la membrana precursora.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, comprendiendo el compuesto un brazo línker.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el brazo línker comprende un heteroátomo seleccionado de entre el grupo que consiste esencialmente de N, O, S y P.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el brazo línker se selecciona de entre el grupo que consiste esencialmente de una cadena alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, una cadena alquilo ramificada de 1 a 20 átomos de carbono, una estructura de anillo, un carbohidrato, un sacárido, un dextrano, y un aminoácido.

30 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la carga es positiva.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el compuesto comprende un grupo cargado seleccionado de entre el grupo que consiste esencialmente de una amina y un ion de amonio cuaternario.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la carga es negativa.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el compuesto comprende un grupo cargado seleccionado de entre el grupo que consiste esencialmente de un ácido, un ácido sulfónico, y un ácido carboxílico.

40 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la membrana es celulosa regenerada compuesta (CRC).

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el compuesto cargado unido covalentemente se encuentra unido mediante un enlace éter.

45 11. Membrana de filtración cargada obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Procedimiento para separar una proteína deseada de por lo menos una proteína de una mezcla de proteínas en una solución tamponada acuosa, comprendiendo el procedimiento:

50 alterar el pH de la solución de manera que la proteína deseada presente una carga neta y una proteína que debe separarse de dicha proteína sea neutral o presente una carga neta contraria a la carga neta de la proteína deseada;

55 poner en contacto la mezcla de proteínas con la membrana de filtración cargada según la reivindicación 11,

en el que la proteína deseada y la membrana presentan cargas netas iguales;

60 separar la proteína deseada de la proteína neutra y de la proteína de carga contraria mediante la retención de la proteína deseada corriente arriba de la membrana y la filtración de la proteína neutra o de carga contraria a través de la membrana;

repetir las etapas de modificación, puesta en contacto y separación hasta separar la proteína deseada de un número seleccionado de proteínas de la mezcla.

65 13. Procedimiento para separar una proteína deseada de por lo menos una proteína de una mezcla de proteínas en una solución tamponada acuosa, comprendiendo el procedimiento:

## ES 2 267 552 T3

alterar el pH de la solución de manera que la proteína deseada sea neutra y una proteína que debe separarse de dicha proteína presente una carga neta igual a la carga neta de la membrana de filtración;

5

poner en contacto la mezcla de proteínas con la membrana de filtración cargada según la reivindicación 11;

separar la proteína deseada de la proteína cargada mediante la retención de la proteína cargada corriente arriba de la membrana y filtrar la proteína deseada a través de la membrana;

10

repetir las etapas de modificación, puesta en contacto y separación hasta separar la proteína deseada de un número seleccionado de proteínas de la mezcla.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

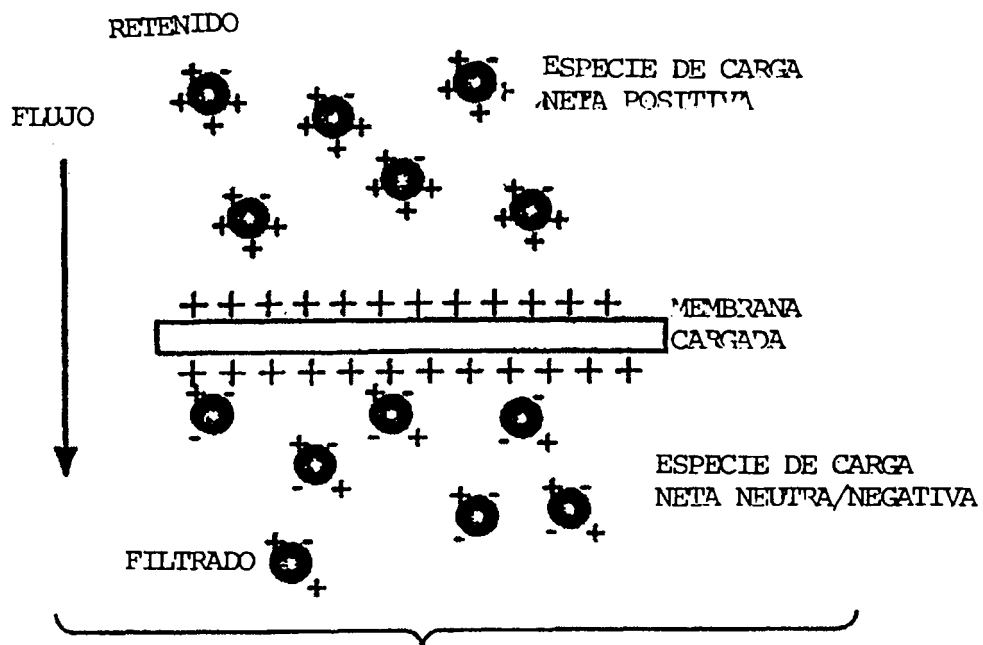


FIG.\_1

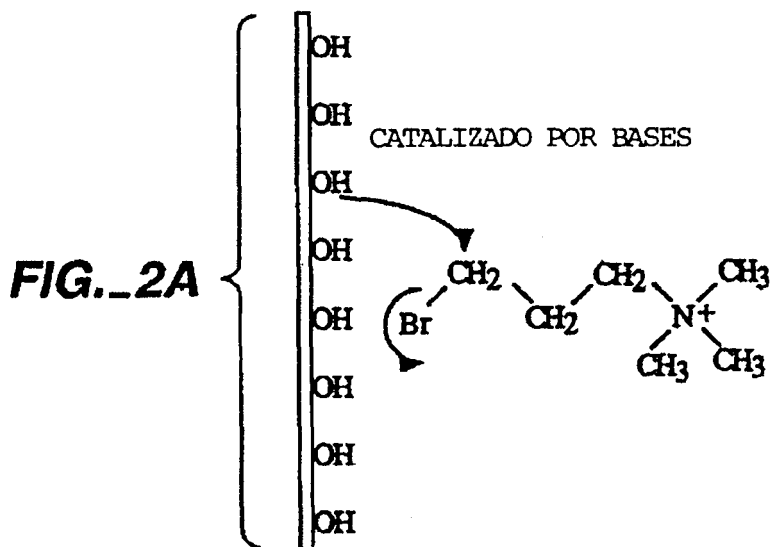
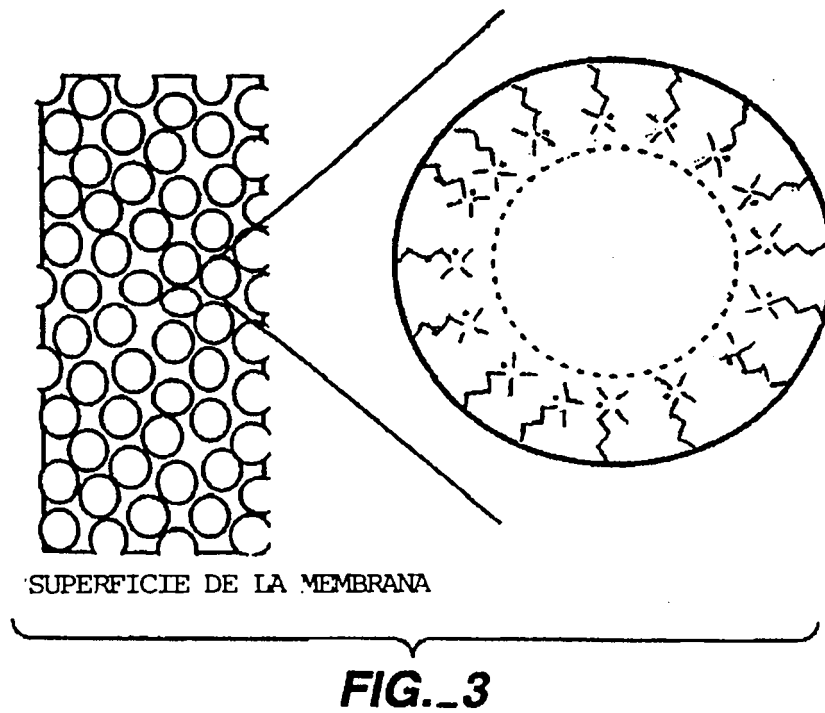
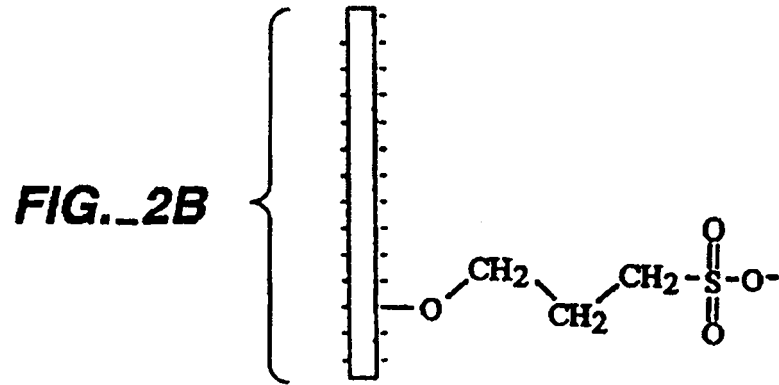
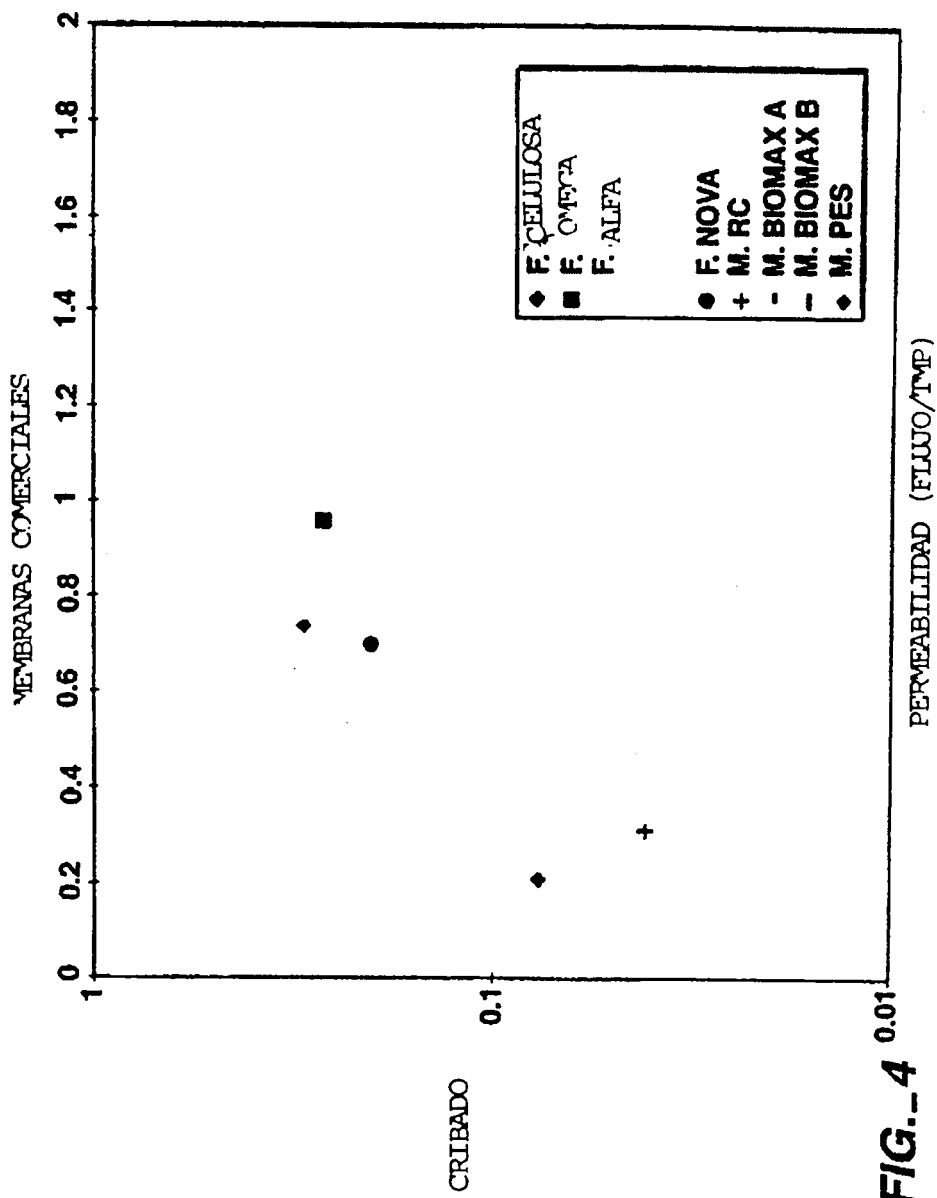


FIG.\_2A





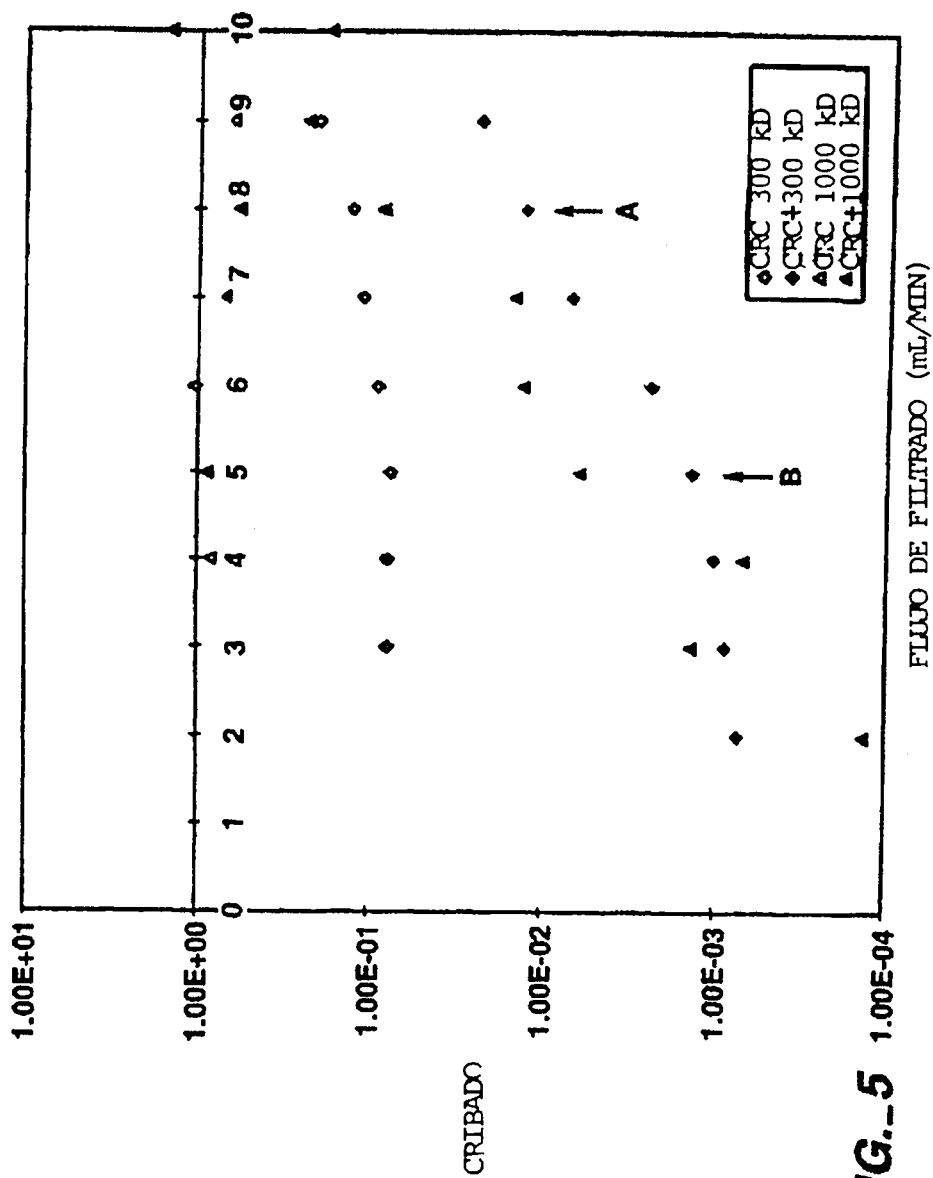


FIG.-5

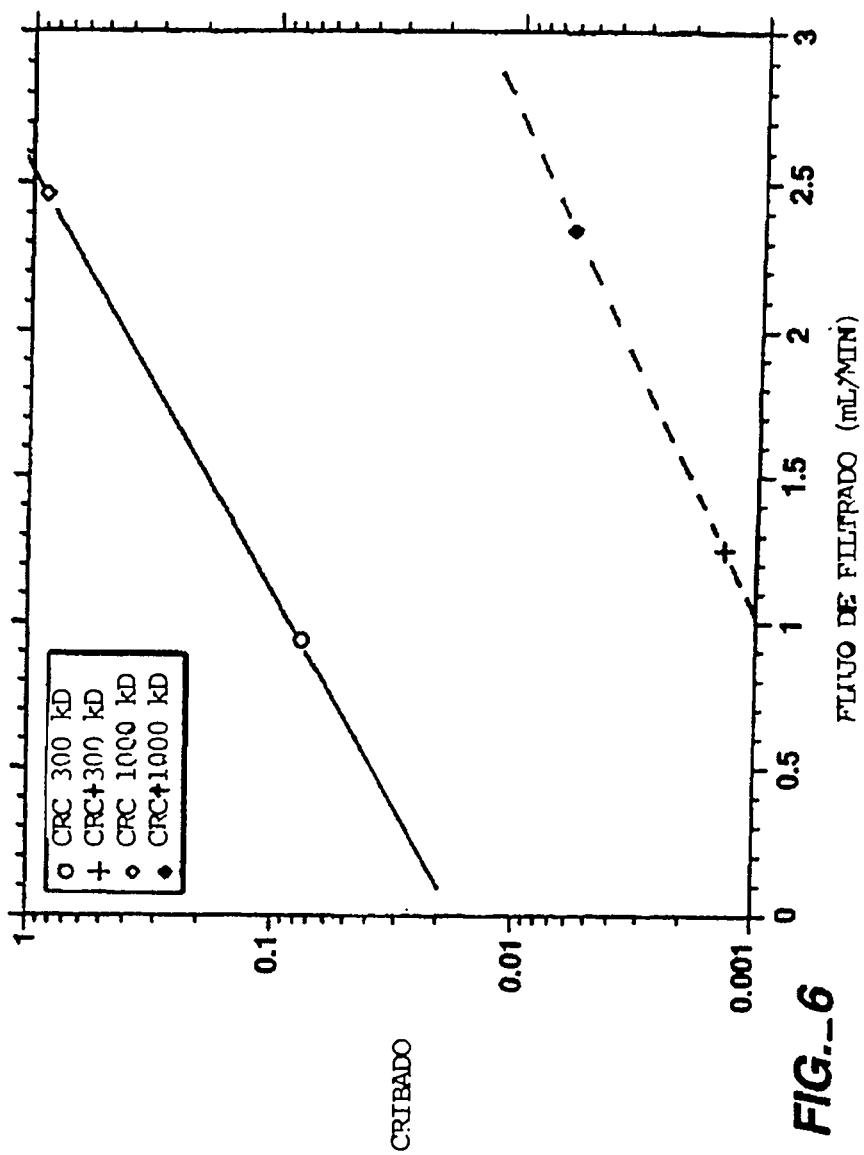


FIG.-6