



(10) **DE 20 2008 017 854 U1** 2010.09.23

(12) **Gebrauchsmusterschrift**

(21) Aktenzeichen: **20 2008 017 854.1**
(22) Anmeldetag: **13.08.2008**
(67) aus Patentanmeldung: **EP 08 16 2316.7**
(47) Eintragungstag: **19.08.2010**
(43) Bekanntmachung im Patentblatt: **23.09.2010**

(51) Int Cl.⁸: **B01J 20/285** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
964653 **14.08.2007** **US**
070708 **25.03.2008** **US**

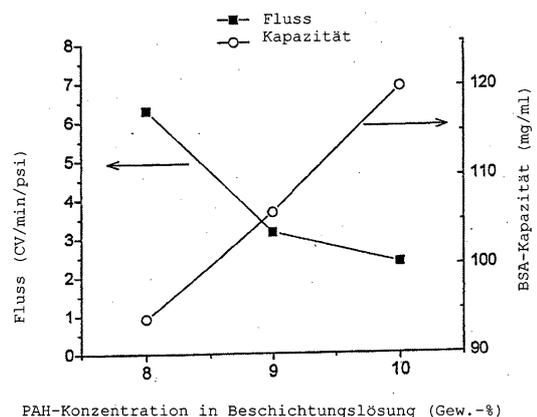
(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:
Millipore Corp., Billerica, Mass., US

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Mittel zur Ionenaustausch-Membranchromatographie auf der Basis von primären polymerischen Aminen, Sorptionsvorrichtung mit diesem Mittel, Chromatographieverfahren und Reinigungsverfahren unter dessen Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Poröses Sorptionsmedium, das ein Substrat mit einer ersten äußeren Seite und einer zweiten äußeren Seite, wobei beide Seiten porös sind, und einer porösen Schicht zwischen ihnen umfasst, wobei das Substrat Sorptionsmaterial besitzt, das die feste Matrix des Substrats und die erste und zweite äußeren Oberflächen im Wesentlichen bedeckt, wobei das Sorptionsmaterial vernetztes Polymer mit angebondenen primären Amingruppen umfasst.



Beschreibung

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der vorläufigen US-Anmeldung Nr. 60/964,653, eingereicht am 14. August 2007, und der vorläufigen US-Anmeldung Nr. 61/070,708, eingereicht am 25. März 2008, auf deren Offenbarungen hierin Bezug genommen wird.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Diese Erfindung betrifft ein Anionenaustauschchromatographiemedium auf Basis von polymeren primären Aminen, einen Anionenaustauschsorber, der dieses Medium enthält, und ein Chromatographieschema, das den Sorber enthält. Absorption bedeutet die Aufnahme von Substanz durch Permeation in das Innere eines Absorptionsmaterials. Adsorption bezeichnet die Bewegung von Molekülen aus einer Volumenphase auf die Oberfläche eines Adsorptionsmediums. Sorption ist ein allgemeiner Begriff, der sowohl Adsorption als auch Absorption einschließt. In gleicher Weise bezieht sich ein Sorptionsmaterial oder Sorptionsgefäß, das hierin als Sorber bezeichnet wird, auf ein Material oder Gefäß, das entweder ad- oder absorbiert oder sowohl ad- als auch absorbiert. Das Medium ist insbesondere als poröser Membransorber verwendbar, der in einem Durchflusselement verwendet wird, und insbesondere in einem Element, das frei von einem separatem Außengehäuse ist.

[0003] Starke Anionenaustauscher, wie zum Beispiel solche auf Basis von quartären Ammoniumionen, werden in Stromabwärts-Verfahren als Feinstreinigungsmedien zum Einfangen von negativ geladenen großen Verunreinigungen wie Endotoxinen, Viren, Nukleinsäuren und Wirtszellproteinen (host cell Proteins, HCP) verwendet, die in Fluiden wie zum Beispiel biologischen Fluiden vorliegen, insbesondere Lösungen von hergestellten Biotherapeutika.

[0004] Traditionell wurden Anionenaustauscher im Kügelchenformat angeboten und verwendet, zum Beispiel Q Sepharose®, die von GE Healthcare Bio-Sciences AB erhältlich ist. Allerdings erfordern Durchflussbeschränkungen Kügelchen-basierter Systeme Säulen mit großem Volumen, um Verunreinigungen wirksam einzufangen.

[0005] Bei der Kügelchen-basierten Chromatographie befindet sich der größte Teil der zur Adsorption verfügbaren Oberfläche im Inneren der Kügelchen. Folglich ist das Trennungsverfahren von Natur aus langsam, da die Geschwindigkeit des Massentransports typischerweise durch Porendiffusion kontrolliert wird. Um diesen Diffusionswiderstand zu minimieren und begleitend die dynamische Bindungskapazität zu maximieren, können Kügelchen geringen Durchmessers eingesetzt werden. Allerdings ist der Preis der Verwendung von Kügelchen kleinen Durchmessers ein erhöhter Säulendruckabfall. Folglich ist die Optimierung von präparativen chromatographischen Trennungen häufig mit einem Kompromiss zwischen Effizienz/dynamischer Kapazität (kleine Kügelchen bevorzugt) und Säulendruckabfall (große Kügelchen bevorzugt) verbunden.

[0006] Im Gegensatz dazu sind in Membran-basierten Chromatographiesystemen (die auch als Membransorber bezeichnet werden) die Liganden direkt an die konvektiven Membranporen gebunden und beseitigen dabei die Wirkungen von interner Porendiffusion auf Massentransport. Darüber hinaus kann die Verwendung von mikroporösen Membransubstraten mit einer engen Membranporengrößenverteilung gekoppelt mit wirksamen Flussverteilern axiale Streuung minimieren und die gleichmäßige Nutzung sämtlicher aktiver Stellen bereitstellen. Folglich können die Massentransferegeschwindigkeiten von Membransorbermedien eine Größenordnung höher sein als jene von Standardkügelchen-basierten Chromatographiemedien, was sowohl eine hohe Effizienz als auch Hochflusstrennungen erlaubt. Da einzelne oder sogar gestapelte Membrane verglichen mit Säulen, die mit Kügelchen-basiertem Medium gepackt sind, sehr dünn sind, werden entlang des chromatographischen Betts reduzierte Druckabfälle festgestellt, was erhöhte Fließgeschwindigkeiten und Produktivitäten erlaubt. Die erforderliche Bindungskapazität wird durch die Verwendung von Membranen mit ausreichender innerer Oberfläche erreicht, was Gerätekonfigurationen mit sehr großen Verhältnissen von Durchmesser zu Höhe (D/H) hervorbringt.

[0007] Richtig konstruierte Membransorber besitzen chromatographische Effektivitäten, die 10 bis 100 mal besser sind als präparative Kügelchen-basierte Standardharze. Um mit einem Membransorber den gleichen Trennungsgrad zu erreichen, kann folglich eine zehnfach geringere Betthöhe eingesetzt werden. Bettlängen von 1 bis 5 mm sind für Membransorber Standard, verglichen mit Betthöhen von 10 bis 30 cm für Kügelchen-basierte Systeme. Wegen der extremen Seitenverhältnisse der Säulen, die für Membransorber mit großem Volumen erforderlich sind, ist die Gerätekonstruktion kritisch. Um die inhärenten Leistungsvorteile beizubehalten, die mit Membransorbern verbunden sind, sind passende Einlass- und Auslassverteiler erforderlich,

um das verfügbare Membranvolumen effizient und wirksam einzusetzen. Die Membransorbertechnologie ist für diese Anwendung ideal geeignet. Gängige handelsübliche Membransorber leiden allerdings an verschiedenen Nachteilen, einschließlich einer geringen Bindungsstärke, Schwierigkeiten beim Entfernen von Viren, Endotoxinen und Nukleinsäuren.

[0008] Ein Membransorber ist ein hochporöser Verbundträger, der die Fähigkeit besitzt, einige Komponenten einer Lösung zu entfernen (ad- und/oder absorbieren), wenn letztere durch seine Poren fließt. Die Eigenschaften des Membransorbers und seine Fähigkeit, bei der erforderlichen Anwendung gut zu funktionieren, hängen von der porösen Struktur des Mediums (Gerüsts) sowie von der Natur der Oberfläche ab, die der Lösung ausgesetzt ist. Typischerweise wird das poröse Medium zuerst aus einem Polymer gebildet, das (sich) in Wasser nicht löst oder nicht quillt und akzeptable mechanische Eigenschaften besitzt. Vorzugsweise ist das poröse Medium eine poröse Membranschicht, die durch Phasenseparationsverfahren hergestellt wird, die aus dem Stand der Technik wohlbekannt sind. Siehe zum Beispiel Zeman LJ, Zydney AL, *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, New York: Marcel Dekker, 1996. Hohlfasern- und Röhrenmembranen sind ebenso akzeptable Gerüste. Eine separate Verfahrensstufe ist gewöhnlich erforderlich, um die äußeren und facialen Oberflächen und die inneren Porenoberflächen der gebildeten porösen Struktur zu modifizieren, um die erforderlichen Adsorptionseigenschaften zu vermitteln. Da die Membranstruktur häufig aus hydrophobem Polymer gebildet wird, ist ein weiterer Zweck der Oberflächenmodifizierungsstufe ferner, die Oberflächen hydrophil oder mit Wasser benetzbar zu machen.

[0009] Es gibt etliche Methoden, die äußeren und facialen Oberflächen und die inneren Porenoberflächen einer Membran zu modifizieren. Fachmänner werden beispielhafte Verfahren leicht erkennen, die Adsorption, Plasmaoxidation, in-situ freie radikalische Polymerisation, Pfropfen und Beschichten einschließen. Die Mehrheit dieser Verfahren führt zur Bildung von Monoschicht-artigen Strukturen auf der Membranoberfläche, die das Ziel, sie hydrophil zu machen, meistens erreichen, jedoch keine akzeptablen Adsorptionseigenschaften vermitteln, zum Beispiel hohe Kapazität für das Adsorbat. Die Kapazität ist als die Menge (Gewicht) des Adsorbats definiert, die von einem gegebenen Volumen des Mediums zurückgehalten werden kann. Solange sämtliche Adsorption an der Membranoberfläche erfolgt, wird die Kapazität durch die Membranoberfläche begrenzt. Durch ihre Natur besitzen mikroporöse Membranen verglichen mit Chromatographiekügelchen eine geringere Oberfläche. Eine Möglichkeit, die Oberfläche zu erhöhen, ist die Porengröße zu reduzieren, was offensichtlich zu bedeutenden Verlusten des Flusses führt. Zum Beispiel beträgt die maximale (Monoschicht-)Adsorption von Protein an einer 0,65 µm Polyethylen-Membran (Entegris Corp, Billerica MA) etwa 20 mg/ml, ungeachtet der Art der Oberflächenwechselwirkung. Dies ist bedeutend weniger als zum Beispiel Agarose-Chromatographiekügelchen, mit einer typischen Kapazität von etwa 80 mg/ml.

[0010] Die Art der Oberflächenwechselwirkungen, die die Adsorption treiben, ist durch die bestimmte Anwendung definiert, in der ein gegebenes Membransorberprodukt verwendet wird. Derzeit besteht ein Bedarf an einem Sorber mit hoher Kapazität und hoher Affinität, der Viren, Nukleinsäuren, Endotoxine und Wirtszellproteine (HCPs) aus einer Lösung von monoklonalen Antikörpern (MABs) entfernt. Diese Verunreinigungen neigen dazu, einen niedrigeren isoelektrischen Punkt als die MABs zu besitzen, was bedeutet, dass sie bei einem bestimmten pH-Wert negativ geladen sind, während der MAB positiv geladen ist. Ein Anionenaustauscher, d. h. ein Medium, das positive Ladung trägt und Anionen anzieht, ist erforderlich, um diese Verunreinigungen zu entfernen. Etliche chemische Einheiten tragen in wässriger Lösung positive Ladungen, einschließlich primäre, sekundäre und tertiäre Amine sowie quartäre Ammoniumsalze. Die Amine sind bei einem pH-Wert unterhalb von 11 positiv geladen, während die Ammoniumsalze die positive Ladung bei jedem pH-Wert tragen, so dass diese Gruppen gängigerweise schwache und starke Anionenaustauscher genannt werden.

[0011] Anionenaustauschmembranen besitzen mehrere positiv geladene Bindungsstellen, die verschiedene Verunreinigungen und Schadstoffe anziehen und binden. Die Menge an Verunreinigungen, die potentiell entfernt werden kann, ist eine Funktion der Konzentration dieser Bindungsstellen auf der Membran und die chemische Natur des Liganden (sowie die Konzentration dieser Liganden) ist für die Bindungsstärke für die verschiedenen Verunreinigungen verantwortlich. Eine hohe Bindungsstärke ist ein Schlüsselmerkmal zur Verbesserung der Entfernung von Verunreinigungen, zum Beispiel Wirtszellproteine. Die Bindungsstärke (SB) steht im Verhältnis zu der Ionenstärke von Lösungen, die erforderlich ist, um die gebundenen Verunreinigungen zu eluieren. Die SB eines Membransorbers (gemessen in Leitfähigkeitseinheiten, mS/cm) wird wie folgt bestimmt. Zuerst wird eine geringe Menge von Adsorbatlösung durch den Membransorber gedrückt, so dass das Adsorbat an den Membransorber bindet. Zweitens wird der Membransorber mit steigendem Gradient an anorganischem Salz wie zum Beispiel Natriumchlorid eluiert. Die minimale Leitfähigkeit der Elutionslösung, die erforderlich ist, um das Adsorbat herauszuspülen, wird registriert und als die SB des Membransorbers definiert. Durch Erhöhen der Bindungsstärke des Sorbers können negativ geladene Verunreinigungen dazu gebracht

werden, irreversibel an den Membransorber zu binden, was die Effizienz der Entfernung wesentlich erhöht. Dies ist besonders wichtig für die Entfernung von schwach gebundenen Populationen von Wirtszellproteinen aus einem Antikörperstrom.

[0012] Herkömmliche Durchfluss-Anionenaustauscher enthalten typischerweise einen quartären Ammoniumliganden, der für das Anziehen und Binden negativ geladener Verunreinigungen verantwortlich ist, während er die positiv geladenen Produktmoleküle abstößt. Die herrschende Meinung diktiert, dass ein starker Anionenaustauscher, d. h. einer, der bei sämtlichen pH-Werten eine positive Ladung besitzt, erforderlich ist, um Verunreinigungen durch Ladungswechselwirkung stark zu binden. Die vorliegende Erfindung zeigt etwas anderes. Die Erfinder haben festgestellt, dass polymere primäre Amine, vorzugsweise aliphatische Polymere mit einem primären Amin, das kovalent an das Polymergrundgerüst gebunden ist, bevorzugter mit einem primären Amin, das durch mindestens eine aliphatische Gruppe, vorzugsweise eine Methylengruppe, kovalent an das Polymergrundgerüst gebunden ist, negativ geladene Verunreinigungen außergewöhnlich stark binden und somit zum Hervorbringen des adsorbierenden Hydrogels auf der Oberfläche eines Membransorbers die bevorzugte Klasse von Materialien sind.

[0013] Monoklonale Antikörper gewinnen als therapeutische und diagnostische Wirkstoffe weiterhin an Bedeutung. Das Verfahren des Rasterns von Hybridoma-Bibliotheken für Kandidaten-mABs ist sowohl zeitaufwändig als auch arbeitsintensiv. Wenn eine Hybridoma-Zelllinie, die einen geeigneten mAB ausdrückt, erst einmal erstellt ist, muss eine Reinigungsmethode entwickelt werden, um ausreichend mAB für die weitere Charakterisierung herzustellen. Ein traditionelles Verfahren zum Reinigen schließt das Verwenden von Protein A- oder Protein G-Affinitätschromatographie ein. Der gereinigte Antikörper wird entsalzt und mittels Dialyse in einen biologischen Puffer ausgetauscht. Das gesamte Verfahren erfordert typischerweise mehrere Tage und kann besonders beschwerlich sein, wenn mehrere mABs nebeneinander ausgewertet werden müssen.

[0014] Das US-Patent Nr. 6,090,288 lehrt die Herstellung von aminogruppenhaltigen Chromatographiemedien zur Trennung von Peptiden und Nukleinsäuren. Es ist offenbart, dass für die Eluierung von Proteinen von schwachen Anionenaustauschliganden vs. starken eine höhere Ionenstärke erforderlich ist. Das besondere strukturelle Merkmal des offenbarten Auftrennungsträgers ist, dass „es bei einer Entfernung von 2 oder 3 Atomen weg von einem Aminostickstoff eine Hydroxylgruppe oder eine primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe gibt“. Wir zeigen hierin zum Beispiel, dass eine lose vernetzte Beschichtung von reinem Polyallylaminpolymer keine zusätzlichen Gruppen erfordert, um eine höhere Stärke der Proteinbindung zu fördern.

[0015] Das US-Patent Nr. 5,304,638 lehrt die Verwendung eines Proteintrennungsmediums, das eine wasserlösliche Matrix umfasst, die eine Vielzahl von Polyamingruppierungen trägt. Eines der Beispiele zeigt das Herstellen eines Polyallylaminoberflächenmodifizierten Agarose-Chromatographiegels. Allerdings erkennen die Erfinder von 5,304,638 nicht die Bedeutung der Verwendung von primären Aminen vs. sekundären und tertiären Aminen. In Bezug auf das Kontrollieren der Beschichtungsdicke, um die Sorption zu optimieren oder die Beschichtung zur Stabilität zu vernetzen, wird kein Versuch unternommen oder beschrieben. Sie betonen, dass die bevorzugte Anzahl an Kohlenstoffatomen zwischen Paaren von Stickstoffatomen nicht mehr als 3 beträgt. Sie führen eine empirische Funktion Q ein, die auf Basis der Struktur der Polyamingruppierung und des pH-Werts kalkuliert ist und einen bevorzugten Wert von mindestens 1,5 besitzt. In Polyallylamin gibt es 5 Kohlenstoffatome zwischen den nächsten Stickstoffatomen und die Q-Funktion dafür wäre nahe 0,1.

[0016] Das U.S.-Patent Nr. 5,547,576 lehrt das Herstellen einer porösen Membran, die eine immobilisierte Polyaminbeschichtung besitzt und verwendet werden könnte, um Viren aus wässriger Lösung zu entfernen. Die Herstellung der Beschichtung schließt zuerst das Pfropfen eines Radikals auf die Oberfläche der Membran und dann das Reagieren des Radikals mit einer Polyaminverbindung ein. Pfropfmodifizierungen sind wegen ihrer inhärenten Komplexität häufig unpraktisch: sie sind empfindlich gegenüber dem bestimmten Substrat, auf das ein Radikal gepfropft wird, und ihre Implementierung in einer Fertigungsumgebung kann teuer sein. Dieses Verfahren leidet auch an den strukturellen Defiziten, die bezüglich 5,304,638 diskutiert wurden.

[0017] Alle drei dieser Patente, 6,090,288, 5,304,638 und 5,547,576, erkennen nicht die Bedeutung der Kontrolle der Dicke der Polyaminbeschichtung oder den Grad der Polymernetzung innerhalb der Beschichtung. Sie beruhen sämtlich auf einer chemischen Reaktion einer aminhaltigen Verbindung mit einer reaktiven Gruppe, die auf der Oberfläche kovalent immobilisiert wurde, entweder durch Pfropfen oder direkte Reaktion. Am Ende einer beliebigen solchen Prozedur ist man im Wesentlichen auf eine Monoschicht-artige aminhaltige Beschichtung beschränkt. Eine hohe Sorptionskapazität dieser Membrane kann nur durch Erhöhen der Oberfläche erreicht werden, wie es bei Agarose-Chromatographiekügelchen der Fall ist. Die vorliegende Erfindung lehrt, dass eine hohe Sorptionskapazität durch Aufbau einer relativ dicken Schicht von lose vernetzter Po-

lymerschicht auf der Membranoberfläche erreicht wird, eine völlig unterschiedliche Vorgehensweise gegenüber all jenen, die im Stand der Technik gelehrt werden.

[0018] Dementsprechend wäre es wünschenswert, ein Medium und einen Durchflussanionenaustauscher bereitzustellen, der ein solches Medium einschließt, die eine starke Bindung von Verunreinigungen bieten und nicht an den Mängeln des Standes der Technik leiden. Ein solcher Austauscher ist besonders nützlich bei der Reinigung von monoklonalen Antikörpern eines Zellkulturmediums unter Verwendung eines Chromatographieschemas, wenn er einer Affinitätschromatographiesäule nachgeschaltet platziert ist, wahlweise gefolgt von einer oder mehreren Feinstreinigungsstufen, die zum Beispiel mit einer Kationenaustauschsäule durchgeführt werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Die Probleme des Standes der Technik wurden durch die vorliegende Erfindung überwunden, die Medien und Geräte wie zum Beispiel Anionenaustauscher bereitstellt, die solche Medien einschließen, wobei das Medium eine Membran mit einer Oberfläche ist, die mit Polymer wie zum Beispiel Polyallylamin beschichtet ist. Die resultierende Membran bietet überraschenderweise eine stärkere Bindung von Proteinverunreinigungen und eine bessere Entfernung von Wirtszellproteinen aus biologischen Proben als herkömmliche Liganden auf Basis von quartären Ammoniumsalzen, einschließlich Trimethylammoniumliganden.

[0020] Beschrieben wird ein Verfahren zur wesentlichen Erhöhung der Sorptionskapazität von mikroporösen Membranen. Anstelle des Modifizierens der Oberfläche der Membran in einer Monoschichtartigen Weise werden die gesamten äußeren und inneren Porenoberflächen mit einem lose vernetzten Hydrogel beschichtet. Die feuchte (gequollene) Dicke dieses Hydrogels beträgt etwa 50 bis 100 nm, was ausreicht, um mehrere Schichten von Proteinmolekülen aufzunehmen. Somit wird die Adsorptionskapazität einer mikroporösen Membran von etwa 20 mg/ml auf 80 bis 100 mg/ml angehoben. Die Art der Wechselwirkungen, die die Adsorption treiben, ist durch die spezifische Anwendung definiert, in der ein gegebenes Membransorberprodukt verwendet wird. Derzeit gibt es ein Bedarf an einem Sorber mit hoher Kapazität und hoher Affinität, der Viren, Nukleinsäuren, Endotoxine und Wirtszellproteine (HCPs) aus biologischen Proben wie zum Beispiel Lösungen von monoklonalen Antikörpern (MABs) entfernt. Etliche chemische Einheiten tragen in wässriger Lösung positive Ladung, einschließlich primäre, sekundäre und tertiäre Amine sowie quartäre Ammoniumsalze. Die Amine sind bei einem pH-Wert unterhalb von 11 positiv geladen, während die Ammoniumsalze die positive Ladung bei jedem pH-Wert tragen, so dass diese Gruppen schwache bzw. starke Ionenaustauscher genannt werden. Die Erfinder erkannten, dass polymere primäre Amine, vorzugsweise aliphatische Polymere mit primärem Amin, das kovalent an das Polymergrundgerüst gebunden ist, noch bevorzugter mit primärem Amin, das durch mindestens eine aliphatische Gruppe, vorzugsweise eine Methylengruppe, kovalent an das Polymergrundgerüst gebunden ist, negativ geladene Verunreinigungen außergewöhnlich stark binden und somit zum Hervorbringen des adsorptiven Hydrogels auf der Oberfläche eines Membransorbers die bevorzugte Klasse von Materialien sind.

[0021] Ebenso beschrieben wird ein Chromatographieschema und -verfahren zum Reinigen monoklonaler Antikörper, bei dem der Anionenaustauschsorber einer Affinitätssäule (wie zum Beispiel einer Protein A- oder Protein G-Affinitätssäule) und wahlweise einem oder mehreren Feinstreinigungsgeräten wie zum Beispiel Kationenaustauschsäulen, oder gerade einer Kationenaustauschsäule, nachgeschaltet platziert ist. Im Hinblick auf die Natur des Mediums in dem beschriebenen Anionenaustauschsorber ist eine geringe oder keine Verdünnung des Kationenaustauscherpools (oder Affinitätssäulenaustauschpools, wo kein Kationenaustauscher verwendet wird) erforderlich, um die Leitfähigkeit der Probe zu verringern, weil das vorliegende Sorbermedium bei höheren Ionenstärken arbeiten kann. Der Sorber funktioniert gut bei stark bindenden Wirtszellproteinen und anderen negativ geladenen Verunreinigungen in biologischen Proben, sogar bei Leitfähigkeiten, die 15 mS/cm nahekommen und bei relativ hohem pH.

[0022] Wie bereits diskutiert, wird wegen des konvektiven Flusses des Membransorbers verglichen mit dem diffusen Fluss von Kügelchen-basierten Sorbern eine relativ hohe Gerätepermeabilität erzielt, ohne Bindungskapazität zu opfern.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] Fig. 1A ist ein Schaubild des Wasserflusses und der BSA-Kapazität von 1 mm Membransorbersäulen, die aus PAH hergestellt sind, das mit 0,5% PEG-DGE vernetzt ist;

[0024] Fig. 1B ist ein Schaubild des Wasserflusses und der BSA-Kapazität von 1 mm Membransorbersäulen, die mit 9 Gew.-% PAH hergestellt sind, das mit PEG-DGE vernetzt ist; und

[0025] Fig. 2 ist ein Schaubild der BSA-Kapazität eines Membransorbers in der freien Basenform und der Sulfamationenform in dem beschleunigten Lagerstabilitätstest.

Detaillierte Beschreibung bestimmter Ausführungsformen

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft ein poröses chromatographisches oder Sorptionsmedium mit einer porösen polymeren Beschichtung, die auf einem porösen selbsttragenden Substrat gebildet ist, Anionenaustauscher, die solche Medium einschließen, Reinigungsschemata, die den Sorber einschließen, und Reinigungsverfahren. Der Träger ist insbesondere für die zuverlässige Entfernung von Verunreinigungen geringer Größe von hergestellten Biotherapeutika, wie zum Beispiel monoklonalen Antikörpern auf eine Weise geeignet, die sich gut in bestehende Downstream-Reinigungsverfahren integriert. Typische Verunreinigungen schließen DNA, Endotoxin, HDP und Viren ein. Das Medium funktioniert gut bei hoher Salzkonzentration und hoher Leitfähigkeit (hoher Affinität) und entfernt sogar unter solchen Bedingungen wirksam Viren. Eine hohe Bindungskapazität wird ohne Opferung von Gerätepermeabilität erreicht. Tatsächlich können abhängig von den Eigenschaften der Beschichtungen, die durch die hierin beschriebenen Verfahren hergestellt werden, Nukleinsäurenbindungskapazitäten von größer als etwa 5 mg/ml oder größer als etwa 25 mg/ml oder größer als etwa 35 bis 40 mg/ml erreicht werden. Die Menge des Anionenaustauschersorbers ist viel geringer als jene für ein vergleichbares Kugelchen-basiertes Verfahren, da große Verdünnungen der Probe, die auf das Sorbermedium aufgetragen wird, nicht weiter erforderlich sind.

[0027] Das poröse Substrat besitzt zwei Oberflächen, die mit der geometrischen oder physikalischen Struktur des Substrates verbunden sind. Eine Schicht besitzt eine Deck- und Grundfläche oder eine erste und eine zweite Oberfläche. Diese werden üblicherweise „Seiten“ genannt. Bei der Verwendung fließt Fluid von einer Seite (Oberfläche) durch das Substrat zu der und durch die andere Seite (Oberfläche). Für Hohlfasern und Röhrenmembranen gibt es eine Innen- und eine Außenoberfläche. Der Fluss verläuft vom Inneren zum Äußeren oder umgekehrt, in Abhängigkeit von der Konstruktion und der Verwendung.

[0028] Die Schichtdimension zwischen den beiden Oberflächen ist porös. Dieser poröse Bereich besitzt eine Oberfläche, die mit den Poren verbunden ist. Um Verwirrungen bezüglich der Begriffe „Oberfläche“, „Oberflächen“ oder ähnlicher Verwendungen zu vermeiden, beziehen sich die Erfinder auf die geometrischen Oberflächen als äußere oder faciale Oberflächen oder als Seiten. Die mit den Poren verbundene Oberfläche wird als innere oder poröse Oberfläche bezeichnet.

[0029] Poröse Materialien umfassen die Poren, die Hohlräume sind, und die feste Matrix oder das feste Gerüst, die bzw. das die physikalische Ausführungsform des Materials darstellt. Zum Beispiel stellen in einem nicht gewebten Gewebe die zufällig orientierten Fasern die Matrix dar und geben dem Gewebe seine Form. In polymeren mikroporösen Membranen stellt das phasenseparierte Polymer die Matrix dar. Hierin diskutieren die Erfinder das Beschichten oder Bedecken der Oberfläche des Mediums. Die Erfinder meinen damit, dass die inneren und äußeren Oberflächen so beschichtet sind, dass sie die Poren nicht vollständig verstopfen, d. h. einen wesentlichen Anteil der Struktur für Konvektionsströmung erhalten. Insbesondere bedeutet Beschichten oder Bedecken für die innere Oberfläche, dass die Matrix beschichtet oder bedeckt ist, wobei ein wesentlicher Anteil der Poren offen gelassen wird.

[0030] Absorption bezieht sich auf die Aufnahme von Substanz durch Permeation in das Innere des Adsorptionsmaterials. Adsorption bezieht sich auf die Bewegung von Molekülen aus einer Volumenphase auf die Oberfläche von Adsorptionsmedien. Sorption ist ein allgemeiner Begriff, der sowohl Adsorption als auch Absorption einschließt. In gleicher Weise bezieht sich Sorptionsmaterial oder ein Sorptionsgerät, das hierin als Sorber bezeichnet wird, auf Material oder ein Gerät, das sowohl ad- als auch absorbiert.

[0031] Das poröse Substrat fungiert als unterstützendes Gerüst für das adsorbierende Hydrogel. Das Substrat sollte der Bearbeitung und Erzeugung eines robusten und integralen Geräts zugänglich sein. Die Porenstruktur sollte für eine gleichmäßige Flussverteilung, einen hohen Fluss und eine große Oberfläche sorgen. Das Substrat kann eine Faser, eine Schicht wie zum Beispiel ein gewebter Stoff, ein Vlies, eine Matte, ein Filz oder eine Membran sein. Vorzugsweise ist das Substrat eine Schicht, die aus gewebtem oder nicht gewebtem Stoff oder einer Membran gebildet ist.

[0032] Fasern können eine beliebige Länge bzw. einen beliebigen Durchmesser besitzen und können hohl

oder fest sein. Sie sind nicht als Substrat verbunden (obwohl sie nach dem Aufbringen der Beschichtung in eine einheitliche Struktur überführt werden können), sondern sind einzelne diskrete Einheiten. Sie können in Form einer ununterbrochenen Länge wie zum Beispiel eines Fadens oder eines Monofilaments von unbestimmter Länge vorliegen oder sie können in kürzere einzelne Fasern überführt werden, die durch Schneiden von faserartigen Materialien wie nicht gewebten oder gewebten Stoffen bzw. Schneiden der Fasern durchgehender Länge in einzelne Stücke hergestellt werden, durch ein Kristallwachstumsverfahren gebildet werden und dergleichen.

[0033] Nicht gewebte Stoffe sind flache, poröse Schichten, die direkt aus separaten Fasern hergestellt werden, die durch Verwickeln von Fasern oder Filamenten thermisch oder chemisch verbunden sind. Typischerweise stellen Hersteller von nicht gewebtem Stoff Medien mit einer durchschnittlichen Durchflusssporengröße (MFP) von 1 bis 500 µm bereit. Für nicht gewebte Stoffe ist die poröse Struktur die verwickelten Fasern und Porosität bezieht sich auf die gewundenen Räume zwischen den und entlang der Fasern. Porosität hat eine ähnliche Bedeutung für gefilzte Fasern. Ein bevorzugtes Vlies ist von Freudenberg Nonwovens NA of Lowell, Mass., und ist vom Typ FO2463.

[0034] Gewebte Fasern werden durch das Verflechten von Kettenfasern und Schussfasern in einem üblichen Design oder einer üblichen Webart hergestellt, d. h. mit einem bestimmten Winkel zueinander. Typischerweise ist der Schuss bei einem Winkel von etwa 90 Grad zu jenem der Kette. Weitere üblicherweise verwendete Winkel schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf 30, 45, 60 und 75 Grad. Die Unversehrtheit des Stoffs wird durch das mechanische Ineinandergreifen der Fasern beibehalten, das durch das Webverfahren verursacht wird. Fallvermögen (die Fähigkeit eines Stoffs, einer komplexen Oberfläche zu entsprechen), Gleichmäßigkeit der Oberfläche und Stabilität eines Stoffes werden in erster Linie durch die Webart kontrolliert, wie zum Beispiel Plain, Twill, Satin, Korbwebung, Leno, etc. In diesem Fall ist die Substratporosität der Raum zwischen den Fasern und ist von weniger gewundener Natur.

[0035] Das Substrat kann auch aus einer Vielzahl von Materialien einschließlich Glas, Kunststoffen, Keramik und Metallen gebildet werden.

[0036] Borsilicatglas ist ein Beispiel für ein geeignetes Glas, es kann aus Fasern oder Glasvliesen gebildet werden.

[0037] Verschiedene Keramik auf Basis der üblicheren Silikatchemie oder exotischeren Chemie wie Yttrium, Zirconium, Titan und dergleichen und Gemische davon können verwendet werden. Sie können zu Fasern, Vliesen, Filzen, Monolithen oder Membranen verarbeitet werden.

[0038] Metalle wie Edelstahl, Nickel, Kupfer, Eisen oder andere magnetische Metalle und Legierungen, Palladium, Wolfram, Platin und dergleichen können zu verschiedenen Formen verarbeitet werden, einschließlich Fasern, gesinterte Schichten und Strukturen, wie zum Beispiel gesinterte Edelstahl- oder Nickelfilter, Gewebesiebe und nicht gewebte Vliese, Stoffe und Filze wie zum Beispiel Edeldahlwolle.

[0039] Das bevorzugte Substrat wird aus synthetischen oder natürlichen polymeren Materialien hergestellt. Thermoplasten sind für diese Verwendung eine nützliche Klasse von Polymeren. Thermoplasten schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf Polyolefine wie zum Beispiel Polyethylene, einschließlich Polyethylene mit sehr hohem Molekulargewicht, Polypropylene, ummantelte Polyethylen/Polypropylenfasern, PVDF, Polysulfon, Polyethersulfone, Polyarylsulfone, Polyphenylsulfone, Polyvinylchloride, Polyester wie zum Beispiel Polyethylen-terephthalat, Polybutylenterephthalat und dergleichen, Polyamide, Acrylate wie zum Beispiel Polymethylmethacrylat, Styrolpolymere und Mischungen derselben. Weitere synthetische Materialien schließen Cellulosen, Epoxide, Urethane und dergleichen ein.

[0040] Geeignete Substrate schließen mikroporöse Filtrationsmembrane ein, d. h. solche mit Porengrößen von etwa 0,1 bis etwa 10 µm.

[0041] Substratmaterial kann hydrophil oder hydrophob sein. Beispiele hydrophiler Substratmaterialien schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf Polysaccharide und Polyamide sowie Oberflächenbehandelte hydrophile poröse Membrane, wie zum Beispiel Durapore[®] (Millipore Corporation, Billerica MA). Beispiele hydrophober Materialien schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf Polyolefine, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluorethylen, Polysulfone, Polycarbonate, Polyester, Polyacrylate und Polymethacrylate. Die poröse Struktur wird aus dem Substratmaterial durch ein beliebiges Verfahren hervorgebracht, das dem Fachmann bekannt ist, wie temperaturinduzierte Phasenseparation, Luftgießverfahren, Spurätzung, Dehnung, Sintern, Laserboh-

ren, etc. Wegen der allgemeinen Natur der vorliegenden Erfindung ist praktisch jedes verfügbare Verfahren zum Hervorbringen einer porösen Struktur zum Erzeugen des unterstützenden Gerüsts für den Membransorber geeignet. Aus Polyethylen mit sehr hohem Molekulargewicht hergestelltes Substratmaterial wurde wegen seiner Kombination von mechanischen Eigenschaften, chemischer, Ätz- und Gammastabilität als nützlich erkannt.

[0042] Das Beschichtungspolymer bildet das adsorbierende Hydrogel und trägt die chemischen Gruppen (Bindungsgruppen), die für das Anziehen und Binden von Verunreinigungen verantwortlich sind. Alternativ besitzt das Beschichtungspolymer chemische Gruppen, die leicht modifizierbar sind, um die Bindungsgruppen einzubauen. Die Beschichtung ist für Biomoleküle permeabel, so dass Proteine und andere Verunreinigungen abgefangen werden können, wobei sich die Adsorptionskapazität erhöht. Das bevorzugte Beschichtungspolymer ist polymeres primäres Amin. Beispiele geeigneter polymerer primärer Amine schließen Polyallylamin, Polyvinylamin, Polybutylamin, Polylysin, deren Copolymere mit einem weiteren oder mit weiteren Polymeren sowie deren entsprechende protonierte Formen ein. Eine aus Polyallylamin (und/oder dessen protonierter Form, zum Beispiel Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH)) hergestellte Beschichtung wurde als besonders nützlich erkannt. PAA ist bei etlichen Molekulargewichten, üblicherweise in dem Bereich von 1.000 bis 150.000, im Handel erhältlich (Nitto Boseki) und all diese können zur Herstellung von Membransorbern verwendet werden. PAA und PAH sind in Wasser leicht löslich. Der pH-Wert von wässriger Lösung von PAA beträgt etwa 10 bis 12, während jener von PAH 3 bis 5 beträgt. PAA und PAH können austauschbar verwendet werden, allerdings muss der pH-Wert der Endlösung kontrolliert werden und, falls erforderlich, auf einen Wert oberhalb von 10 eingestellt werden, so dass nicht protonierte Aminogruppen für die Reaktion mit einem Vernetzer verfügbar sind.

[0043] Die Beschichtung macht typischerweise mindestens etwa 3% des gesamten Volumens des beschichteten Substrats aus, vorzugsweise etwa 5% bis etwa 10% des gesamten Gewichts des Substrats. In bestimmten Ausführungsformen bedeckt die Beschichtung das Substrat in einer im Wesentlichen einheitlichen Dicke. Geeignete Dicken von trockener Beschichtung reichen von etwa 10 nm bis etwa 50 nm.

[0044] Ein Vernetzer reagiert mit dem Polymer, um letzteres in Wasser unlöslich zu machen und somit an der Oberfläche des unterstützenden Gerüsts zu halten. Geeignete Vernetzer sind difunktionelle oder polyfunktionelle Moleküle, die mit dem Beschichtungspolymer reagieren, und sind in dem ausgewählten Lösungsmittel, welches vorzugsweise Wasser ist, löslich. Eine breite Vielfalt chemischer Einheiten reagiert mit primären Aminen, vor allem Epoxide, Chlor-, Brom- und Iodalkane, Carbonsäureanhydride und -halogenide, Aldehyde, α,β -ungesättigte Ester, Nitrile, Amide und Ketone. Ein bevorzugter Vernetzer ist Polyethylenglycol-Diglycidylether (PEG-DGE). Er ist in Wasser leicht löslich, stellt eine schnelle und effiziente Vernetzung bereit und ist hydrophil, neutral, nicht toxisch und leicht verfügbar. Die Menge an in der Beschichtungslösung verwendetem Vernetzer basiert auf dem Molverhältnis von reaktiven Gruppen an dem Polymer und an dem Vernetzer. Das bevorzugte Verhältnis liegt im Bereich von etwa 10 bis etwa 1.000, bevorzugt von etwa 20 bis etwa 200, am meisten bevorzugt von etwa 30 bis etwa 100. Mehr Vernetzer wird die Fähigkeit des Hydrogels, zu quellen, verhindern und wird daher die Sorptionskapazität reduzieren, während weniger Vernetzer zu unvollständiger Vernetzung führen kann, d. h. einige Polymere Moleküle völlig löslich lässt.

[0045] Ein Tensid kann verwendet werden, um bei der gleichmäßigen Verteilung der Polymerlösung auf der gesamten Oberfläche der unterstützenden Struktur zu helfen. Bevorzugte Tenside sind nichtionisch, wasserlöslich und im Alkalischen stabil. Fluortenside besitzen eine bemerkenswerte Fähigkeit, die Oberflächenspannung von Wasser zu verringern. Diese Tenside werden unter dem Handelsnamen Zonyl von E. I. Du Pont de Nemours and Company verkauft und sind besonders geeignet, wie zum Beispiel Zonyl FSN und Zonyl FSH. Eine weitere annehmbare Klasse von Tensiden sind Octylphenoethoxylate, die unter dem Handelsnamen Triton X von The Dow Chemical Company verkauft werden. Der Fachmann wird erkennen, dass weitere Tenside ebenfalls verwendet werden können. Die in der Beschichtungslösung verwendete Konzentration von Tensid ist üblicherweise die minimale Menge, die benötigt wird, um die Oberflächenspannung der Lösung zur Verhinderung von Entnetzung herabzusetzen. Entnetzung ist definiert als spontanes Abperlen von Flüssigkeit auf der Oberfläche nach anfänglichem Spreizen. Entnetzung ist während der Bildung des Membransorbers eine hoch unerwünschte Erscheinung, da es zu einer ungleichmäßigen Beschichtung und Freilegung des Substrats führt, was manchmal zu einem nicht benetzbaren Produkt und reduzierter Sorptionskapazität führt. Die erforderliche Tensidmenge kann gängigerweise durch Messen von Kontaktwinkeln bestimmt werden, die ein Tropfen mit einer flachen Oberfläche bildet, die aus demselben Material wie das poröse Gerüst hergestellt ist. Dynamische Kontaktwinkel und Rückzugsrandwinkel sind besonders informativ, die gemessen werden, wenn die Flüssigkeit dem Lösungstropfen zugegeben wird oder dem Lösungstropfen entnommen wird. Entnetzung kann verhindert werden, wenn die Lösung so formuliert wird, dass sie den Rückzugsrandwinkel von 0° besitzt.

[0046] Eine geringe Menge eines hydrophilen Polymers, das leicht an einer hydrophoben Oberfläche adsorbiert, kann der Lösung wahlweise als Verteilungshilfsmittel zugegeben werden. Polyvinylalkohol ist das bevorzugte Polymer und kann in Konzentrationen verwendet werden, die von etwa 0,05 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-% des gesamten Lösungsvolumens reichen.

[0047] Wenn die unterstützende poröse Struktur wie zum Beispiel im Fall von hydrophober mikroporöser Membran nicht leicht mit der Polymerlösung benetzt werden kann, kann der Lösung ein Benetzungsmittel zugegeben werden. Das Benetzungsmittel kann jedes beliebige mit der Beschichtungspolymerlösung verträgliche organische Lösungsmittel sein, das die Vernetzungsreaktion nicht negativ beeinflusst. Typischerweise ist das Lösungsmittel eines der niederen aliphatischen Alkohole, jedoch können Aceton, Tetrahydrofuran, Acetonitril und weitere wassermischbare Lösungsmittel ebenso verwendet werden. Die Menge des zugegebenen organischen Lösungsmittels ist die minimale, die erforderlich ist, um unmittelbare Benetzbarkeit des porösen Substrats mit der Beschichtungslösung zu bewirken. Beispielhafte Benetzungsmittel schließen Methylalkohol, Ethylalkohol und Isopropylalkohol ein.

[0048] Beschichtungsverfahren können die Benetzung des Gewebes durch die Beschichtungslösung verbessern. Die Beschichtungslösung kann auf kontrollierte Weise in das Gewebe gezwungen werden, so dass das Gewebe gleichmäßig gesättigt wird und keine hydrophoben Punkte oder Flächen zurückgelassen werden. Dies kann zum Beispiel durch Extrudieren der Lösung durch eine Düse, die gegen das Gewebe gepresst wird, oder in unmittelbarer Nähe zu dem Gewebe, bewerkstelligt werden, um die Lösung durch den angewendeten Extrusionsdruck in das Gewebe zu zwingen. Fachmänner werden dazu in der Lage sein, Bedingungen von Druck, Geschwindigkeit und Düsengeometrie zu bestimmen, die erforderlich sind, um eine gleichmäßige Beschichtung herzustellen.

[0049] Ein bevorzugtes Verfahren zum Bilden des beschichteten Substrats enthält die Stufen: 1) Herstellen der Lösung, 2) Auftragen der Lösung auf die Membran, Entfernen überschüssiger Flüssigkeit von den äußeren Oberflächen des Substrats, 3) Trocknen der Membran, 4) Härten der Membran, 5) Durchspülen und Trocknen der Membran, 6) wahlweise Ausglühen der fertigen Membran und 7) wahlweise Säurebehandlung der Membran. Insbesondere wird eine Lösung hergestellt, die ein geeignetes Polymer und Vernetzer enthält. Die Konzentrationen dieser beiden Komponenten bestimmen die Dicke und den Grad der Quellung der abgeschiedenen Beschichtung, was wiederum den Fluss durch die Membran und dessen Sorptionskapazität definiert, wie im Folgenden gezeigt wird. Das Polymer und der Vernetzer werden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, vorzugsweise Wasser. Die Lösung kann wahlweise weitere Bestandteile wie zum Beispiel Benetzungsmittel, Verteilungshilfsmittel und einen pH-Wert-Regler enthalten. Wenn ein hydrophobes Substrat verwendet wird, muss die Oberflächenspannung der Lösung niedrig genug sein, um es zu benetzen. Wässrige Lösungen von Polymeren benetzen hydrophobe mikroporöse Membrane typischerweise nicht, so dass ein organisches Lösungsmittel (Benetzungsmittel) zu der Lösung gegeben werden muss. Um die gleichmäßige Verteilung der Beschichtung auf der Oberfläche einer hydrophoben Membran zu unterstützen, kann Tensid zu der Lösung gegeben werden. Letztlich kann es abhängig von der chemischen Natur des Vernetzers erforderlich sein, den pH-Wert zu erhöhen, um die Vernetzungsreaktion zu bewirken.

[0050] Die Komponenten der Lösung und typische Konzentrationsbereiche sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Komponente	Funktion	Bereich, Gew.-%
Polymeres primäres Amin-Adsorbens	Hydrogel-bildendes Adsorptionspolymer	3 bis 15
Vernetzer	Bewirkt die Bildung von Hydrogel	0,01 bis 2,0
Tensid	Tensid für eine ebene Beschichtung	0 bis 3,0
Hydrophiles Polymer	Oberflächenhydrophilierung	0 bis 1,0
Organisches Lösungsmittel	Anfängliche Benetzung hydrophober Membran mit Beschichtungslösung	0 bis 30
Anorganische Base	Erhöht den pH-Wert, um Vernetzung zu bewirken	0 bis 5,0
Wasser	Lösungsmittel	Rest

[0051] Die Beschichtungslösung wird auf das Substrat aufgetragen, zum Beispiel durch Eintauchen des Substrats in die Lösung, Entnehmen des Substrats aus der Lösung und mechanisches Entfernen eines Überschusses von Lösung von beiden Seiten des Substrats, zum Beispiel mittels eines Paares von Abquetschwalzen (Abgequetscht). Das poröse Substrat, dessen Poren mit Lösung gefüllt sind, wird anschließend getrocknet. Die Trocknung kann durch Verdampfung bei Raumtemperatur durchgeführt werden oder kann durch Anwenden von Wärme (Temperaturbereich von etwa 40 bis 110°C) beschleunigt werden. Nachdem das beschichtete Substrat getrocknet ist, wird es für eine Dauer von mehreren Stunden bis mehreren Tagen gehalten, so dass ein Vernetzer vollständig mit dem Polymer reagieren kann. Die Vernetzung kann wahlweise durch Anwenden von Wärme beschleunigt werden.

[0052] Das Substrat wird anschließend mit reichlichen Mengen Lösungsmittel durchgespült und wieder getrocknet. Zusätzliche wahlweise Verfahrensstufen schließen das Härten des getrockneten Membransorbers bei erhöhter Temperatur (60 bis 120°C) zum Einstellen seiner Fließeigenschaften und das Behandeln mit einer starken nicht oxidierenden einwertigen Säure bei einer Konzentration von 0,1 M bis 1 M ein, um die in der Beschichtung vorliegenden Aminogruppen zu protonieren.

[0053] Wo das Polymer PAA ist, wird das Umwandeln im Wesentlichen aller Aminogruppen in dem Polymer in entsprechende Ammoniumsalze nach der Wärmebehandlung der Membran dabei helfen, die Beständigkeit des Produkts sicherzustellen. Gute Wasserbenetzbarkeit ist wichtig. Da das Basismaterial sehr hydrophob ist und die hydrophile Beschichtung sehr lose vernetzt ist und nicht kovalent an die Matrix gebunden ist, führt seitliches Schrumpfen des PAA-Gels dazu, dass die Membran nicht mit Wasser benetzbar wird. Andererseits werden, falls im Wesentlichen alle Aminogruppen des PAA in die entsprechenden Ammoniumsalze umgewandelt werden, das erhöhte Volumen der getrockneten Beschichtung, die größere Retention von Wasser durch Gegenionen und die stärkere Affinität des geladenen Polymers für Wasser dabei helfen, die Membran wasserbenetzbarer zu machen. Eine starke nicht toxische nicht oxidierende Säure, vorzugsweise eine, die einwertig ist, um ionische Vernetzung von PAA zu verhindern, sollte verwendet werden, um PAA zu diesem Zweck zu protonieren. Geeignete Säuren schließen Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Sulfamin-, Methansulfon-, Trichlororessig- und Trifluoressigsäure ein. Obwohl Chlorid das Gegenion der Wahl sein kann, da es bereits in der Probenproteinlösung vorliegt, kann es wegen der Korrosion von Stahl und den damit verbundenen Arbeitsschutzaspekten für ein kontinuierliches Verfahren unpraktisch sein, Chlorwasserstoffsäure und/oder dessen Salze zu verwenden. Eine geeignetere Säure ist somit Sulfaminsäure ($\text{H}_2\text{N-SO}_2\text{OH}$), die als das Protonierungsmittel für PAA bevorzugt ist.

[0054] Ein geeignetes Verfahren zum Protonieren des PAA ist es, die Membran in eine 0,1 bis 0,5 M Lösung der protonierenden Säure einzutauchen, vorzugsweise Sulfaminsäure in Wasser (oder eine Wasser/Alkoholmischung, um eine schlecht benetzende Membran vollständig zu durchdringen), gefolgt von Durchspülen und Trocknen. Die resultierende Membran wird Sulfamin-Gegenionen tragen, die durch Anwenden eines einfachen Konditionierungsprotokolls, wie zum Beispiel 0,5 M Natriumhydroxid, gefolgt von 0,5 M Natriumchlorid, einfach ausgetauscht werden können.

[0055] Eine solche Säurebehandlung verbessert die Lagerstabilität der Membran und führt ferner zu einer wesentlich höheren Bindungsstärke. Obwohl die Erfinder nicht auf eine bestimmte Theorie beschränkt sein wollen, wird angenommen, dass wenn PAA in dem vollständig protonierten (säurebehandelten) Zustand getrocknet wird, eine ausgedehntere „offene“ Morphologie annimmt, die dazu geeignet ist, BSA besser zu verkapseln, und es somit nicht freisetzen wird, bis eine höhere Ionenstärke erreicht wird. Ein weiterer Vorteil säurebehandelter Membranen ist eine größere Stabilität gegenüber ionisierender Bestrahlung, wie Gamma-Bestrahlung, was ein anerkanntes Sterilisationsverfahren für Filtrationsprodukte ist.

[0056] Drei kritische Parameter definieren ein erfolgreiches Membransorberprodukt. Das sind: Sorptionskapazität, Fluss und Bindungsstärke. Während die Bindungsstärke weitgehend durch die chemische Natur der Gruppen bestimmt wird, die an der Oberfläche des Membransorbers vorliegen, sind Kapazität und Fluss üblicherweise viel empfindlicher gegenüber dem eingesetzten Verfahren zum Bilden der Sorptionsschicht und der Menge an Polymer und Vernetzer. Es wird oft beobachtet, dass bei einer gegebenen Kombination von unterstützendem Gerüst, Reinigungseffizienz (bestimmt durch die Betthöhe) und chemischer Natur des Membransorbers ein größerer Fluss in geringerer Sorptionskapazität münden kann und umgekehrt.

[0057] Die Fig. 1A und 1B zeigen typische Verläufe, die für einen Membransorber beobachtet werden, der gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wird. Aus diesen Schaubildern wird der Zielkonflikt zwischen Fluss und Kapazität offensichtlich. Es zeigt sich, dass sowohl PAH als auch Vernetzer einen direkten Einfluss auf diese kritischen Eigenschaften des Membransorbers besitzen. Um bei der Anwendung zufriedenstellend

zu funktionieren, sollte ein guter Membransorber sowohl einen hohen Fluss als auch eine hohe Kapazität besitzen. Der Fluss eines Membransorbers kann im Allgemeinen in chromatographischen Einheiten ausgedrückt werden, CV/min/psi, wobei CV das Säulenvolumen ist. Der Fluss bei einem gegebenen Säulenvolumen hängt offensichtlich von der Säulenhöhe ab, die üblicherweise für eine effiziente Trennung optimiert wird. Im Fall eines Anionenaustauschmembransorbers kann eine effiziente Säulenhöhe durch die minimale Höhe definiert werden, die erforderlich ist, um eine 99,99%-ige Entfernung (LRF 4,0) eines negativ geladenen Virus, zum Beispiel MMV, zu bewirken. Diese Säulenhöhe wurde für den Membransorber in der vorliegenden Erfindung zu etwa 0,5 mm erkannt. Zur zusätzlichen Gewährleistung der Beseitigung von Viren werden in dieser Erfindung Säulen der doppelten Höhe (1 mm) durchgehend routinemäßig verwendet. Ein wünschenswerter Fluss eines Membransorbers mit einer solchen Säulenhöhe wäre mindestens 2,0 CV/min/psi oder besser, bevorzugter 2,5 CV/min/psi oder besser. Die richtige Kombination von Fluss und Kapazität zu erreichen ist außergewöhnlich schwierig. Die Erfinder mussten wesentlich über Routineexperimente oder Konzentrationsoptimierung hinausgehen, um die herausragenden Eigenschaften des Membransorbers zu erreichen. Beispielsweise wurde der Vernetzer verständlicherweise als hochflexibles polymeres Molekül ausgewählt, das sich für eine hohe Sorptionskapazität als sehr vorteilhaft unter Beweis gestellt hat. Das Verwenden eines mittleren Molekulargewichts von PAA (15.000) hat es erlaubt, ein Gleichgewicht zwischen Fluss und Kapazität zu erreichen. Die zum Einstellen des pH-Werts verwendete anorganische Base war von nicht aussalzender Art, so dass eine höhere Konzentration von PAA verwendet werden konnte, um eine hohe Kapazität zu erreichen. Die Wahl des Tensids wurde durch das Erkennen des Bedarfs an einer nichtionischen ätzstabilen Verbindung bestimmt, während die erforderliche Tensidmenge in einer separaten Erforschung festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu besitzt ein PAA-Membrankörper, der gemäß der anhängigen Anmeldung US 2005/0211615 hergestellt wird, einen Fluss von nur 0,5 CV/min/psi für 1 mm Säule, während die BSA-Kapazität nur etwa 61 mg/ml beträgt.

[0058] Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Erfindung ist das Nachbehandlungsverfahren, das angewendet wird, nachdem die Sorbermembran gehärtet, durchgewaschen und getrocknet ist. Die Erfinder erkannten, dass die Behandlung von Membransorber auf Basis von polymeren primären Aminen mit Säure deren Bindungsstärke, Benetzbarkeit und Stabilität gegenüber ionisierender Strahlung wesentlich erhöht.

[0059] Eine sehr überraschende Erkenntnis, die von den Erfindern gemacht wurde, war, dass Säurebehandlung die Bindungsstärke von Membransorber von etwa 54 bis 58 mS/cm auf 78 bis 82 mS/cm wesentlich erhöht. Es könnte angenommen werden, dass wenn PAA in dem vollständig protonierten (säurebehandelten) Zustand getrocknet wird, es eine ausgedehntere „offene“ Morphologie annimmt, die dazu geeignet ist, BSA besser zu verkapseln, und es somit bis zu einer höheren Ionenstärke nicht freisetzen wird. Dieser Vorteil war nicht beabsichtigt und überraschend; nun ist es sehr vorteilhaft, da eine höhere SB üblicherweise in einer besseren Entfernung von Spurenverunreinigungen mündet.

[0060] Die Permeabilität des vernetzten PAA-Membranadsorbers wurde durch ein Hochtemperatur-„Härtungsverfahren“ verbessert. Das leicht vernetzte PAA-Gel besitzt die Fähigkeit, eine bedeutende Menge Wasser zu absorbieren, was zu einer Erhöhung dessen Volumens um Größenordnungen führt. Dieser Effekt kann eine geringe Permeabilität verursachen. Es scheint, als ob diese Eigenschaft des Gels durch dessen Entwässerung in einem solchen Umfang reduziert wird, dass es das Quellen auf ein annehmbares Maß reduziert, ohne die Bindungsstärke und Kapazität des Gels zu beeinträchtigen. Tatsächlich ist das Härtnungsverfahren dazu geeignet, die Permeabilität der Membran wie für das Produkt erforderlich einzustellen. Geeignete Härtnungstemperaturen sind etwa 25 bis 120°C, bevorzugter etwa 85 bis 100°C und für etwa 6 bis 72 Stunden.

[0061] Gamma-Bestrahlung ist ein weit akzeptiertes Sterilisationsverfahren für Filtrationsprodukte. Gamma-Sterilisierbarkeit ist ein wünschenswertes Merkmal eines Membransorbers. Die Erfinder beobachteten insofern einen überraschenden Vorteil von säurebehandeltem Membransorber, als er eine größere Stabilität gegenüber ionisierender Bestrahlung besitzt. [Fig. 2](#) veranschaulicht die BSA-Kapazität von Membransorberproben (Kontrolle, nicht mit Säure behandelt) und solchen, die in Ammoniumsulfamate umgewandelt sind. Sämtliche dieser Proben wurden mit 25 kGy eines Elektronenstrahls bestrahlt, um Gamma-Sterilisierungsbedingungen zu simulieren. Es ist eindeutig, dass säurebehandelte Proben ihre Eigenschaften viel besser beibehalten als die nicht säurebehandelten.

[0062] Der somit gebildete Anionenaustauschsorber ist insbesondere nützlich, wenn er in einem Mab-Reinigungschromatographieschema platziert wird. Zum Beispiel kann ein Zellkulturfluid, das monoklonale Antikörper einschließt, mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden, wie zum Beispiel einer Protein A- oder Protein G-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer oder mehreren Kationenaustauschsäulen. Der Ausfluss der letzten Kationenaustauschsäule kann durch die vorliegende Anionenaustauschsäule fließen gelassen werden, um die Konzentration von restlichen Wirtszellproteinen, Viren, Nukleinsäuren, Endotoxinen und weiteren Ver-

unreinigungen in dem Fluid wesentlich zu reduzieren, indem das Binden dieser Verunreinigungen an das Medium unter geeigneten Bedingungen verursacht wird, während nützliches gereinigtes Produkt durch den Austauscher fließen kann.

[0063] Bedeutenderweise kann eine weitere Reinigung des Kationenaustauscherpools (des Outputs aus der bzw. den Kationenaustauschersäule(n)) unter Verwendung des vorliegenden Anionenaustauschersorbers ohne die wesentliche Verdünnung des Kationenaustauscherpools bewerkstelligt werden, die herkömmlicherweise erforderlich war, um die Salzkonzentration zu reduzieren (und die Leitfähigkeit zu verringern), um das wirksame Binden der Wirtszellproteine zu ermöglichen. Tatsächlich besitzen die Sorber der vorliegenden Erfindung sogar bei hohen Salzkonzentrationen und hoher Leitfähigkeit eine sehr hohe Bindungskapazität (z. B. > 60 g/L BSA-Bindung bei 200 mM NaCl) und ermöglichen unter typischen Kationenaustauscherpoolbedingungen eine viel höhere Massenladung als herkömmliche Sorber (z. B. 3 kg/L verglichen mit 0,05 kg/L), siehe Beispiel 7 unten. Die Fähigkeit des vorliegenden Sorbers, die Verdünnung des Kationenaustauscherpools wegen der hohen Kapazität bei hohen Salzkonzentrationen zu reduzieren oder auszulassen, ist ein wesentlicher Vorteil.

[0064] Der vorliegende Sorber weist ebenfalls eine zuverlässige Entfernung von Viren bei relativ hoher Salzkonzentration und relativ hohem pH-Wert (pH-Werte von 7,6 und Salzkonzentrationen von 100 mM und 150 mM führten immer noch zu annehmbarer Entfernung von Virus) auf.

[0065] Fachmänner werden ferner anerkennen, dass die nachgeschaltete Feinstreinigung, die von der einen oder den mehreren Kationenaustauschersäulen durchgeführt wird, für einige Anwendungen nicht erforderlich ist und der vorliegende Anionenaustauschersorber kann der Affinitätsäule ohne dazwischen liegende Kationenaustauschersäulen nachgeschaltet platziert werden. Analog kann der vorliegende Anionenaustauschersorber für einige Anwendungen der Kationenaustauschersäule nachgeschaltet platziert werden, wobei kein Bedarf an einer vorgeschalteten Einfang-(Affinitäts)Säule besteht.

[0066] Die folgenden Beispiele sind zum Zweck der Veranschaulichung hierin eingeschlossen, wobei nicht beabsichtigt ist, dass diese die Erfindung beschränken.

Beispiel 1 (PAA auf hydrophobem UPE)

[0067] Eine wässrige Lösung wurde hergestellt, die 20 Gew.-% Isopropanol, 9 Gew.-% PAH (Molekulargewicht 15.000), 3 Gew.-% Lithiumhydroxid-Monohydrat, 2 Gew.-% Triton X-100, 0,5 Gew.-% PEG-DGE (Molekulargewicht 526) und 0,2 Gew.-% Polyvinylalkohol (Molekulargewicht 30.000, Hydrolysegrad 98%) enthält. Eine hydrophobe UPE-Membran mit einer Poregrößenabstufung von 0,65 µm wurde vollständig mit dieser Lösung benetzt und überschüssige Flüssigkeit wurde abgequetscht. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet und mit reichlichen Mengen an Wasser und Methanol durchgespült und erneut getrocknet. Die Membran benetzt bereitwillig mit Wasser und besitzt eine Gewichtserweiterung von etwa 25%. Aus dieser Membran, die eine Oberfläche von 3,5 cm² und eine Säulenhöhe von 1 mm besitzt, wurde ein achtschichtiges Spritzengerät vom Millex[®]-Typ hergestellt, das eine Fließgeschwindigkeit von 4,3 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 90 mg/ml und eine Bindungsstärke von 54 mS/cm besitzt.

Vergleichsbeispiel 1 (PAA-GTMAC auf hydrophobem UPE)

[0068] Die modifizierte Membran aus Beispiel 1 wurde ferner modifiziert, indem sie in 50 Gew.-%igem Glycidyltrimethylammoniumchlorid (GTMAC) bei einem pH-Wert von 13 für 24 Stunden eingetaucht wurde, mit Wasser durchgespült wurde und getrocknet wurde. Aus dieser Membran, die eine Oberfläche von 3,5 cm² besitzt, wurde ein achtschichtiges Spritzengerät vom Millex[®]-Typ hergestellt. Das Gerät besitzt eine Fließgeschwindigkeit von 0,7 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 80 mg/ml und eine Bindungsstärke von 19 mS/cm.

Vergleichsbeispiel 2 (Sulfaminsäurebehandlung)

[0069] Die modifizierte Membran aus Beispiel 1 wurde ferner modifiziert, indem sie für 10 Minuten in 0,5 M Lösung von Sulfaminsäure in Wasser eingetaucht wurde, mit entionisiertem Wasser durchgespült wurde und getrocknet wurde. Aus dieser Membran, die eine Oberfläche von 3,5 cm² besitzt, wurde ein achtschichtiges Spritzengerät vom Millex[®]-Typ hergestellt. Das Gerät besitzt eine Fließgeschwindigkeit von 4,3 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 80 mg/ml und eine Bindungsstärke von 80 mS/cm.

Vergleichsbeispiel 3

[0070] Eine wässrige Lösung wurde hergestellt, die 11,6 Gew.-% PAH (Molekulargewicht 75.000), 18,6 Gew.-% 1,0 N Natriumhydroxidlösung, 11,6% Natriumchlorid, 23,2% 17%ige wässrige Lösung von Epichlorhydrin-modifiziertem Polyethylenamin enthält. Eine hydrophobe UPE-Membran mit einer Porengrößendimensionierung von 0,65 µm wurde mit Methanol vorbenetzt und für 5 Minuten unmittelbar mit der obigen Lösung in Kontakt gebracht. Die feuchte Membran wurde in einer Polyethylenfilmtasche platziert und die Tasche wurde bei 85°C für 7 Minuten in einem Ofen platziert, wobei darauf geachtet wurde, die Membran nicht auszutrocknen, um die Vernetzungsreaktion zu initiieren. Die feuchte Membran wurde dann aus der Tasche entfernt und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die trockene Membran wurde dann bei 100°C für vier Stunden in einem Ofen platziert, um die Vernetzungsreaktion zu vervollständigen. Die Membran wurde dann gründlich mit Wasser, Methanol und Chlorwasserstoffsäure (1,0 N) gewaschen und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die Membran benetzte nicht mit Wasser. Aus dieser Membran, die eine Oberfläche von 3,5 cm² besitzt, wurde ein achtschichtiges Spritzengerät vom Millex[®]-Typ hergestellt, das eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 61 mg/ml und eine Bindungsstärke von 81 mS/cm besitzt.

Beispiel 2 (PAA auf hydrophilem UPE)

[0071] Eine wässrige Lösung wurde hergestellt, die 10 Gew.-% PAA (Molekulargewicht 15.000) und 0,5 Gew.-% PEG-DGE (Molekulargewicht 526) enthält. Eine hydrophobe UPE-Membran mit einer Porengrößendimensionierung von 0,65 µm wurde vollständig mit dieser Lösung benetzt und überschüssige Flüssigkeit wurde abgequetscht. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet, mit reichlichen Mengen Wasser durchgespült und wieder getrocknet. Das achtschichtige Gerät besitzt eine Fließgeschwindigkeit von 4,3 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 80 mg/ml und eine Bindungsstärke von 49 mS/cm.

Beispiel 3 (Polyvinylamin auf hydrophilem UPE)

[0072] Eine wässrige Lösung wurde hergestellt, die 20 Gew.-% Isopropanol, 7 Gew.-% Polyvinylamin (Lupamin 9095, BASF Corp., Mount Olive, NJ) und 0,5 Gew.-% PEG-DGE (Molekulargewicht 526) enthält. Eine hydrophile UPE-Membran mit einer Porengrößendimensionierung von 0,65 µm wurde vollständig mit dieser Lösung benetzt und überschüssige Flüssigkeit wurde abgequetscht. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet und mit reichlichen Mengen an Wasser und Methanol durchgespült und wieder getrocknet. Aus dieser Membran, die eine Oberfläche von 3,5 cm² besitzt, wurde ein achtschichtiges Gerät hergestellt, das eine Durchfließgeschwindigkeit von 3,1 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 87 mg/ml und eine Bindungsstärke von 32 mS/cm besitzt.

Beispiel 4 (Polylysin auf hydrophoben UPE)

[0073] Eine wässrige Lösung wurde hergestellt, die 20 Gew.-% Isopropanol, 4 Gew.-% Polylysinhydrobromid (Molekulargewicht 30.000 bis 50.000), 4 Gew.-% Lithiumhydroxid-Monohydrat, 1 Gew.-% Triton X-100, 0,25 Gew.-% PEG-DGE (Molekulargewicht 526) und 0,1 Gew.-% Polyvinylalkohol (Molekulargewicht 30.000, Hydrolysegrad 98%) enthält. Eine hydrophobe UPE-Membran mit einer Porengrößendimensionierung von 0,65 µm wurde vollständig mit dieser Lösung benetzt und überschüssige Flüssigkeit wurde abgequetscht. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet und mit reichlichen Mengen an Wasser und Methanol durchgespült und wieder getrocknet. Die Membran benetzte nicht mit Wasser und besaß eine Gewichtserweiterung von etwa 9. Aus dieser Membran, die eine Oberfläche von 3,5 cm² besitzt, wurde ein achtschichtiges Gerät hergestellt, das eine Fließgeschwindigkeit von 7,1 CV/min/psi, eine BSA-Kapazität von 34 mg/ml und Bindungsstärke von 32 mS/cm besitzt.

Beispiel 5 (PAA auf aktivierten Sepharose-Kügelchen)

[0074] Agarose-Chromatographiekügelchen wurden mit PAA modifiziert. 2 g Epoxysepharose 6B (GE Healthcare) wurden in 8 ml Milli-Q-Wasser suspendiert, dem 10 ml 10%iger Lösung von PAA (Molekulargewicht 3.000) zugegeben wurden. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 11 eingestellt. Die Kugeln wurden für 24 Stunden schonend geschüttelt, vorsichtig mit Wasser durchgewaschen und vor der Verwendung feucht im Kühlschrank gelagert. Eine Chromatographiesäule wurde mit modifizierten Kügelchen gepackt (Säulenhöhe 5,5 cm, Säulenvolumen 1,88 mL) und getestet. Sie besaß eine BSA-Kapazität von 20,6 mg/ml und eine SB von 83 mS/cm.

Vergleichsbeispiel 4 (PAA-GTMAC auf aktivierten Sepharose-Kügelchen)

[0075] PAA-modifizierte Agarose-Kügelchen aus Beispiel 5 wurden ferner durch Reagieren mit 2%iger Lösung von GTMAC bei einem pH-Wert von 11 übernacht modifiziert. Die Kügelchen wurden vorsichtig mit Wasser durchgespült und vor der Verwendung feucht im Kühlschrank gelagert. Eine Chromatographiesäule wurde mit modifizierten Kügelchen gepackt (Säulenhöhe 4,7 cm, Säulenvolumen 1,61 mL) und getestet. Sie besaß eine BSA-Kapazität von 87,3 mg/ml und eine SB von 25,4 mS/cm.

Beispiel 6

[0076] Membrane mit immobilisierter PAA aus Beispiel 1 wurden in achtschichtigen Spritzengefäßen eingeschlossen und auf ihre Virusretention getestet. Die Messergebnisse in nachfolgender Tabelle 2 zeigen den Einfluss erhöhter Salzkonzentration auf die MMV- und MuLV-Retention. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigen die MVV-Messergebnisse für die Pall Mustang-Membran (Bindungsstärke 20 mS/cm), dass der LRV mit zunehmender Leitfähigkeit abfällt, während für die Membran der Erfindung (d. h. hohe Bindungsstärke) vollständige Entfernung beobachtet wird, sogar bei den erhöhten Salzkonzentrationen, Darüber hinaus war die HCP-Entfernung für die PAA-Membrane verglichen mit der quartären Ammoniumsalzchemie (PAA-GTMAC, hergestellt gemäß Vergleichsbeispiel 1) wesentlich besser, wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist. Für die Messergebnisse aus Tabelle 3 waren Capto Q-Kügelchen die Kontrolle, die von GE Amersham verkauft werden, und die eine mittlere Bindungsstärke (d. h. ca. 30 mS/cm) besitzen. Es sollte erwähnt werden, dass diese LRVs wegen der nichtspezifischen Bindung der monoklonalen Antikörper an die funktionalisierte Membran (d. h. die Anionenaustauscheigenschaften stießen das Produkt wirksam von der Membranoberfläche ab) ohne wesentliche Verluste an Produkt erhalten wurden.

Tabelle 2A – Virusentfernung (X-MuLV) als Funktion der Salzkonzentration

Gerät	X-MuLV	LRC
	50 mM Salz	100 mM Salz
PAA	> 3,9	> 3,7
Pall	> 3,9	> 3,7

Tabelle 2B – Virusentfernung (MMV) als Funktion der Salzkonzentration und des pH

Gerät	NaCl Konzentration in 25 mM Trispuffer					
	50	100		150		
	pH 7,6 (7,2 mS/cm)	pH 7,1 (12,2 mS/cm)	pH 7,6 (12,1 mS/cm)	pH 7,1 (17,2 mS/cm)	pH 7,6 (17,0 mS/cm)	pH 8,1 (16,6 mS/cm)
PAA-Membransorber	> 6,2	> 5,3	> 5,3	> 5,5	> 5,5	> 5,4
Pall Mustang Q	> 6,2	2,1	2,8	0,6	0,9	1,8

Tabelle 3 – HCP-Entfernung von drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern

Produkt (Pro. A Pool)	Leitfähigkeit (mS/cm)	HCP-Ladung (ng/ml)	Prototyp-(PAA aus Beispiel 1) Entfernung (bei 400 CV)	Capto Q-Entfernung (bei 30 CV)	Entfernung von quartärem Ammonium (bei 400 CV)
4 g/L Mab 1	10,7	420	62%	14%	0%
7 g/L Mab 2	9,7	1800	31%	0%	0%
3,7 g/L Mab 3	22	200	85%	30%	0%

Beispiel 7

[0077] Eine 0,65 µm UPE-Membran wurde auf der Pilotbeschichtungsmaschine mit 9% PAA und 0,5% PEGDGE beschichtet. Die Membran wurde ausgewaschen und für 10 Minuten bei 85°C in einem Konvektionsofen getrocknet. Eine Probe wurde bei 85°C für 12 Stunden stehen gelassen und die andere bei Raumtemperatur gelagert. Die Membrane wurden dann mit 5 Sulfaminsäure in 5%igem Isopropylalkohol behandelt, um die Beschichtung zu stabilisieren. Die Permeabilität der Membrane wurde dann mittels eines Flusstesters gemessen. In diesem Versuch wird die Zeit gemessen, die von 500 ml Wasser benötigt wird, um unter Vakuum (27,0" Hg) durch eine Membranprobe zu laufen (Querschnittsfläche 9,6 cm²). Die Membranchargen, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, wurden hergestellt, um die Verbesserung der Permeabilität als Ergebnis des Härtungsschritts aufzuzeigen.

[0078] Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, besitzen die „nicht gehärteten“ Membrane eine bedeutend höhere Durchlaufzeit (was auf eine geringere Permeabilität hinweist) als die „gehärteten“ Membrane.

[0079] Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, kann der Härtungsschritt verwendet werden, um die Permeabilität und Kapazität der Membrane wie gewünscht zu kontrollieren. Sämtliche Membrane besaßen eine BSA-Bindungsstärke von 60 bis 75 mS.

Tabelle 4 – Vergleich der Durchlaufzeiten für gehärtete und nicht gehärtete Membrane

Chargennummer	Härtungsbedingungen	Fluss (s/500 ml)
020307-60821	-	1180
020307-60821	85°C 12 h	96
020307-60803	-	2650
020307-60803	85°C 12 h	106

Tabelle 5 – Verarbeitungsbedingungen für Membranadsorber

UPE-Char-genr.	PAA-Char-genr.	Rollen-nr.	Härtungstemperatur (°C)	Härtungsdauer (h)	Durchlaufzeit (s/500 ml)
UPDP 101006R9	60821	103A	100	16	58
UPDP 101006R9	60821	103B	90	6	95
UPDP 101006R9	60803	104	90	6	102
UPDP 101006R5	60821	105	90	6	90
UPDP 101106R5	60801	102	90	6	84
UPDP 101006	60821	011507-1	90	12	80
UPDP 101106R5	60821	011507-2	95	12	52

Beispiel 8

[0080] 0,65 µm UPE-Membranrollen wurden auf der Pilotbeschichtungsmaschine mit 9% PAA und 0,35% PEGDGE beschichtet. Die Membrane wurden mit Wasser und Methanol ausgewaschen und bei 120°C auf einen Heißluft-Schlag Trockner getrocknet. Die Rollen wurden dann einer Härtung bei verschiedenen Temperaturen und Dauern unterzogen, wie aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich ist.

[0081] Die Membrane wurden dann mit 5% Sulfaminsäure in 5%igem Isopropylalkohol behandelt, um die Beschichtung zu stabilisieren. Die Durchlässigkeit der Membrane wurde mittels eines Flusstesters gemessen, wie

in dem vorigen Beispiel beschrieben.

[0082] Wie aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich, können durch Erwärmen der Membran auf Temperaturen größer als 90°C für 12 Stunden oder länger Fließzeiten in der Größenordnung von 50 s erhalten werden. Falls Membrane mit niedrigerer Permeabilität (höhere Durchlaufzeiten in der Größenordnung von 100 s) gewünscht sind, können die Temperaturen auf unter 85°C und für kürzere Zeiten beschränkt werden (< 10 h).

Kapazität, Durchlaufzeit (mg/ml; s)	8 h	10 h	12 h	20 h	24 h
85°C	107,7; 147,6		95; 63,9		92,9; 88,0
90°C		95; 41		90; 39	
95°C	92,6; 79,2		89,6; 50,2		85,8; 67,1
100°C		79; 39		63; 41	

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

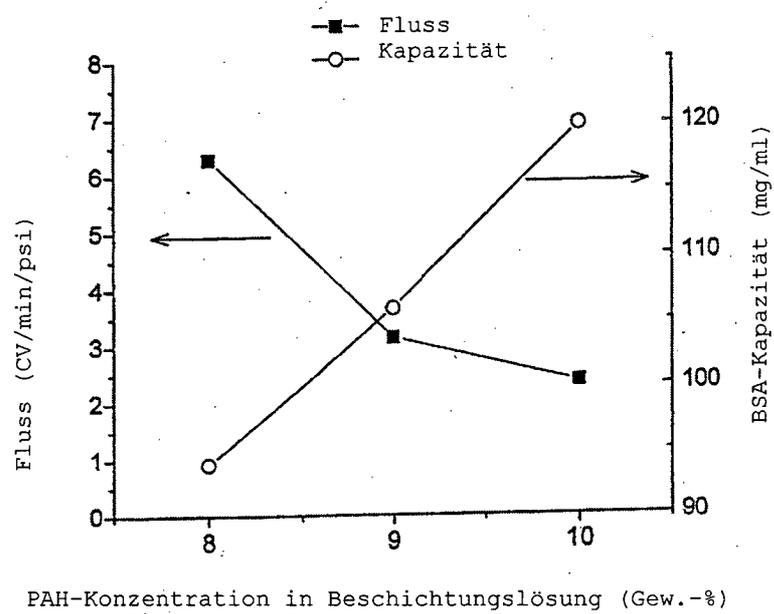
- US 6090288 [[0014](#), [0017](#)]
- US 5304638 [[0015](#), [0015](#), [0016](#), [0017](#)]
- US 5547576 [[0016](#), [0017](#)]

Schutzansprüche

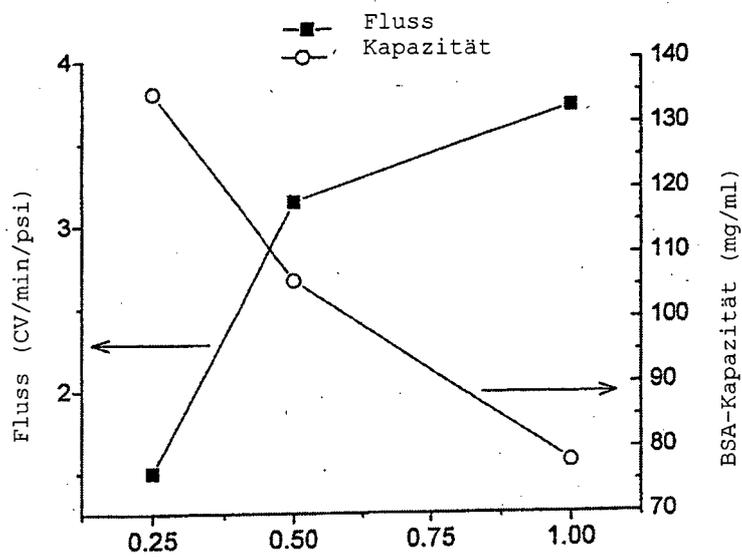
1. Poröses Sorptionsmedium, das ein Substrat mit einer ersten äußeren Seite und einer zweiten äußeren Seite, wobei beide Seiten porös sind, und einer porösen Schicht zwischen ihnen umfasst, wobei das Substrat Sorptionsmaterial besitzt, das die feste Matrix des Substrats und die erste und zweite äußeren Oberflächen im Wesentlichen bedeckt, wobei das Sorptionsmaterial vernetztes Polymer mit angebondenen primären Amingruppen umfasst.
2. Poröses Sorptionsmedium nach Anspruch 1, bei dem das vernetzte Polymer in einer wirksamen Menge vorliegt, um einen Fluss von mindestens 2,0 CV/min/psi durch 1 mm Betthöhe des Mediums und eine Bindungskapazität von etwa 60 g/L BSA-Bindung bei 200 mM NaCl zu erzeugen, und bei dem das vernetzte Polymer gegebenenfalls in einer wirksamen Menge vorliegt, um einen Fluss von mindestens 2,5 CV/min/psi durch das Medium zu erzeugen.
3. Poröses Sorptionsmedium nach Anspruch 1, bei dem das Substrat eine mikroporöse Membran umfasst, vorzugsweise bei dem die Membran Cellulose oder Polyolefin wie Polyethylen umfasst.
4. Poröses Sorptionsmedium nach Anspruch 1 oder 3, bei dem
 - a) das Substrat eine Polyethylenmembran mit sehr hohem Molekulargewicht ist oder
 - b) das vernetzte Polymer Polyallylamin oder protoniertes Polyallylamin umfasst oder
 - c) das vernetzte Polymer ein Copolymer oder Blockcopolymer umfasst, das Polyallylamin oder protoniertes Polyallylamin enthält.
5. Poröses Sorptionsmedium nach Anspruch 1, das eine Nukleinsäure-Bindungskapazität von größer als 5 mg/ml besitzt, insbesondere wenn die Nukleinsäure DNS ist.
6. Gerät für Anionenaustauschchromatographie, das ein Gehäuse umfasst, das ein poröses beschichtetes Medium für Adsorption enthält, das ein Substrat mit einer ersten äußeren Seite und einer zweiten äußeren Seite, wobei beide Seiten porös sind, und einer porösen Schicht zwischen ihnen umfasst, wobei das Substrat Sorptionsmaterial besitzt, das die feste Matrix des Substrats und die erste und zweite äußeren Oberflächen im Wesentlichen bedeckt, wobei das Sorptionsmaterial vernetztes Polymer mit angebondenen primären Amingruppen umfasst.
7. Gerät nach Anspruch 6, bei dem das Substrat eine UPE-Membran ist.
8. Gerät nach Anspruch 6, bei dem das vernetzte polymere primäre Amin-Polymer Polyallylamin oder protoniertes Polyallylamin umfasst.
9. Gerät nach Anspruch 6, das einen Affinitätschromatographieseparator, mindestens einen Kationenaustauscher und einen dem Kationenaustauscher nachgeschalteten Anionenaustauscher umfasst, wobei der Anionenaustauscher das poröse beschichtete Medium enthält.
10. Gerät nach Anspruch 9, bei dem das Medium positiv geladen ist.
11. Gerät nach Anspruch 9, bei dem der Affinitätschromatographieseparator eine Protein A-Affinitätssäule umfasst.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

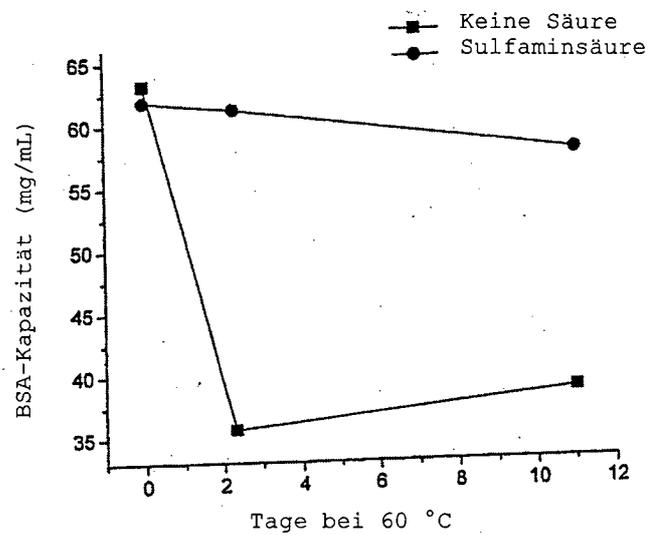
Anhängende Zeichnungen



Figur 1-A. Wasserfluss und BSA-Kapazität von 1 mm Membransorbensäulen, die aus PAH hergestellt sind, das mit 0,5 % PEG-DGE vernetzt ist.



Figur 1-B. Wasserfluss und BSA-Kapazität von 1 mm Membransorbersäulen, die mit 9 Gew.-% PAH hergestellt sind, das mit PEG-DGE vernetzt ist.



Figur 2. BSA-Kapazität eines Membransorbers in der freien Basenform und der Sulfamationenform in dem beschleunigten Lagerstabilitätstest.