

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 479**

51 Int. Cl.:
B01D 71/26 (2006.01)
B01D 67/00 (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08166546 .5**
96 Fecha de presentación: **14.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2060316**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **Medios para cromatografía de intercambio iónico sobre membrana**

30 Prioridad:
19.11.2007 US 3694 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2012

73 Titular/es:
**EMD Millipore Corporation
290 Concord Road
Billerica MA 01821, US**

72 Inventor/es:
Kozlov, Mikhail

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 479 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

Medios para cromatografía de intercambio iónico sobre membrana

Esta solicitud de patente reivindica la prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU. con número de serie: 61/003 694 registrada el 19 de Noviembre de 2007, cuya descripción se incorpora en este texto como referencia.

Antecedentes de la invención

La purificación de virus es un campo emergente de las bioseparaciones. Ya que son necesarias grandes cantidades de virus puros para estudios clínicos de terapias génicas, el método tradicional de purificación, concretamente, la ultracentrifugación, ya no es rentable. Existe una necesidad de desarrollar más rápidamente, de manera menos cara, y más técnicas de purificación escalables. Se ha empleado la cromatografía para la purificación de virus, primeramente en el formato de esferas. Los primeros informes sobre la purificación de virus basada en la cromatografía data de aproximadamente medio siglo (véase, por ejemplo, Haruna, I.; Yaoi, H.; Kono, R.; Watanabe. I.; Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose. *Virology* 1961, 13, (2), 264). La cromatografía de membrana ha empezado a ganar atención recientemente cuando las limitaciones de capacidad y de uso de la cromatografía sobre esferas se hicieron más serios.

Los fuertes intercambiadores de aniones, tal como los basados en iones de amonio cuaternario, se usan en procesamientos posteriores como un medio limpiador para capturar grandes impurezas cargadas negativamente, tal como endotoxinas, virus, ácidos nucleicos, y proteínas de células huésped (HCP por sus siglas en inglés) que están presentes en fluidos como fluidos biológicos, particularmente soluciones de sustancias bioterapéuticas fabricadas. Tradicionalmente, los intercambiadores de aniones se han ofrecido y usado en el formato de esferas, por ejemplo Q Sepharose® disponible en GE Healthcare Bio-Sciences AB. Sin embargo, las limitaciones de producción de los sistemas basados en esferas requieren columnas de gran volumen para capturar eficazmente las impurezas.

En la cromatografía sobre esferas, la mayoría del área superficial disponible para la adsorción es interna a la esfera. Por consiguiente, el proceso de separación es inherentemente lento ya que el flujo de transporte de masa está controlado típicamente por la difusión en los poros. Para minimizar esta resistencia a la difusión y concomitantemente maximizar la capacidad de unión dinámica, se pueden emplear esferas de diámetro pequeño. Sin embargo, el uso de esferas de diámetro pequeño implica una pérdida de carga mayor en la columna. Consecuentemente, la optimización de las separaciones cromatográficas preparativas a menudo implica un compromiso entre eficacia/capacidad dinámica (esferas pequeñas favorecidas) y pérdida de carga en la columna (esferas grandes favorecidas).

En contraste, los sistemas de cromatografía sobre membrana (también llamada membrana sorbente) tienen los ligandos anclados directamente a los poros de convección de la membrana, eliminando de este modo los efectos de la difusión interna en los poros sobre el transporte de masa. Adicionalmente, el uso de los sustratos de membrana microporosa con una distribución ajustada de tamaño de poro de la membrana asociado con distribuidores de flujo eficaces puede minimizar la dispersión axial y proporcionar una utilización uniforme de todos los sitios activos. Consecuentemente, los flujos de transferencia de masa de medios sorbentes de la membrana pueden ser un orden de magnitud mayor que la de los medios de cromatografía estándar sobre esferas, permitiendo en ambos una alta eficacia y separaciones de con flujo elevado. Ya que las columnas únicas o incluso las dispuestas en serie son muy delgadas comparadas con las columnas empaquetadas con medios basados en esferas, las pérdidas de carga reducidas se encuentran a lo largo del lecho cromatográfico, de este modo se consiguen caudales y productividades mayores. La necesaria capacidad de unión se alcanza empleando membranas de área superficial interna suficiente, dando configuraciones de dispositivos de diámetro muy grande frente a relaciones de alturas (d/h). Ya que la mayoría de la capacidad de las esferas para cromatografía es interna a la esfera, los sistemas de cromatografía sobre membrana ganan ventaja sobre los de esferas a medida que el tamaño de las entidades adsorbentes aumentan (como, por ejemplo, yendo de una molécula de proteína a una partícula de virus).

Los sorbentes de membrana apropiadamente diseñados tienen eficacias cromatográficas que son 10-100 veces mejores que las resinas de esferas preparativas estándar. Consecuentemente, para conseguir el mismo nivel de separación sobre un sorbente de membrana, se puede utilizar una altura de lecho 10 veces menor. Las longitudes de lecho de 1-5 mm son estándar para sorbentes de membrana, comparado con las alturas de lecho de 10-30 cm para sistemas de esferas. Debido a las relaciones de aspecto de columna extremo requerido para los sorbentes de membrana de gran volumen, el diseño del dispositivo es crítico. Para mantener las ventajas de la eficacia inherente asociadas con sorbentes de membrana, se requieren unos distribuidores de entrada y salida para utilizar eficientemente y eficazmente el volumen de membrana disponible. La tecnología de sorbente de membrana es adecuada idealmente para esta aplicación. Los sorbentes de membrana comerciales habituales, sin embargo, sufren varios inconvenientes, incluido la baja capacidad, mala separación de impurezas, y dificultad en la elución del material purificado.

La absorción se refiere a abordar el asunto mediante permeación en el cuerpo de un material absorbente. La absorción se refiere al movimiento de las moléculas desde la fase libre sobre la superficie de un medio adsorbente.

La sorción es un término general que incluye ambas adsorción y absorción. Similarmente, un material sorbente o un dispositivo de sorción en este texto denominado como un sorbente, se refiere a un material o dispositivo que bien ad- o absorbe o ambos ad- y absorbe.

5 Un sorbente de membrana es un medio altamente poroso interconectado que tiene la habilidad de retirar (ad- y/o adsorber) algunos componentes de una solución cuando esta fluye a través de sus poros. Las propiedades del sorbente de membrana y su habilidad para funcionar adecuadamente en la aplicación requerida depende de la estructura porosa del medio (esqueleto) al igual que de la naturaleza de la superficie que está expuesta a la solución. Típicamente, el medio poroso se forma primero, a partir de un polímero que no se disuelve o se hincha en agua y posee unas propiedades mecánicas aceptables. El medio poroso es preferentemente una hoja de membrana porosa fabricada por métodos de separación de fase bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Zeman LJ, Zydney AL, Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, Nueva York: Marcel Dekker, 1996. También son aceptables esqueletos de membranas tubulares y de fibra hueca. Habitualmente se requiere una etapa de un procesamiento separado para modificar las superficies externas o faciales y las superficies internas de los poros de la estructura porosa formada para impartir las propiedades adsorbentes necesarias. Ya que la estructura de la membrana se forma a menudo a partir de un polímero hidrofóbico, otro propósito de la etapa de modificación de la superficie es también hacer las superficies hidrófilas, o humectables al agua.

Esta invención se refiere a un medio de cromatografía de intercambio aniónico diseñado para purificar virus, tal como adenovirus. El adenovirus es un vector de elección en estudios de terapia génica. Es estable, sin envoltura, e infecta células fácilmente. El serotipo más común se denomina Ad5. Se expresa fácilmente en el laboratorio, pero requiere una purificación minuciosa a partir de proteínas celulares para evitar las señales de falsos positivos en posteriores estudios de transfección. Por supuesto, también se requiere adenovirus puro para sus aplicaciones últimas, es decir, terapia génica y vacunación. Estudios electroforéticos muestran que Ad5 está fuertemente cargado negativamente a pH alrededor de 8, mientras muchas especies en la suspensión del lisado celular tiene carga más débil a este pH. Esto hace que la cromatografía de intercambio aniónico sea una técnica adecuada para la purificación de Ad5.

Las membranas de intercambio aniónico para la retirada y purificación de virus han sido preparadas previamente por técnica de injerto químico como se explica en la patente de EE.UU. 7 160 464. Se explica la preparación de una membrana injertada como cadenas laterales poliméricas que tienen uno o más grupos cargados positivamente. Aquellos familiarizados con la técnica de la modificación de membranas rápidamente apreciarán que un procedimiento de injerto es específico para cada sustrato de membrana, requiere un equipo avanzado y un trabajo de desarrollo extensivo. La presente invención ofrece una aproximación significativamente más simple para crear un sorbente de membrana cargada positivamente basado en un recubrimiento directo de la membrana. Otra técnica explica la preparación de una membrana de intercambio aniónico sin unir directamente el recubrimiento superficial cargado a la membrana que lo soporta. La Patente de EE.UU. 6 780 327 explica la preparación de una membrana cargada positivamente que comprende un sustrato poroso y un recubrimiento reticulado que incluye un esqueleto polimérico y grupos colgados cargados positivamente, en los que cada grupo colgado cargado positivamente está directamente unido al esqueleto a través de un grupo espaciador polar mediante un enlace simple. Sin embargo, la presencia de un grupo espaciador polar añade modos adicionales de interacciones entre la superficie de la membrana y la molécula sorbente, tal como interacciones dipolo y enlace de hidrógeno. Estos últimos son muy difíciles de modular bajo las condiciones de las separaciones biológicas tradicionales. Puede ser deseable crear un medio sorbente que interaccione con componentes de la solución predominantemente mediante interacciones de cargas, que pueden modularse fácilmente y ajustarse cuidadosamente mediante fuerza iónica. Por ejemplo, en una aplicación típica de la purificación de adenovirus, la fuerza iónica alta (concentración de sal alta) se usa para eluir el virus fuera de la membrana. Si están presentes otros modos de interacción, el rendimiento del virus purificado puede reducirse. De este modo, la presente invención describe la creación de un recubrimiento reticulado sobre la superficie de una membrana microporosa que tiene grupos cargados positivamente conectados al esqueleto del polímero del recubrimiento mediante un grupo enlazante no polar sencillo.

Hemos advertido en la patente de EE.UU. 5137633 (Milipore Corporation) que describe que la superficie de un sustrato poroso hidrofóbico es modificado con una red interpolimérica de un polímero reticulado hidrófilo y una resina de epíclorohidrina de poliamida reticulada que tiene cargas positivas fijas. El sustrato hidrofóbico está en contacto con un sistema de reacción que comprende una solución de (a) precursor monomérico del polímero hidrófilo, un iniciador de polimerización catiónico o no iónico y un agente reticulador y (b) un precursor de la resina reticulada cargada positivamente. El monómero se polimeriza y se reticula mediante polimerización libre de radicales seguida de calentamiento del sustrato contactado para formar la resina cargada.

55 También hemos advertido en la patente de EE.UU. 2003/121844 (Saehan Industries Incorporation), que describe una membrana selectiva que tiene una alta resistencia al ensuciamiento. En una realización, la membrana selectiva es una membrana de ósmosis inversa de poliamida composite en la cual se ha aplicado un recubrimiento hidrófilo a la capa de poliamida de la membrana, estando fabricado el recubrimiento hidrófilo por (i) aplicación sobre la membrana de una cantidad de un compuesto epoxi polifuncional, comprendiendo el compuesto epoxi polifuncional al menos dos grupos epoxi, y (ii) luego, reticulación del compuesto epoxi polifuncional de tal manera a obtener un polímero insoluble en agua.

Sumario de la invención

- Las características esenciales y opcionales de la presente invención están expuestas en las reivindicaciones principales y sub-reivindicaciones acompañantes respectivamente. De este modo, los problemas de la técnica han sido solventados por la presente invención, que proporciona medios y dispositivos, tal como intercambiadores aniónicos que incluyen tales medios, en los que se forma el recubrimiento de intercambio aniónico sobre un sustrato hidrófilo con una unión proteica no específica baja. La carga positiva está conectada al esqueleto del recubrimiento mediante un grupo enlazante no polar, y el material de la membrana base es preferentemente polietileno de peso molecular altísimo. El medio opera en un modo de unir-y-eluir, siendo facilitada la elución por una fuerza iónica alta. El medio proporciona una eficacia en la aplicación superior, limpieza cáustica, y fácil fabricación del dispositivo.
- 5 En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un medio de sorción poroso que comprende un sustrato que tiene un primer lado externo y un segundo lado externo, siendo ambos lados porosos, y un espesor poroso entre ellos, siendo el sustrato hidrófilo y teniendo un material sorbente recubriendo sustancialmente la matriz sólida del sustrato y la primera y segunda superficies externas, comprendiendo el material sorbente un polímero reticulado que tiene unido una funcionalidad amonio cuaternario a través de un grupo enlazante no polar. En ciertas realizaciones, el polímero reticulado se modifica con un agente de modificación de carga que comprende un compuesto orgánico que tiene grupos amonio cuaternarios conectados por el grupo enlazante no polar a un resto capaz de reaccionar con el polímero reticulado. El compuesto orgánico puede tener la fórmula $Y-Z-N(CH_3)_3^+X^-$, en la que Y es un grupo saliente reactivo, Z es un grupo enlazante alifático o aromático no polar, y X es un ión cargado negativamente de un ácido soluble en agua.
- 10 En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un método de purificación de un virus, que comprende el pasar una solución que comprende el virus a través de una membrana para adsorber el virus, comprendiendo la membrana un sustrato que tiene un primer lado externo y un segundo lado externo, siendo ambos lados porosos, y un espesor poroso entre ellos, siendo dicho sustrato hidrófilo y teniendo un material sorbente recubriendo sustancialmente la matriz sólida del sustrato y la primera y segunda superficies externas, comprendiendo el material sorbente un polímero reticulado que tiene funcionalidad amonio cuaternario a través de un grupo enlazante no polar; lavando dicha membrana con tampón; y eluyendo dicho virus fuera de dicha membrana.
- 15 20 25

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el perfil de superficie de una membrana de acuerdo con ciertas realizaciones;
- 30 La Figura 2 es un gráfico de valoración de adenovirus;
- La Figura 3 es un gráfico de la cantidad adsorbida y eluida de adenovirus para diferentes membranas de purificación de virus;
- La Figura 4 es un SDS-PAGE de lisado celular de partida, solución de flujo continuo, solución de lavado y eluyente; y
- 35 La Figura 5 es un gráfico de Ad5 eluido como función de grado de modificación de PEI (polietilenimina) con BPTMAB (bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio).

Descripción detallada de las realizaciones específicas

- La presente invención se refiere a un medio cromatográfico o sorbente poroso que tiene un recubrimiento polimérico poroso formado sobre un sustrato poroso autosoportado, y a intercambiadores aniónicos que incluyen tal medio. El medio es particularmente adecuado para la retirada robusta de virus de soluciones tal como lisado celular.
- 40 El sustrato poroso tiene dos superficies asociadas con la estructura geométrica o física del sustrato. Una hoja tendrá una superficie superior e inferior, o una primera y una segunda superficie. Estas se denominan comúnmente "lados". Al usarse, el fluido fluirá de un lado (superficie) a través del sustrato a y a través del otro lado (superficie).
- La dimensión del espesor entre las dos superficies es porosa. Esta región porosa tiene un área superficial asociada con los poros. Con el fin de prevenir la confusión relacionada con los términos "superficie", "superficies", o "área superficial", o usos similares, los inventores se referirán a las superficies geométricas como superficies externas o faciales o como lados. El área superficial asociada con los poros se referirá como un área superficial interna o porosa.
- 45 El material poroso comprende los poros, que son espacios vacíos, y la matriz sólida o esqueleto, que constituye la realización física del material. Por ejemplo, en membranas microporosas poliméricas, el polímero separado de la fase proporciona la matriz. En este texto, los inventores abordan el recubrimiento o revestimiento de la superficie del medio. Los inventores dan a entender con esto que las superficies interna y externa se recubren de modo que no bloqueen completamente los poros, esto es, para mantener una proporción significativa de la estructura para flujo
- 50

convectivo. En particular, para el área superficial interna, el recubrimiento o revestimiento significa que la matriz está recubierta o revestida, dejando una proporción significativa de los poros abiertos.

La absorción se refiere a abordar el asunto mediante permeación en el cuerpo de un material adsorbente. La adsorción se refiere a un movimiento de las moléculas desde la fase libre sobre la superficie de un medio adsorbente. La sorción es un término general que incluye ambas adsorción y absorción. Similarmente, un material sorbente o un dispositivo de sorción en este texto denominado como un sorbente, se refiere a un material o dispositivo que ad- y absorbe.

El medio de la cromatografía de membrana de la presente invención incluye un recubrimiento de intercambio aniónico formado sobre un sustrato poroso. El sustrato poroso actúa como un esqueleto de soporte para el recubrimiento. El sustrato debería ser susceptible de ser manejado y fabricado en un dispositivo robusto e integral. La estructura del poro debería proporcionar para una distribución de flujo uniforme, alto flujo, y alta área superficial. El sustrato es preferentemente una hoja formada por una membrana. El sustrato preferido está fabricado a partir de materiales poliméricos sintéticos o naturales. Los termoplásticos son una clase útil de polímeros para este uso. Los termoplásticos incluyen sin ser limitantes a poliolefinas tal como polietilenos, incluidos polietilenos de peso molecular altísimo, polipropilenos, fibras recubiertas de polietileno/polipropileno, PVDF, polisulfona, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas, poli(cloruro de vinilo), poliésteres tal como poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de butileno) y similares, poliamidas, acrilatos tal como polimetilmetacrilato, polímeros estirénicos y mezclas de los anteriores. Otros materiales sintéticos incluyen celulosas, epoxis, uretanos y similares. El sustrato también podría tener una unión proteica no específica baja.

Los sustratos adecuados incluyen membranas de filtración microporosas, es decir aquellas con tamaños de poro de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 μm . El material del sustrato puede ser hidrófilo o hidrófobo. Ejemplos de materiales de sustrato hidrófilo incluyen, sin ser limitantes, polisacáridos y poliamidas, al igual que membranas porosas hidrófilas tratadas en superficie, tal como Durapore® (Millipore Corporation, Billerica MA). Ejemplos de material hidrófobo incluyen, sin ser limitantes, poliolefinas, poli(fluoruro de vinilideno), politetrafluoroetileno, polisulfonas, policarbonatos, poliésteres, poliácridatos, y polimetacrilatos. La estructura porosa se crea a partir del material del sustrato mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica, tal como una inversión de fase en solución, separación de fase inducida por la temperatura, moldeo con aire, lixiviación controlada, estiramiento, sinterización, taladrado con láser, etc. Debido a la naturaleza universal de la presente invención, virtualmente cualquier método disponible para crear una estructura porosa es adecuado para fabricar el esqueleto de soporte para el sorbente de membrana. Un material de sustrato fabricado con polietileno de peso molecular altísimo se ha visto que es particularmente útil debido a su combinación de propiedades mecánicas, químicas, cáusticas, y estabilidad gamma. Cuando se emplean sustratos hidrófobos, se deberían convertir en hidrófilos, como mediante un procedimiento de modificación conocido por aquellos expertos en la técnica. Los procedimientos de modificación adecuados están descritos en la patente de EE.UU. N^{os} 4 618 533 y 4 944 879. Se prefiere una hidrofiliación de la superficie de baja unión proteica del sustrato (p.ej., $<50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de unión proteica).

El polímero de recubrimiento forma el hidrogel adsorbente y soporta los grupos químicos (grupos de unión) responsables de atraer y soportar las impurezas. Alternativamente, el polímero del recubrimiento posee grupos químicos que son fácilmente modificables para incorporar los grupos de unión. El recubrimiento es permeable a biomoléculas de modo que proteínas y otras impurezas puedan ser capturadas en la profundidad del recubrimiento, incrementando la capacidad adsorbente. El polímero de recubrimiento preferido es una polietilenimina ramificada o no ramificada.

El recubrimiento constituye típicamente al menos aproximadamente 3% del volumen total del sustrato recubierto, preferentemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, del volumen total del sustrato. En ciertas realizaciones, el recubrimiento cubre el sustrato en un espesor sustancialmente uniforme. Los espesores adecuados están en el intervalo de un recubrimiento seco de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm.

Un reticulador reacciona con el polímero para hacer este último insoluble en agua y de este modo mantenerse en la superficie del esqueleto de soporte. Los reticuladores adecuados incluyen aquellos con propiedades de baja unión proteica, tal como polietilenglicol, diglicidil-éter (PEG-DGE). La cantidad de reticulador empleado en la solución del recubrimiento está basada en la relación molar de grupos reactivos sobre el polímero y el reticulador. La relación preferida está dentro del intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 2000, más preferido de aproximadamente 40 a aproximadamente 400, el más preferido de aproximadamente 80 a aproximadamente 200. Más reticulador impedirá la habilidad del hidrogel a hincharse y de este modo reducirá la capacidad sorbente, mientras menos reticulador puede dar como resultado una reticulación incompleta, es decir, la eliminación de algunas moléculas poliméricas totalmente solubles.

El recubrimiento inmovilizado se modifica luego con un agente modificador de la carga con el fin de impartir funcionalidad de amonio cuaternario al recubrimiento para aplicaciones de cromatografía sobre membrana adecuadas. Los agentes modificadores de la carga adecuados son compuestos orgánicos con grupos amonio cuaternarios conectados con un grupo enlazante no polar a otro resto capaz de reaccionar con el recubrimiento inmovilizado. Estos compuestos tienen una fórmula general $\text{Y-Z-N}(\text{Alq})_3^+\text{X}^-$ donde Y es un grupo saliente reactivo, Z es un grupo enlazante alifático o aromático no polar, y X es un anión de cualquier ácido soluble en agua. El

propósito del grupo saliente Y es facilitar la reacción entre el ligando y el recubrimiento de la membrana y luego marcharse causando la formación de un enlace directo entre el grupo enlazante y el recubrimiento. Un "buen" grupo saliente es habitualmente uno que favorece el rendimiento alto de la reacción bajo condiciones relativamente suaves. Ejemplos de grupos salientes Y incluyen halógenos como Br-, Cl-, I-, F-, y derivados sulfonilo (TsO-, CF₃SO₃-, C₄F₉SO₃-, etc.). La química de grupos salientes está bien estudiada; véase, por ejemplo, M.B. Smith y J. March, *Comprehensive Organic Chemistry*, 5ª ed., Wiley Interscience, 2001. Normalmente se requiere un catalizador para efectuar la reacción de acoplamiento y promover la marcha del grupo saliente. Ácidos y bases pueden servir como catalizadores dependiendo de la naturaleza de la reacción. Cuando el recubrimiento de partida constituye una amina polimérica, se necesita habitualmente un catalizador básico para mejorar el carácter nucleofílico del nitrógeno de la amina. Este catalizador básico puede ser cualquier base inorgánica fuerte (hidróxidos de litio, sodio, potasio, calcio, bario) o base orgánica (hidróxido de tetraalquil-amonio). El grupo enlazante no polar puede ser cualquier hidrocarburo alifático no saturado, por ejemplo (CH₂)_n donde n es desde 2 a 10, un hidrocarburo alifático ramificado tal como -(CH₂)_n-C(CH₃)₂-, un grupo aromático tal como fenileno, tolieno, xilileno, o una combinación de un alifático y aromático. El grupo amonio cuaternario -N(Alq)₃+ es preferentemente un grupo amonio trimetil, pero también puede incluir otros grupos alquilo o arilo tal como etilo, fenilo, bencilo, hidroxietilo, etc. El anión X es un anión de cualquier ácido orgánico o inorgánico soluble en agua. Ejemplos de aniones X adecuados incluyen, sin ser limitantes, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, hidrógeno fosfonato, hidrógeno sulfato, citrato, bicarbonato, metil-sulfonato, sulfamato, etc. Ejemplos de compuestos que modifican la carga adecuados incluyen cloruro de 2-cloroetiltrimetil-amonio (cloruro de clorocolina), cloruro de 2-bromoetiltrimetil-amonio, cloruro de 3-cloropropiltrimetilamonio (CPTMAC), y bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio (BPTMAB). Un agente modificador de la carga preferido es bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio (BPTMAB).

El grado de modificación, es decir el porcentaje de grupos reactivos sobre el recubrimiento reticulado que reacciona con el compuesto modificador de la carga, tiene que ser lo bastante grande para asegurar que el soluto interacciona primero con la superficie de la membrana por interacciones de carga. Por ejemplo, PEI tiene grupos dadores de enlace de hidrógeno (aminas secundarias) que pueden reducir el rendimiento del virus eluido si no se convierten en y/o se recubren de grupos amonio cuaternarios. Un grado de modificación preferido es al menos 10%, más preferido al menos 20%, y el más preferido al menos 30%. Debido a los tamaños relativos de una unidad repetida PEI y BPTMAB (impedimentos estéricos), es virtualmente imposible obtener un grado de modificación mucho mayor de 50%.

Un procedimiento preferido para formar el sustrato recubierto comprende las etapas de: 1) preparar una solución del polímero de recubrimiento y un reticulador, y ajustar el pH de manera que el polímero reaccione rápidamente con el reticulador; 2) sumergir la estructura porosa en la solución de 1); 3) retirar la estructura porosa de la solución y eliminar el exceso de líquido; 4) secar la estructura porosa para efectuar la reticulación; 5) sumergir la estructura porosa en la solución que contiene el compuesto modificador de la carga para un período específico de tiempo; 6) retirar la estructura porosa de la solución del compuesto modificador de la carga, enjuagar con agua y secar.

Volviendo ahora sobre la Figura 1, se ilustra la estructura de una membrana de acuerdo con ciertas realizaciones. En la realización mostrada, una membrana de polietileno de peso molecular altísimo microporosa se modificó primero al copolimerizar dimetilacrilamida y metilen-bis-acrilamida sobre su superficie usando un iniciador de radicales libres y activación UV. Tales membranas modificadas de esta manera tienen un tamaño de poro de 0,65 μm y están comercialmente disponibles en Entegris, Inc., y se designan como MPLC. Tales membranas se caracterizan por una unión protéica débil a su superficie; la unión de IgG sobre esta membrana es 40-50 μg/CM², que es aproximadamente 2-3 veces superior a las membranas DURAPORE®, pero 6-7 veces inferior a Immobilon P y otras membranas hidrófobas similares de alta unión que están comercialmente disponibles.

La membrana modificada está recubierta con una solución que contiene polietilenimina (PEI) y un reticulador, polietilenglicol-diglicidiléter (PEG-DGE). El recubrimiento se secó y se curó a temperatura ambiente durante 24 horas, se enjuagó con agua, y posteriormente se modificó con bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio (BPTAB) en una solución acuosa al 50% a pH 13 mantenida con hidróxido de sodio.

La membrana resultante tiene una alta densidad de carga positiva sobre la superficie como se indica por la alta adsorción de colorantes negativos, por ejemplo Ponceau S. La membrana es estable en medio cáustico y podría fabricarse para un amplio espectro de dispositivos. Se puede plegar fácilmente, termosellar o sobremoldear.

Los ejemplos siguientes se incluyen en este texto con el propósito de ilustrar y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1. Se recubrió una hoja 6x6" de membrana de polietileno hidrofílica con un tamaño de poro de 0,65 μm con una solución acuosa que contenía 7% en peso de polietilenimina (Sigma-Aldrich), 0,35% de polietilenglicol-diglicidiléter (Sigma-Aldrich), e hidróxido sódico 0,03M. El exceso de solución se eliminó y la membrana se dejó secar durante toda la noche. Se enjuagó a continuación con agua y se sumergió en 100 ml de una disolución al 50% en peso de bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio (BPTAB) e hidróxido sódico 0,1M. La membrana se dejó en esta solución durante 48 horas, y se añadió periódicamente NaOH concentrado para mantener el pH a 13. La membrana se retiró luego de la solución, se enjuagó con agua, y se secó.

5 **Ejemplo 2.** La membrana preparada en el Ejemplo 1 se empleó para la purificación de adenovirus. El adenovirus se extrajo primero de células infectadas mediante múltiples ciclos de congelación y descongelación. Los desechos celulares se retiraron mediante centrifugación dejando las partículas de virus viables en el sobrenadante. El sobrenadante se trató con Benzona. El sobrenadante se clarificó posteriormente al pasarlo a través de un filtro de membrana microporoso de 0,2 μm . La solución se diluyó con el tampón de equilibrio, pH 8,0, NaCl de concentración 100 mM. Se empleó el mismo tampón para acondicionar la membrana de purificación. La solución del virus se pasó lentamente a través de la membrana que adsorbe las partículas de virus, dejando pasar mucho del deshecho celular a través del filtro. La membrana se lavó luego con un tampón de lavado, pH 8,0, NaCl de concentración 200-250 mM, para retirar cualquier deshecho unido débilmente. Finalmente, el virus se eluyó de la membrana con un tampón de elución, pH 8,0, NaCl de concentración 1000 mM.

10 La concentración de virus fue evaluada mediante ensayo de proteína verde fluorescente (GFP), que se desarrolló en la casa. La Figura 2 muestra como el área de fluorescencia verde (observada bajo el microscopio) se correlaciona con la concentración de las partículas de virus. La mayoría de los datos se obtuvo con el ensayo de GFP a 3 días. La retención del virus y los datos de elución se presentan en la Figura 3.

15 Una de las características del medio sorbente de la presente invención es el rendimiento y pureza altos del adenovirus producido. Las barras huecas de la Fig. 3 corresponden al adenovirus capturado del lisado celular mientras las barras sólidas indican el porcentaje de virus recuperado de la membrana. La alta recuperación de virus (>70%) indicada por este dato hace este medio muy adecuado para la aplicación al adenovirus.

20 La pureza de las partículas de virus se analizó mediante electroforesis en gel, que se muestra en la Fig. 4. Se ve que la membrana de la presente invención, PEI-BPTMAB, proporciona una alta pureza de la suspensión de virus eluida, que es superior a una membrana comercial A indicada mediante una banda de BSA (albúmina de suero bovino) menos pronunciada.

25 **Ejemplo 4.** Las membranas se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1 usando una concentración variable de BPTMAB en la mezcla de reacción, que produjo diferentes grados de modificación. La Figura 5 muestra que el grado de modificación de PEI con BPTMAB tiene un impacto directo sobre el porcentaje de virus eluido.

REIVINDICACIONES

1. Un medio sorbente poroso que comprende un sustrato que tiene un primer lado externo y un segundo lado externo, siendo ambos lados porosos, y un espesor poroso entre ellos, siendo dicho sustrato hidrófilo y teniendo un material sorbente recubriendo sustancialmente la matriz sólida del sustrato y dichas primera y segunda superficies externas, comprendiendo dicho material sorbente un polímero reticulado que tiene grupos amonio cuaternarios unidos a través de un grupo enlazante no polar.
2. El medio sorbente poroso de la reivindicación 1, en el que dicho sustrato comprende una membrana microporosa.
3. El medio sorbente poroso de la reivindicación 2, en el que dicha membrana comprende una poliolefina.
4. El medio sorbente poroso de la reivindicación 3, en el que dicha poliolefina es polietileno.
5. El medio sorbente poroso de la reivindicación 1, en el que dicho sustrato es una membrana de polietileno de peso molecular altísimo.
6. El medio recubierto poroso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polímero reticulado comprende polietilenimina.
7. El medio recubierto poroso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polímero reticulado está modificado con un agente modificador de la carga que comprende un compuesto orgánico que tiene grupos amonio cuaternarios conectados por dicho grupo enlazante no polar a un resto capaz de reaccionar con dicho polímero reticulado.
8. El medio recubierto poroso de la reivindicación 7, en el que dicho compuesto orgánico tiene la fórmula $Y-Z-N(CH_3)_3^+X^-$, en la que Y es un grupo saliente reactivo, Z es un enlace aromático o alifático no polar, y X es un ion cargado negativamente de un ácido soluble en agua.
9. El medio recubierto poroso de la reivindicación 8, en el que Y es un miembro elegido entre el grupo que consiste en Br-, Cl-, I-, TsO-, y $CF_3SO_3^-$, y Z es $(CH_2)_n$ donde n es de 2 a 10.
10. El medio recubierto poroso de la reivindicación 6, en el que los grupos amonio cuaternarios se forman sobre dicha polietilenimina mediante bromuro de 3-bromopropiltrimetilamonio.
11. Un método para purificar virus, que comprende pasar una solución que comprende dicho virus a través de una membrana para adsorber dicho virus, comprendiendo dicha membrana un sustrato que tiene un primer lado externo y un segundo lado externo, siendo ambos lados porosos, y un espesor poroso entre ellos, siendo dicho sustrato hidrófilo y tendiendo un material sorbente sustancialmente recubriendo la matriz sólida del sustrato y dichas primera y segunda superficies externas, comprendiendo dicho material sorbente un polímero reticulado que tiene grupos amonio cuaternarios unidos a través de un grupo enlazante no polar; lavar dicha membrana con tampón, y eluir dicho virus fuera de dicha membrana.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho polímero reticulado se modifica con un agente modificador de la carga que comprende un compuesto orgánico que tiene grupos amonio cuaternarios conectados por dicho grupo enlazante no polar a un resto capaz de reaccionar con dicho polímero reticulado.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho compuesto orgánico tiene la fórmula $Y-Z-N(CH_3)_3^+X^-$, en la que Y es un grupo saliente reactivo, Z es un grupo enlazante aromático o alifático no polar, y X es un ion cargado negativamente de un ácido soluble en agua monovalente.
14. Un intercambiador de aniones que comprende un medio sorbente poroso que comprende un sustrato que tiene un primer lado externo y un segundo lado externo, siendo ambos lados porosos, y un espesor poroso entre ellos, siendo dicho sustrato hidrófilo y tendiendo un material sorbente recubriendo sustancialmente la matriz sólida del sustrato y dichas primera y segunda superficies externas, comprendiendo dicho material sorbente un polímero reticulado que tiene grupos amonio cuaternarios unidos a través de un grupo enlazante no polar.

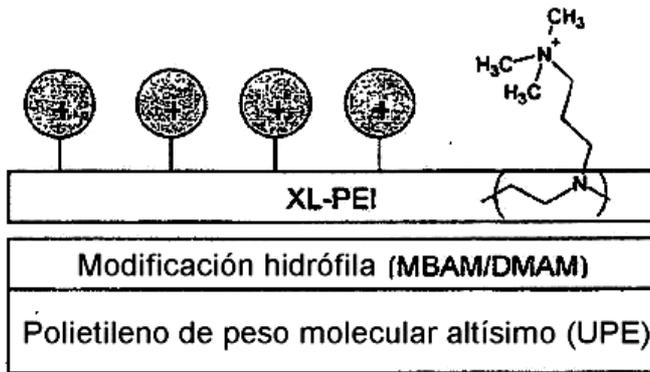


Figura 1. Perfil de la superficie de la membrana

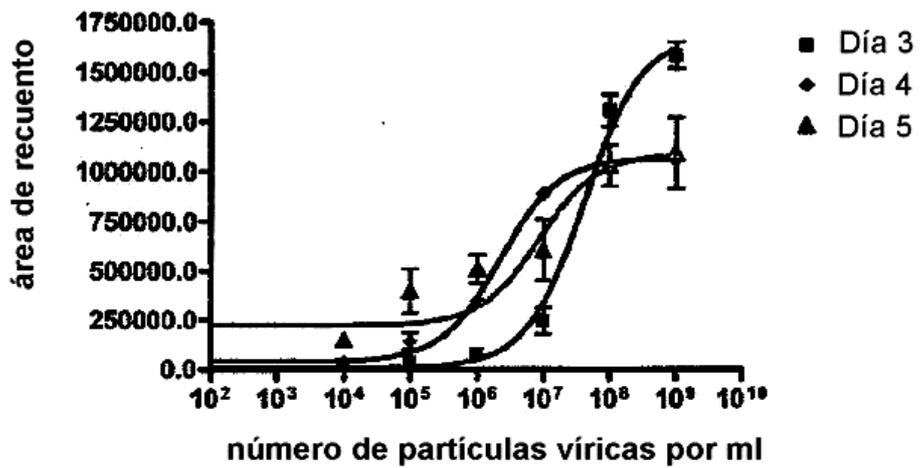


Figura 2. Valoración de adenovirus - infección con GFP.

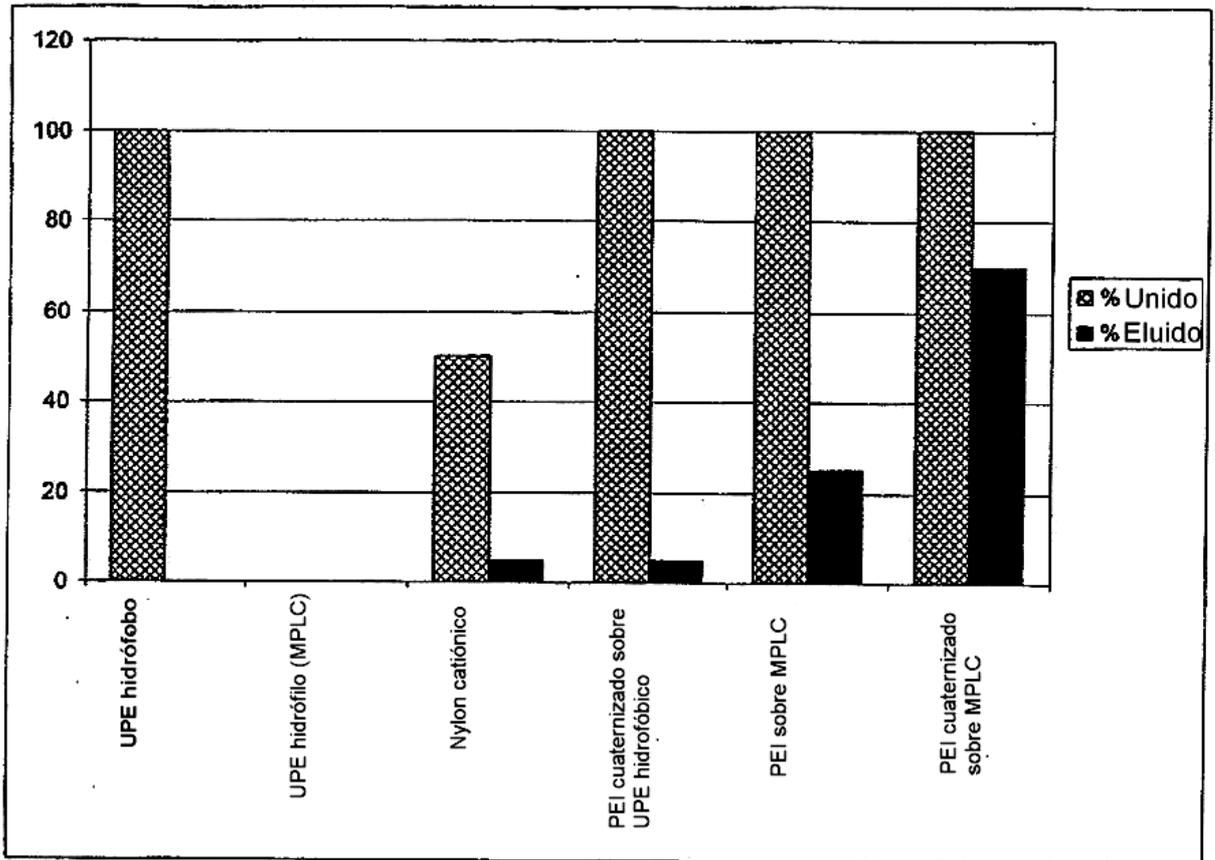


Figura 3. Cantidad de adenovirus adsorbido y eluido para diferentes membranas de purificación de virus, como porcentaje de concentración inicial en la solución de carga.

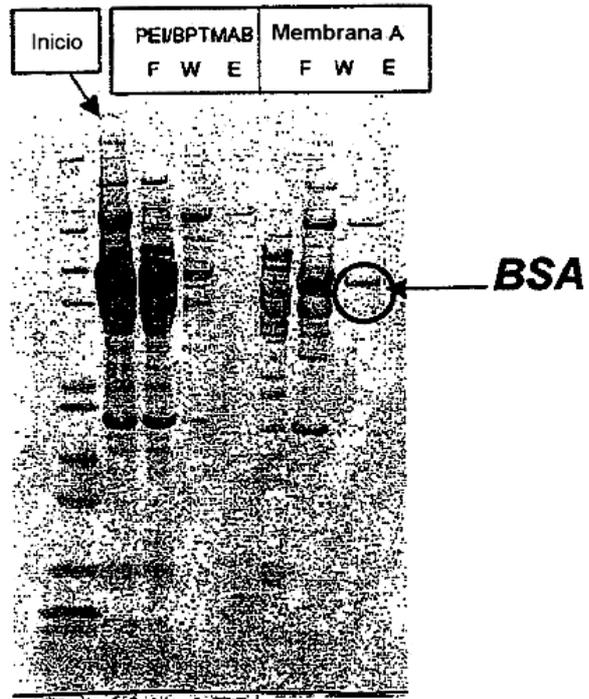


Figura 4. SDS-PAGE de lisado celular inicial; solución de flujo continuo, solución de lavado (W), y el eluido (E).

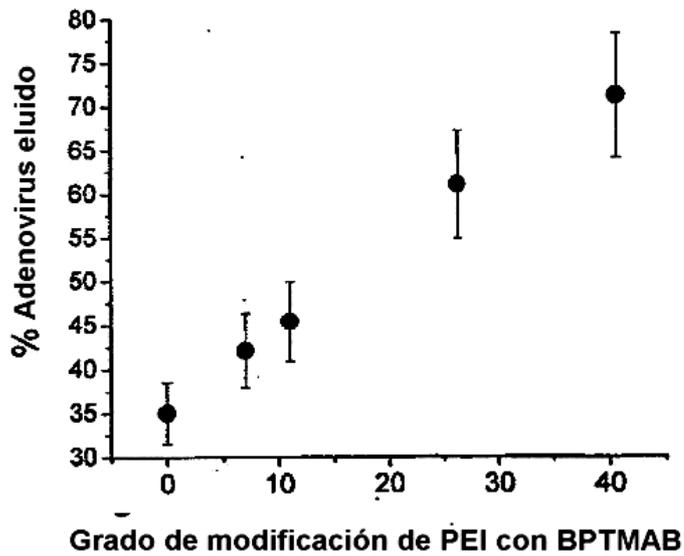


Figura 5. Porcentaje de Ad5 eluido (de la cantidad inicial) como función del grado de modificación de PEI con BPTAB valorado por la añadidura de peso.