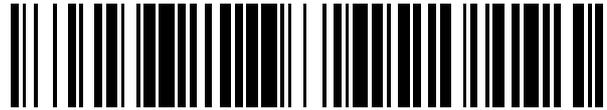


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 680**

51 Int. Cl.:

B01D 67/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009 E 09168000 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2157430**

54 Título: **Membrana de transferencia de wester, hidrófila, de alta unión a proteínas, con baja fluorescencia**

30 Prioridad:

18.08.2008 US 189302 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.03.2013

73 Titular/es:

**MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 CONCORD ROAD
BILLERICA MASSACHUSETTS 01821, US**

72 Inventor/es:

**PETERS, ANTONI;
GODDARD, PHILIP;
CHARKOUDIAN, JOHN;
SOICE, NEIL;
BREWSTER, DAVE y
DEDEO, ANJA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 397 680 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

Membrana de transferencia de Western, hidrófila, de alta unión a proteínas, con baja fluorescencia

Antecedentes de la invención

5 La “transferencia” o “electro-transferencia” se refiere al procedimiento usado para transferir muestras biológicas desde un gel a una membrana bajo la influencia de un campo eléctrico. El procedimiento requiere una membrana que pueda inmovilizar muestras biomoleculares para su detección posterior. Estos requisitos específicos situados sobre las membranas están relacionados con el área superficial, la porosidad y la capacidad de unión a proteínas.

10 La transferencia de Western es una modificación de esta técnica que implica la inmovilización de las proteínas sobre las membranas antes de la detección usando anticuerpos monoclonales o policlonales. Antes de la inmovilización de las proteínas sobre la membrana, las proteínas de la muestra se separan usando electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) para separar las proteínas nativas o desnaturalizadas. Después, las proteínas se transfieren o se electro-transfieren sobre una membrana, donde se exploran y finalmente se detectan usando anticuerpos específicos contra una proteína diana. Las membranas de transferencia de Western se fabrican normalmente con nitrocelulosa (NC) o con fluoruro de polivinilideno (PVDF). La especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno puede permitir identificar una sola proteína entre una mezcla compleja de proteínas.

15 Resumiendo, la transferencia de Western implica la aplicación de una muestra de proteínas (lisado) sobre un gel de poliacrilamida, la separación posterior de dicha mezcla compleja mediante electroforesis y la transferencia o “electro-transferencia” de las proteínas separadas sobre una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Después de la transferencia, la membrana se “bloquea” para impedir la unión no específica de anticuerpos a la superficie de la membrana. Los expertos en la técnica conocen muchas estrategias para marcar o etiquetar anticuerpos. En los protocolos más sencillos, las proteínas transferidas se incuban o forman complejos con un anticuerpo primario marcado con enzimas que ejerce de sonda. Después de bloquear los sitios de unión no específicos, se añade un sustrato adecuado al complejo con la enzima y conjuntamente reaccionan para formar productos cromogénicos, quimioluminiscentes o fluorogénicos detectables que permiten la detección visual, quimioluminiscente o fluorescente, respectivamente. Los esquemas de detección más sensibles utilizan fenómenos quimioluminiscentes o fluorescentes. En una detección quimioluminiscente, un complejo enzima-sustrato produce emisiones ópticas detectables (quimioluminiscencia). Estas emisiones se registran y se miden usando detectores adecuados, tales como dispositivos de película o fotónicos. La ausencia o presencia de señal indica si en el lisado está presente una proteína específica y la intensidad de la señal se relaciona con el nivel de la proteína de interés, que en algunos casos puede cuantificarse.

20 El uso de membranas de nitrocelulosa es común en un trabajo de ensayo de inmunodetección, particularmente en la transferencia de Western. Esto se debe en parte a cuestiones históricas y a la facilidad de su uso. Las membranas de transferencia de nitrocelulosa no requieren ninguna etapa de pre-humectación con líquidos orgánicos, un requisito para trabajar con membranas hidrófobas. Las membranas hidrófobas requieren una etapa de pre-humectación con alcohol seguida de una etapa de intercambio acuoso (para eliminar el alcohol), antes del ensamblaje dentro del ensamblaje de transferencia-mancha. Las membranas intrínsecamente hidrófobas permiten un periodo de tiempo limitado para este ensamblaje; la capacidad de secado de la membrana es significativa. Una vez seca, la membrana no puede volver a humedecerse salvo que se repita la secuencia de pre-humectación. Una vez que la membrana está en contacto con el gel, la eliminación antes de la transferencia puede dañar realmente al gel y a las muestras de proteínas separadas que contiene. La etapa de pre-humectación es lenta y puede bloquear considerablemente la dinámica de trabajo. Una membrana hidrófila permanecerá húmeda durante más tiempo y puede volver a humedecerse con agua si se seca antes del ensamblaje.

25 Las membranas de transferencia de nitrocelulosa pueden humedecerse con agua y muestran un rendimiento satisfactorio para la mayoría de las aplicaciones de transferencia. No obstante, la nitrocelulosa no es tan mecánica ni químicamente estable como lo es el PVDF. El PVDF conservará su integridad mecánica durante un periodo de tiempo más largo, mientras que la NC se volverá frágil y descolorida. Las transferencias con membranas de PVDF pueden separarse de los anticuerpos y pueden volver a explorarse. Las transferencias con NC no pueden hacerlo. La NC es propensa a la oxidación atmosférica, por lo que puede volverse tóxica. Requiere una corriente residual individual y cuando se desecha debe humedecerse con un agente humectante, normalmente agua.

30 Las membranas de transferencia de PVDF hidrófobas poseen una capacidad de unión a proteínas equivalente a la de las membranas de transferencia de NC, pero presentan mejor rendimiento de transferencia. En las mismas condiciones, pueden detectarse concentraciones de muestra mucho más reducidas sobre estas membranas de PVDF en comparación con las de NC. Las membranas de transferencia de PVDF hidrófobas con baja fluorescencia de fondo presentan la misma detección de muestras potenciada al permitir utilizar esquemas de detección por fluorescencia.

35 Los autores de la presente invención tienen en cuenta la publicación de patente internacional WO 03103814 (Millipore Corporation) que describe medios o membranas porosos con un revestimiento superficial que incluye un primer revestimiento de un terpolímero reticulado y un segundo revestimiento que comprende un copolímero o un

terpolímero modificado con un grupo funcional hidrófilo o hidrófobo con mejor combinación de propiedades, que incluyen propiedades adsorptivas resistentes a biomoléculas termoestables, resistencia a soluciones muy alcalinas y bajos niveles de material extraíble.

5 Los autores de la presente invención también tienen en cuenta la publicación de patente de Estados Unidos 2004/007459 (Applied Materials Inc.) que describe una célula de revestimiento electroquímico que tiene una membrana permeable diferenciada por difusión multinivel situada entre un compartimento anódico y un compartimento catódico. La membrana permeable diferenciada por difusión multinivel está generalmente configurada para separar el compartimento anódico del compartimento catódico, permitiendo que una solución fluida fluya a su través en una dirección desde el compartimento anódico hacia el compartimento catódico. En una
10 realización, una membrana permeable diferenciada por difusión multinivel comprende: una primera capa de membrana situada próxima a un ánodo de la célula de revestimiento electroquímico, siendo la primera capa de membrana una capa de disco de tipo porex; una segunda capa de membrana situada adyacente a la primera capa de membrana, siendo la segunda capa de membrana una membrana de tipo PVDF; y una tercera capa de membrana situada adyacente a la segunda capa de membrana, teniendo la tercera capa de membrana láminas y laminados de fibras. La primera capa de membrana se sitúa cerca del ensamblaje anódico, siendo la primera capa de membrana una capa Tyvek. La segunda capa de membrana se sitúa adyacente a la primera capa de membrana y es una capa de PVDF. La tercera capa de membrana se sitúa adyacente a la segunda capa de membrana y es una capa de HDPE con un espesor de aproximadamente 0,9 mm y un tamaño de poro de entre aproximadamente 12 μm y aproximadamente 50 μm .

20 Los autores de la presente invención también tienen en cuenta el artículo "Polypropylene-based membrane adsorbers via photo-initiated graft copolymerization: Optimizing separation performance by preparation conditions" (A. H. M. Yusof y M. Ulbricht), publicado en el Journal of Membrane Science, Elsevier Scientific Publ. Company. Amsterdam, PB, vol. 311, no. 1-2, 23 de diciembre del 2007 (23-12-2007), páginas 294-305. El artículo describe que la preparación de membranas de separación puede realizarse de manera muy eficaz con funcionalización superficial controlada. La copolimerización fotoiniciada de injerto selectiva de superficie puede realizarse usando un procedimiento de atrapamiento por el fotoiniciador benzofenona (BP), y usando ácido acrílico (AA) como monómero funcional se obtienen estructuras poliméricas en cepillo de débil intercambio catiónico sobre las superficies porosas de la membrana de polipropileno. La copolimerización del AA con acrilamida monomérica (AAm) "diluyente" y metilen-bis-acrilamida monomérica (MBAA) "reticulada" se realizó por variaciones de la capa injertada. El análisis composicional del copolímero de injerto se realizó usando espectroscopía FTIR-ATR. Las caracterizaciones del rendimiento se realizaron por mediciones de permeabilidad de membrana a pH bajo y alto así como a diferentes concentraciones salinas, por unión reversible de una proteína patrón (isozima), por pH transitorios inadvertidos en condiciones de cromatografía de membrana y por curvas de saturación por análisis de dispersión de sistemas. Se supone que el resultado más importante de este estudio es que la reticulación química dentro de las capas injertadas, aproximadamente con la misma cantidad de grupos funcionales que la de los polímeros injertados lineales, conduce a una mejora significativa del rendimiento adsorbedor de los poros ya que puede aumentarse la capacidad de unión dinámica a proteínas, la permeabilidad de membrana aumenta significativamente y su sensibilidad frente a cambios en pH eluyente y concentración salina disminuye mucho más y por consiguiente la dispersión de solutos dentro de la membrana se reduce como indican las curvas de saturación más
35 significativamente pronunciadas.

Sería por tanto deseable proporcionar una membrana de PVDF hidrófila, para ensayos de inmunodetección, tal como transferencia de Western, con características de rendimiento que se aproximen a límites de detección de muestra más bajos y a una fluorescencia de fondo baja que son característicos de las membranas de PVDF hidrófobas. La presente invención aborda estos requisitos.

45 **Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una membrana porosa que comprende una membrana de sustrato polimérico, estando dicha membrana de sustrato polimérico formada por un polímero seleccionado entre polímeros de sulfona aromáticos, politetrafluoroetileno, polímeros termoplásticos perfluorados, polímeros poliolefinicos, polietileno de ultra-alto peso molecular, poliamidas y fluoruro de polivinilideno. La membrana se caracteriza por tener en su superficie un revestimiento polimérico reticulado hidrófilo que comprende acrilamida y metilen-bis-acrilamida y por poder producirse a partir de una solución de reactante que contiene del 0,20 % al 2,0 % de acrilamida y del 0,20 % al 2,00 % de metilen-bis-acrilamida, y en la que:

dicha superficie tiene una capacidad de unión a proteína de 250-325 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; y
el nivel de carbono orgánico total medio de dicha membrana es inferior a 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; y
55 los niveles de monómero extraíbles son inferiores a 0,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la acrilamida e inferiores a 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la metilen-bis-acrilamida.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una membrana hidrófila, porosa, comprendiendo dicho procedimiento:

proporcionar un sustrato de membrana poroso hidrófobo formado a partir de un polímero seleccionado entre

polímeros de sulfona aromáticos, politetrafluoroetileno, polímeros termoplásticos perfluorados, polímeros poliolefinicos, polietileno de ultra-alto peso molecular, poliamidas y fluoruro de polivinilideno;
poner en contacto la superficie de dicha membrana porosa con una solución de reactante monomérico y un fotoiniciador;

- 5 eliminar dicha membrana de la solución de reacción;
eliminar el exceso de solución de reactante;
polimerizar dicha solución de reactante en condiciones anaerobias directamente sobre toda la superficie de la membrana porosa hidrófoba para formar un revestimiento hidrófilo continuo; y
secar dicha membrana.

- 10 El procedimiento se caracteriza porque dicha solución de reactante monomérico comprende del 0,20 % al 2,00 % de acrilamida y del 0,20 % al 2,00 % de metilen-bis-acrilamida, para formar así una membrana porosa que tiene:

una capacidad de unión a proteína de dicha superficie de 250-325 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; y
un nivel de carbono orgánico total medio de dicha membrana inferior a 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; y
niveles de monómero extraíbles inferiores a 0,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la acrilamida e inferiores a 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la metilen-bis-acrilamida.

- 15

La capacidad de unión a proteína puede medirse mediante un ensayo de unión a IgG.

Los niveles de monómero extraíbles pueden determinarse mediante HPLC.

- 20 Los expertos en la técnica de modificación de superficies con objeto de modificar energías de superficie de sustrato y en particular con respecto a superficies destinadas para ponerse en contacto con sistemas biológicos, estarán de acuerdo en que las modificaciones de superficies hidrófilas tradicionalmente presentan un comportamiento de unión a proteína más bajo. Las realizaciones desveladas en el presente documento se fundamentan en el descubrimiento fortuito e inesperado de que los polímeros espaciales derivados de mezclas de acrilamida monomérica y metilen-bis-acrilamida usados en la presente invención y formados usando reacciones de polimerización de radicales libres, pueden dar lugar a modificaciones superficiales que no son solamente hidrófilas, sino también demuestran un alto nivel de unión a proteína.

- 25

La mayor parte de la técnica anterior describe el uso de monómeros que contienen hidroxilo, normalmente polímeros de acrilato que contienen carbonilo éster, para producir modificaciones en la superficie de las membranas que tienen carácter hidrófilo y una alta resistencia para unirse a proteínas. Sin embargo, se sabe que los polímeros de dichos monómeros no son resistentes a soluciones alcalinas fuertes. Por ejemplo, una solución de hidróxido de sodio 1,0 normal hidrolizará los polímeros de acrilato que contienen carbonilo en polímeros que contienen ácido acrílico. Dichos polímeros que contienen ácido acrílico están iónicamente cargados en determinadas condiciones de pH, y atraerán y se unirán a proteínas o biomoléculas con carga opuesta, aumentando así la sorción y la contaminación de las membranas. Además, los polímeros que contienen ácido acrílico se hinchan en agua hasta un grado en el que los pasos de los poros se estrechan, reduciendo así la permeabilidad y productividad de las membranas. Además, los polímeros de monómeros que contienen hidroxilo, tales como los hidroxi acrilatos, reaccionan también en soluciones alcalinas fuertes y se degradan en fragmentos de bajo peso molecular solubles, que disuelven y exponen los medios o membranas de sustrato poroso subyacentes.

- 30
- 35

Los facultativos que intentan desarrollar membranas optimizadas para aplicaciones tanto de filtración como de no filtración en la industria farmacéutica y biotecnológica deben superar problemas significativos. Enfrentándose a exigencias respecto a coste, rendimiento y seguridad, un facultativo debe usar materiales y desarrollar procedimientos de fabricación que produzcan membranas que no solo tengan características de retención y flujo optimizadas sino que también sean económicas de producir, que cumplan con criterios asépticos, que sean estables a los diversos entornos químicos que normalmente se encuentran y que sean muy resistentes a la adsorción de biomoléculas, o se adsorban muy fuertemente, dependiendo del uso final deseado. Por tanto, en este caso, es muy deseable tener una modificación de membrana que de como resultado una superficie adsorbtiva biomolecular hidrófila que sea termoestable, resistente a la degradación por cualquier solución de reactivo potencial y que tenga niveles muy bajos de material capaz de extraerse de la misma.

- 40
- 45

Los resultados de unión a proteínas de investigaciones previas realizadas en modificaciones de superficies poliméricas de acrilamida mixtas indican que determinadas mezclas de monómeros reticulantes de bis-acrilamida hidrófila y acrilamidas monofuncionales neutras o cargadas pueden, cuando se copolimerizan usando técnicas de radicales libres iniciadas por haces de electrones o iniciadas por UV, producen modificaciones de la superficie hidrófila de alta unión a proteína. Sin embargo, antes de observar una morfología de transferencia puntual y un rendimiento de transferencia de mancha satisfactorios, los niveles de partida iniciales de cada monómero deben disminuir en gran medida.

- 50

Las realizaciones de la presente invención superan los problemas de la técnica anterior, ya que proporcionan una membrana hidrófila, particularmente adecuada para aplicaciones de transferencia, preferentemente transferencia de Western. Más específicamente, un sustrato de membrana hidrófobo previamente humedecido, preferentemente fabricado con PVDF, se pone en contacto con una solución monomérica y se somete a condiciones de

- 55

polimerización para hacer que el sustrato sea permanentemente hidrófilo.

La membrana resultante presenta fluorescencia de fondo baja, alta unión a proteínas, excelente retención de morfología de manchas de la muestra de proteína y un intervalo dinámico ampliado (una alta proporción de señal con respecto a ruido, mejor detectabilidad de la muestra). Cuando para la detección se usa quimioluminiscencia, el nivel de fluorescencia de fondo intrínseca de la membrana primaria, no modificada, no es crítico. La membrana demuestra un rendimiento comparable o superior en aplicaciones de transferencia de Western con respecto a las membranas de transferencia de nitrocelulosa convencionales, particularmente para la detección a bajas concentraciones de muestra y puede humedecerse directamente con agua, eliminando la necesidad de realizar una etapa de pre-humectación con alcohol antes de su uso. La membrana presenta una humectación completa, instantánea y uniforme tras ponerse en contacto con el agua y presenta una humectación prolongada cuando se pone en contacto con una solución acuosa, saturada, de cloruro de aluminio. Es decir, cuando dicha membrana se coloca sobre la superficie de esta solución acuosa, saturada, de cloruro de aluminio se humedece durante un intervalo de tiempo mínimo (no inferior a 1 segundo).

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1-3 son diagramas de resultados de transferencias de Western usando las membranas tratadas de acuerdo con determinadas realizaciones.

Descripción detallada

Las membranas modificadas desde el punto de vista hidrófilo de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación proporcionan plataformas de ensayo de inmunodetección que son comparables a, o presentan un rendimiento de transferencia superior, a las membranas de nitrocelulosa, particularmente con respecto a la expansión del extremo inferior del intervalo dinámico de la detectabilidad de muestra. Por ejemplo, en la FIGURA 1, los resultados de la transferencia de Western de un proceso de desarrollo típico demuestran diferencias en cuanto al rendimiento entre una membrana de transferencia de PVDF hidrófila de la presente invención, y los controles (membrana de PVDF hidrófoba - FL, y membrana de NC – Whatman/S y S BA-85). En la figura, cada tira horizontal contiene 5 transferencias de Western individuales; tres transferencias sobre muestras de desarrollo en PVDF hidrófilo y una transferencia en cada una de las membranas de control. Cada tira horizontal de 5 transferencias de Western es el resultado de una electroforesis y un experimento de transferencia (en cada experimento se procesaron 5 geles seguido de 5 transferencias). Para el diseño, cada experimento representa condiciones idénticas en cada gel/transferencia con idénticas cantidades de muestra de proteína (aplicado en 4 carriles a través de cada gel) antes de la electroforesis y transferencia. Los resultados mostrados son las manchas de transferencia registradas (quimioluminiscencia) para la detección de 2 proteínas (HSP70 y GAPDH) a partir de una mezcla de muestra compleja (lisado), aplicada a concentraciones decrecientes de muestra, de izquierda a derecha en cada gel y que corresponden a: 5 ug, 2,5 ug, 1,25 ug, 0,67 ug.

Las membranas porosas adecuadas incluyen las formadas a partir de polímeros de sulfona aromáticos, politetrafluoroetileno, polímeros termoplásticos perfluorados, polímeros poliolefinicos, polietileno de ultra alto peso molecular, poliamidas, incluyendo Nylon 6 y Nylon 66, y fluoruro de polivinilideno, siendo particularmente preferido el fluoruro de polivinilideno. Las membranas porosas incluyen membranas microporosas y membranas de ultrafiltración y están preferentemente en forma de láminas. Generalmente los tamaños de poro promedio incluyen los que se encuentran entre 0,001 y 10 micrómetros. Las membranas de transferencia son nominalmente materiales con un tamaño de poro de 0,45 um. Las membranas de partida preferidas tienen un intervalo de porosidad característico (volumen inicial) del 68-73 %. Las membranas de transferencia son tradicionalmente simétricas. Sin embargo, el revestimiento podría aplicarse a una membrana asimétrica.

El revestimiento polimérico puede ser un copolímero o un terpolímero formado a partir de al menos un monómero polifuncional modificado al menos con un grupo hidrófilo funcional, seleccionándose dicho monómero (o monómeros) polifuncional hidrófilo del grupo que consiste en acrilamidas polifuncionales, metacrilamidas polifuncionales y diacriolpiperazinas y formado a partir de al menos un monómero monofuncional modificado al menos con un grupo hidrófilo funcional, seleccionándose dicho monómero (o monómeros) monofuncional hidrófilo del grupo que consiste en acrilamidas monofuncionales, metilacrilamidas monofuncionales y acrilolpiperazinas.

Se observó que una membrana hidrófoba porosa, preferentemente fabricada con fluoruro de polivinilideno revestida con un copolímero de acrilamida - metilen-bis-acrilamida reticulado se hizo altamente hidrófilo. Adicionalmente, al nivel del copolímero que se aplicó a las muestras de membrana porosa de PVDF en series tempranas de la presente invención, los ensayos de unión a IgG revelaron niveles de unión a proteína próximos a 400 ug/cm². Este nivel es típico de una membrana primaria de PVDF hidrófoba y de membranas de nitrocelulosa convencionales. El primer resultado sorprendente fue que las membranas preparadas de esta manera eran hidrófilas y presentaban alta unión a proteínas. Sin embargo, el rendimiento de la transferencia de Western de estas muestras iniciales (las que presentaban este alto nivel de unión a proteína) no fue satisfactorio en cuanto al mantenimiento del tamaño de la mancha de muestra pequeña (morfología de la mancha) y en cuanto a la captura de la muestra en las transferencias de las manchas. Modificando el nivel de revestimiento del copolímero, se realizó un rendimiento de transferencia satisfactorio. A estos niveles modificados, los niveles de unión a proteína se redujeron a aproximadamente 250 y

325(00) ug/cm², aunque el rendimiento de la transferencia de Western ascendió a niveles intermedios entre la membrana de nitrocelulosa y la de PVDF hidrófoba preferida primaria. Sorprendentemente, los autores de la presente invención descubrieron que el nivel de unión a proteína no era el mejor o que solo era pronosticador de un rendimiento de membrana de transferencia Western. Sacrificando alguna capacidad de unión a proteína, modificando el nivel de revestimiento sobre el sustrato puede obtenerse un rendimiento de transferencia mejorado.

Por tanto, para obtener un rendimiento de ensayo de inmunodetección aceptable los niveles de los componentes y concentraciones relativas al modificar la formulación son críticos. Una concentración de sólidos global baja en una proporción de componente altamente específica equilibra rendimiento de agua-humectación frente al rendimiento de transferencia.

El nivel de fluorescencia de fondo bajo de la membrana sustrato se conserva. Sin embargo, si el nivel de química de modificación de superficie es demasiado bajo, el resultado es una membrana que no puede humedecerse con agua a un grado aceptable. Si el nivel de modificación de superficie es demasiado alto las membranas resultantes presentan energías de superficie extremadamente elevadas. Como se ha expuesto anteriormente, a niveles más altos de química de modificación de superficie, la capacidad de unión a proteína medida es generalmente equivalente a la de las membranas de nitrocelulosa y de PVDF hidrófoba, pero con malos resultados en cuanto a rendimiento de electrotransferencia.

De acuerdo con determinadas realizaciones, el nivel total de sólidos en la solución de modificación/reactante debe ajustarse a entre el 0,90 % y el 1,10 % en peso. Una concentración de sólidos total en este intervalo con la proporción de componentes especificados produce un rendimiento de transferencia óptimo. Esta formulación incluye un componente fotoiniciador UV.

Las cantidades adecuadas del monómero monofuncional de acrilamida y del monómero reticulante bis-acrilamida en la solución de reactante deben de ser entre el 0,20 % y el 2,00 % en peso (cada una), preferentemente con cantidades entre el 0,30 % y el 0,60 % en peso (cada una) y más preferentemente entre el 0,40 % y el 0,50 % en peso (inclusivo, cada una). La proporción preferida de acrilamida con respecto a bis-acrilamida de la solución de reactante monomérica es de aproximadamente 1:1 (masa/masa). La concentración monomérica global preferida de la solución de reactante de monómero de acrilamida:metilen-bis-acrilamida es entre el 0,5 % y el 1,5 % en masa. Un componente fotoiniciador UV adecuado está presente en 0,01 % al 0,20 % en peso preferentemente entre 0,02 y 0,15 % en peso, y más preferentemente entre 0,09 % y 0,11 % en peso. Los fotoiniciadores UV adecuados incluyen Irgacure 500, 754, 2959 y 819DW. Los procedimientos para la preparación del sustrato de membrana poroso modificado de acuerdo con determinadas realizaciones incluyen las etapas de proporcionar un sustrato de membrana poroso, poner en contacto la superficie de sustrato de membrana poroso con una solución de reactante que comprenda acrilamida y metilen-bis-acrilamida y un fotoiniciador adecuado, eliminar la membrana de la solución y polimerizar el revestimiento *in situ* sobre el sustrato de membrana exponiendo la misma a radiación de una longitud de onda e intensidad adecuadas durante un intervalo de tiempo adecuado. Preferentemente la membrana porosa que se ha puesto en contacto con la solución de reacción se irradia con una fuente de luz ultravioleta. Para reducir o eliminar longitudes de onda no deseables que puedan ocasionar daños a la membrana porosa pueden usarse filtros. Los expertos en la técnica deben conocer el tiempo de exposición a la luz ultravioleta y su intensidad.

En la realización preferida de la invención, se realiza una preparación a escala de laboratorio de la solución monomérica de reactante disolviendo 1,00 g de acrilamida, [H₂C=CH-C(O)-NH₂] monómero funcional, 0,80 g de metilen-bis-acrilamida, [H₂C(-NH-C(O)CH=CH₂)₂] monómero reticulante y 0,20 g de fotoiniciador Irgacure 2959 en 198,00 g de agua Milli-Q[®]. Se requiere un intervalo de mezcla prolongado de aproximadamente 2 horas para disolver completamente el reticulador y el fotoiniciador.

Más específicamente, la membrana de partida hidrófoba porosa se humedece previamente sumergiéndola en un líquido orgánico o en una solución acuosa del mismo que hinche o disuelva la membrana porosa y que se pre-humedezca toda la superficie porosa de la membrana.

El líquido puede ser un alcohol de bajo peso molecular, o una mezcla de agua y un líquido orgánico miscible. Los líquidos o composiciones adecuados incluyen metanol, etanol, isopropanol, mezclas de agua de los mismos, mezclas de acetona/agua y mezclas de tetrahidrofurano/agua de tensión superficial suficientemente baja para afectar a la humectación de toda la superficie de la membrana.

El objeto de esta etapa de pre-humectación es garantizar que toda la superficie de membrana se vuelva humectable al agua, y posteriormente a la solución monomérica del reactante acuoso. Después de la etapa de pre-humectación debe haber una etapa de intercambio riguroso con agua para eliminar la presencia del disolvente orgánico. Estos disolventes pre-humectantes o sus mezclas con agua pueden ejercer una influencia negativa sobre la polimerización deseada de los monómeros de reactante.

La inmersión posterior y una suave agitación de la membrana porosa humedecida con agua en la solución de reactante permiten que toda la superficie de la membrana porosa se humedezca con la solución de reactante. Siempre y cuando se elimine el exceso de agua de la membrana antes de la inmersión en la solución de reactante, no se producirá ninguna dilución significativa de la solución de reactante.

La muestra se retira después de un corto intervalo de tiempo (dos minutos) y el exceso de solución de reactante se elimina de la muestra de membrana. La membrana humedecida con la solución de reactante se expone anaeróticamente a radiación UV para efectuar la polimerización directamente sobre toda la superficie de la membrana porosa. La membrana revestida resultante presenta: Humectación inmediata, completa y totalmente uniforme cuando se pone en contacto sobre una superficie acuosa; Un alto nivel de rendimiento de transferencia de Western; Un alto nivel de unión a proteína ($\geq 250 \text{ ug/cm}^2$ a IgG) mediante ensayo radiomarcado; y una fluorescencia de fondo baja (aproximadamente 2000 ufr a longitudes de onda de excitación/emisión de 485 nm/535 nm usando un lector de fluorescencia TECAN GENios FL con una ganancia del detector ajustada a 86 y un programa informático de procesamiento Magellan 5,0), que es aproximadamente dos veces la fluorescencia de fondo de la membrana no tratada (hidrófoba primaria no modificada) en las mismas condiciones de medición. Cuando la membrana se coloca sobre la superficie de una solución acuosa de cloruro de aluminio saturada, se humedecerá por completo en un intervalo de tiempo mínimo no inferior a 1 segundo y en un intervalo de tiempo máximo que puede superar los 60 segundos.

Ejemplo 1

Una membrana de PVDF hidrófoba disponible en el mercado de Millipore Corporation (IPFL00000) se sumergió en alcohol metílico. La membrana se retiró y se sumergió en agua durante 1 minuto, agitando para extraer el metanol. La membrana se retiró y se sumergió en agua corriente durante un intervalo adicional de 2 minutos y después se colocó en agua corriente antes de sumergirla en una solución monomérica de reactante. El exceso de agua se drenó de la membrana y después se sumergió en una solución monomérica de reactante agitando suavemente durante 2 minutos. Después, ambos lados de la membrana se expusieron a radiación UV en un proceso de curado con UV a una velocidad lineal de 15 a 25 fpm. La membrana se recuperó y se colocó en un baño con agua para eliminar el monómero que no había reaccionado y los oligómeros y polímeros no adherentes. Las muestras se secaron bien al aire a temperatura ambiente durante una noche o bien en un horno estático impulsado por aire entre 60 °C y 80 °C durante 10 minutos o en una secadora de impacto a 90-110 °C a una velocidad lineal de 15 a 25 fpm. Se midió la media de extraíbles de la membrana, determinada mediante un procedimiento con TOC (Carbono Orgánico Total) interno, que era de aproximadamente $1,44 \text{ ug/cm}^2$, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 – Carbono Orgánico Total (TOC) - Cinco (5) discos de 47 mm.

Solicitante ID: ML6UJP37		Membrana de IPFL Hidrófila de PVDF Recibida			
Solicitante: Antoni Peters		Para Aplicaciones de Transferencia e Inmunoensayos			
		Ext. Para Análisis TOC			
		Extracción Por: A. Pervez			
		TOC Por: M Santos-Rosa y A. Pervez			
		Fecha: 16-19/10/2006			
Ext.	Temperatura Ext.	Tiempo Ext.	Vol. Ext.	Área Ext.	
Disolvente	[°C]	[Horas]	[g]	[cm²]	
Agua MilliQ	Temperatura Ambiente	24	40	86,75	
					Resumen
					Resultados
	TOC Ácido/Oxido	TOC	TOC Corregido	TOC	TOC
ID de Muestra	[µl/min]	[ppm C]	[ppm C]	[µg C]	[µg C/cm²]
Blanco Agua	0,20/0,20	0,0639			
T102 072806 A-MBAM/AC/I-2959	0,75/1,00	3,29	3,23	129	1,49
T102 072806 B-MBAM/AC/I-2959	0,75/1,00	291	2,85	114	1,31
T102 072806 C-MBAM/AC/I-2959	0,75/1,00	3,33	3,27	131	1,51

Los niveles monoméricos residuales extraíbles promedio se determinaron mediante HPLC. Como se indica en la Tabla 2, los valores se determinaron a partir de 3 muestras.

Tabla 2. Niveles Monoméricos Extraíbles Mediante HPLC – Mismas muestras que las mostradas en la Tabla 1.

Muestra	Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	MBAM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Irgacure 2959 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
T102 072806A	0,002	0,105	N.D.
T102 072806B	0,005	0,091	N.D.
T102 072806C	0,011	0,094	N.D.

Ejemplo 2

- 5 Para tratar membranas de PVDF que tenían las características, condiciones de tratamiento y soluciones de reactante mostradas en las Tablas 3A-D, 4A-D y 5A-D, se usó el procedimiento del Ejemplo 1

Tabla 3A

DATOS DE MODIFICACIÓN para Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila							
				Propiedades de la Membrana de Partida			
Nº de proceso	Nº de Lote de la Mezcla Monomérica	Datos del Lote de la membrana de partida	Temperatura del secador de formación de la membrana (F)	Espesor (um)	Porosidad (%)	Pt Bbl (psi)	Tiempo de Flujo (segundos)
PROCESO R – Sin ajuste de la mezcla - Longitud frente a la concentración de la mezcla de monómero							
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R01	R Mezcla 1	IPFL 071007 T214	300	112	72,8	9,4	56,0
R02	R Mezcla 1	IPFL 071007 T205	300	113	73,0	9,4	63,0
R03	R Mezcla 1	IPFL 071007 T205	300	113	73,0	9,4	63,0
R04	R Mezcla 1	IPFL 071007 T205	300	113	73,0	9,4	63,0
R05	R Mezcla 1	IPFL 071007 T205	300	113	73,0	9,4	63,0
R06	R Mezcla 1	IPFL 071007 T206	300	111	72,4	9,5	65,0
R07	R Mezcla 1	IPFL 071007 T206	300	111	72,4	9,5	65,0
R08	R Mezcla 1	IPFL 071007 T206	300	111	72,4	9,5	65,0
R09	R Mezcla 1	IPFL 071007 T206	300	111	72,4	9,5	65,0
R10	R Mezcla 1	IPFL 071007 T214	300	112	72,8	9,4	56,0
R11	R Mezcla 1	IPFL 071007 T214	300	112	72,8	9,4	56,0
R12	R Mezcla 1	IPFL 071007 T214	300	112	72,8	9,4	56,0
R12 Final	ND	ND	300	ND	ND	ND	ND

Tabla 3B

DATOS DE MODIFICACIÓN para Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila						
		Concentraciones del Componente de Mezcla Monomérica				
Nº de proceso	ID de la Muestra de la Mezcla Monomérica	AC Real % Peso (HPLC)	MBAM Real % Peso (HPLC)	1-2959 Real % Peso (HPLC)	Sólidos Totales Reales % Peso (HPLC)	Longitud Totalizada por Proceso
PROCESO R – Sin ajuste de la mezcla - Longitud frente a la concentración de la mezcla de monómero						
NA	R Mezcla 1 TAMBOR	0,5156	0,4214	0,1130	1,0500	0
R01	MM1 Inicial	0,5091	0,4042	0,1102	1,0235	0
R02	MM2	0,5105	0,3957	0,1094	1,0156	500
R03	MM3	0,5038	0,3837	0,1055	0,9931	800
R04	MM4	0,4996	0,3773	0,1001	0,9771	1100
R05	MM5	0,4948	0,3708	0,0999	0,9655	1250
R06	MM6	0,4935	0,3685	0,1020	0,9640	1550
R07	MM7	0,4868	0,3618	0,0995	0,9481	1850
R08	MM8	0,4868	0,3605	0,0974	0,9448	2150
R09	MM9	0,4777	0,3553	0,0956	0,9286	2300
R10	MM10	0,4721	0,3528	0,0956	0,9204	2600
R11	MM11	0,4673	0,3521	0,0932	0,9125	2900
R12	MM12	0,4682	0,3561	0,0918	0,9161	3200
R12 Final	MM13 Final	0,4574	0,3546	0,0879	0,8999	3300

Tabla 3C

DATOS DE MODIFICACIÓN para Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila										
			Condiciones de la Cámara UV							
Nº de Proceso	Presión de contacto en el pasillo (psi)	Presión de contacto en la pared (psi)	Velocidad Lineal (ft/min)	Tipo/Nº de Lámparas	Config. de las Lámparas	Flujo de N ₂ Superior/ Inferior (SCFM)	UV P1 Pulgadas HWC	UV P3 Pulgadas HWC	UV P2 Pulgadas HWC	Nivel de O ₂ Inicial (ppm)
PROCESO R – Sin ajuste de la mezcla - Longitud frente a la concentración de la mezcla de monómero										
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,0	1,6	1,0	90,0
R01	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	70,0
R02	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	56,7
R03	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	39,3
R04	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	33,0

ES 2 397 680 T3

(continuación)

PROCESO R – Sin ajuste de la mezcla - Longitud frente a la concentración de la mezcla de monómero										
R05	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	28,8
R06	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	27,8
R07	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	26,9
R08	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	26,4
R09	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	27,4
R10	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	25,2
R11	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	27,1
R12	20	20	20	H/4	Escalonada	10/9,5	1,1	1,7	1,1	27,8
R12 Final	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	1,7	1,1	25,2

Tabla 3D

DATOS DE MODIFICACION para Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila												
Nº de Proceso	Humidificación con Agua Verificación de la Velocidad	Humidificación con Agua Verificación de Red-X Uniforme	Humidificación con Agua Verificación de Paso	Humidificación Salina Tiempo Segundos	Fluorescencia BKG RFU	Control de Calidad de Transferencia Aprobado/Reprobado	Transferencia de Western Lisado Vivo					
PROCESO R – Sin ajuste de la mezcla - Longitud frente a la concentración la mezcla de monómero												
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥NC
R01	Y	Y	Y	4,7	ND	3,0	3,0	3,7	1750,57	Aprobado Banda 9	≥NC	≥NC
R02	Y	Y	Y'	1,4	2,4	2,4	2,4	2,1	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R03	Y	Y	Y	1,4	2,4	2,4	2,4	2,1	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R04	Y	Y	Y	2,1	2,2	2,2	2,5	2,3	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R05	Y	Y	Y	2,9	3,1	2,9	2,9	3,0	2015,63	Aprobado Banda 9	≥NC	≥NC
R06	Y	Y	Y	2,2	2,3	2,3	2,3	2,3	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R07	Y	Y	Y	4,1	3,9	4,0	4,0	4,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R08	Y	Y	Y	2,3	3,7	3,2	3,2	3,1	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R09	Y	Y	Y	5,7	7,3	5,3	5,3	6,1	1927,95	Aprobado Banda 9	≥NC	≥NC
R10	Y	Y	Y	5,4	7,1	5,4	5,4	6,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R11	Y	Y	Y	6,3	7,5	5,6	5,6	6,5	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC	≥NC
R12	Y	Y	Y	8,5	7,8	7,6	7,6	8,0	1708,5	Aprobado Banda 9	≥NC	≥NC
R12 Final	Y	Y	Y	16,7	16,5	16,3	16,3	16,5	ND	ND	≥NC	≥NC

Tabla 4A

DATOS DE MODIFICACIÓN DE MEMBRANA - Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila					
Segmento de Proceso	Nº de Proceso	Nº de Lote de la Mezcla Monomérica	Datos de Lote de Membrana de Partida	Temperatura del Secador del Tratamiento Térmico T o Modo Línea	Temperatura del secador de formación de la membrana (F)
PROCESO S – POROSIDAD/ESPESOR/TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL					
ND	ND	ND	ND		
Ensayo	R01	S Mezcla 1	IPFL 071007 T203	205	300
S1	R02	S Mezcla 1	IPX 070907 R103	205	300
S1	R03	S Mezcla 1	IPX 091407 T103	205	310
S1	R04	S Mezcla 1	IPX 120307T107	205	300
S1	R05	S Mezcla 1	IPX 091407 T102	205	310
S1	R06	S Mezcla	IPX 070907 R105	204	300
S2	R07	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	200	300
S2	R08	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	Transición	300
S2	R09	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	205	300
S2	R10	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	Transición	300
S2	R11	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	210	300
S2	R12	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	210	300
S2	R13	S Mezcla 1	IPX 120307 T107	210	300
Segmento 1 Variación de propiedades de membrana de partida					
Segmento 2 Variación de la velocidad lineal y de la temperatura del secador					

Tabla 4B

DATOS DE MODIFICACIÓN DE MEMBRANA - Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrofílica										
Segmento de Proceso	N° de Proceso	Propiedades de Membrana de partida			Tiempo de Flujo (segundos)	Muestras de Mezcla Monoméricas y Concentraciones de Componente de la Mezcla				
		Espesor (um)	Porosidad (%)	Pt Bbl (psi)		AC Real % Peso (HPLC)	MBAM Real % Peso (HPLC)	I-2959 Real % Peso (HPLC)	Sólidos Totales Reales % Peso (HPLC)	Longitud Totalizada por Proceso
PROCESO S – POROSIDAD/ESPESOR/TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL										
ND	ND	ND	ND	ND	ND					
Ensayo	R01	112	72,8	9,6	61,0	MM1 C Inicial	0,4926	0,3877	0,1005	0,9808
S1	R02	115	74,8	9,3	55,0	MM2B	0,4893	0,3849	0,0996	0,9738
S1	R03	115	66,4	9,6	59,0	MM3B	0,4812	0,3785	0,0971	0,9568
S1	R04	126	72,9	9,4	65,0	MM4B	0,4780	0,3760	0,0963	0,9503
S1	R05	122	66,2	11,1	78,3	MM5B	0,4761	0,3733	0,0954	0,9448
S1	R06	130	74,7	10,7	74,0	MM6B	0,4785	0,3757	0,0953	0,9495
S2	R07	126	72,9	9,4	65,0	MM7B	0,4699	0,3678	0,0934	0,9311
S2	R08	126	72,9	9,4	65,0	MM8B	0,4673	0,3656	0,0926	0,9255
S2	R09	126	72,9	9,4	65,0	MM9B	0,4660	0,3644	0,0925	0,9229
S2	R10	126	72,9	9,4	65,0	MM10B	0,4655	0,3637	0,0917	0,9209
S2	R11	126	72,9	9,4	65,0	MM11B	0,4642	0,3619	0,0910	0,9171
PROCESO S – POROSIDAD/ESPESOR/TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL										
S2	R12	126	72,9	9,4	65,0	MM12B	0,4618	0,3598	0,0903	0,9119
S2	R13	126	72,9	9,4	65,0	MM13B	No Disponible	No Disponible	No Disponible	No Disponible
Segmento 1 Variación de propiedades de membrana de partida										
Segmento 2 Variación de la velocidad lineal y de la temperatura del secador										

Tabla 4C

DATOS DE MODIFICACIÓN DE MEMBRANA - Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila									
					Condiciones de la Cámara de UV				
Segmento de Proceso	Nº de Proceso	Presión de contacto en el pasillo (psi)	Presión de contacto en la pared (psi)	Velocidad Lineal (ft/min)	Flujo de N ₂ Superior/ Inferior (SCFM)	UV P1 Pulgadas HWC	UV P3 Pulgadas HWC	UV P2 Pulgadas HWC	Nivel de O ₂ Inicial (ppm)
PROCESO S – POROSIDAD/ESPESOR/TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL									
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ensayo	R01	20	20	20	10/9,5	1,0	1,5	1,1	15,0
31	R02	20	20	20	10/9,5	1,0	1,5	1,1	42,0
S1	R03	20	20	20	10/9,5	1,0	1,5	1,1	40,0
S1	R04	20	20	20	10/9,5	1,0	1,5	1,1	40,0
S1	R05	20	20	20	10/9,5	1,0	1,5	1,1	40,0
S1	R06	20	20	20	10/9,5	1,0	1,5	1,1	40,0
S2	R07	20	20	22	10/9,5	1,0	1,4	1,1	53,7
S2	R08	20	20	20	10/9,5	1,0	1,4	1,1	39,1
S2	R09	20	20	20	10/9,5	1,0	1,4	1,1	37,6
S2	R10	20	20	18	10/9,5	1,0	1,4	1,1	33,0
S2	R11	20	20	18	10/9,5	1,0	1,4	1,1	30,5
S2	R12	20	20	20	10/9,5	1,0	1,4	1,1	24,9
S2	R13	20	20	25	10/9,5	1,0	1,4	1,1	25,2
Segmento 1 Variación de propiedades de membrana de partida									
Segmento 2 Variación de la velocidad lineal y de la temperatura del secador									

Tabla 4D
DATOS DE MODIFICACIÓN DE MEMBRANA - Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrofílica

Segmento de Proceso	Nº de Proceso	Humidificación con Agua Verificación de la Velocidad	Humidificación con Agua Verificación de Red-X Uniforme	Humidificación con Agua Verificación de Paso	Humidificación Salina Tiempo Segundos	Fluorescencia BKG RFU	Control de Calidad de Transferencia Aprobado/Reprobado	Transferencia de Western Lisado Vivo				
PROCESO S – POROSIDAD/ESPESOR/TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL												
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ensayo	R01	Y	Y	Y	8,2	8,8	4,9	7,3	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S1	R02	Y	Y	Y	26,2	15,2	5,3	15,6	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S1	R03	Y	Y	Y	4,2	4,2	2,9	3,8	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S1	R04	Y	Y	Y	5,4	13,6	10,3	9,8	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S1	R05	Y	N	N	7,8	4,6	5,7	6,0	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S1	R06	Y	Y	Y	12,7	8,0	9,9	10,2	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R07	Y	Y	Y	>120*	90,0	25,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R08	Y	Y	Y	>120*	>120	40,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R09	Y	Y	Y	>120*	>120	30,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R10	Y	Y	Y	>120*	>120	55,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R11	Y	Y	Y	>120*	>120	80,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R12	Y	Y	Y	>120*	>120	80,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
S2	R13	Y	Y	Y	>120	>120	55,0	No Significativo	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
Segmento 1 Variación de propiedades de membrana de partida												
Segmento 2 Variación de la velocidad lineal y de la temperatura del secador												

Tabla 5A

DATOS DE MODIFICACIÓN PARA Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila						
Segmento de Proceso	Nº de Proceso	Nº de Lote de la Mezcla Monomérica	Datos de Lote de Membrana de Partida	Longitud Buena	Temperatura del Secador del Tratamiento Térmico T o Modo Línea	Temperatura del secador de formación de la membrana (F)
PROCESO T – POROSIDAD/ESPESOR, TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL						
1	ND	010908M1 TAMBOR		0	NA	NA
1	ND	010908M1 -MM1 Tanque		0	NA	NA
1	ND	010908M1 -MM2 Tanque Diluido		0	NA	NA
1	R01	010908M1	IPVH 050107 T101 B	155	200	
1	R02	010908M1	IPFL 071007 T203	90	200	300
2	R03	1010908M1	IPX 120307 T109	90	200	300
2	R04	010908M1	IPX 120307 T109	90	200	300
2	R05	010908M1	IPX 120307 T109	90	Transición	300
2	R06	010908M1	IPX 120307 T109	90	220	300
2	R07	010908M1	IPX 120307 T109	90	215	300
2	R08	010908M1	IPX 120307 T109	90	215	300
2	R09	010908M1	IPX 120307 T109	90	Transición	300
2	R10	010908M1	IPX 120307 T109	90	220	300
3	R11	010908M1	IPX 091407 T101	10	205.4	300
3	R12	010908M1	IPX 071007 T213	90	205.5	300
3	R13	010908M1	IPX 120307 T104	90	205.8	300
3	R14	010908M1	IPX 070907 T105	90	206.1	300
3	R15	010908M1	IPX 070907 R102	90	205	300
3	R16	010908M1	IPX 070907 R106	90	205	300
3	R17	010908M1	IPX 120307 R110	90	205	300
3	NA	010908M1	ND	0	205	
Segmento 1 Diagnóstico						
Segmento 2 Temperatura de Secador y Variación de Velocidad Lineal						
Segmento 3 Porosidad y Variación de espesor – Membrana de partida						

Tabla 5B

DATOS DE MODIFICACIÓN PARA Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrofílica												
Segmento de Proceso	N° de Proceso	Propiedades de la Membrana de partida		Porosidad (%)	Pt Bbl (psi)	Tiempo de Flujo (segundos)	Muestras de Mezcla Monomérica y Concentraciones de Componentes			Sólidos Totales Reales % Peso (HPLC)	Longitud Totalizada por Proceso	
		Espesor (um)					AC Real % Peso (HPLC)	MBAM Real % Peso (HPLC)	I-2959 Real % Peso (HPLC)			
PROCESO T – POROSIDAD/ESPESOR, TEMPERATURA DE SECADOR VMF4 - VELOCIDAD LINEAL												
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	TAMBOR	0,76	0,60	0,15	1,51	0
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	MM1	0,75	0,58	0,15	1,48	0
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	MM2 de partida	0,51	0,40	0,10	1,00	0
1	R01	109-125	No Disponible	No Disponible	No Disponible	No Disponible	No Extraída	ND	ND	ND	ND	375
1	R02	112	72,8	9,6	61,0	No Disponible	No Extraída	ND	ND	ND	ND	675
2	R03	120	71,0	9,5	63,0	63,0	MM3	0,50	0,39	0,10	0,99	775
2	R04	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	875
2	R05	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	975
2	R06	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1075
2	R07	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1175
2	R08	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1275
2	R09	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1375
2	R10	120	71,0	9,5	63,0	63,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1675
3	R11	118	66,7	8,3	46,7	46,7	MM4	0,48	0,38	0,09	0,96	1775
3	R12	116	72,3	9,0	56,0	56,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1875
3	R13	119	72,4	9,7	66,0	66,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	1975
3	R14	130	74,7	10,7	74,0	74,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	2075
3	R15	134	73,4	9,9	65,0	65,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	2175
3	R16	114	72,4	9,7	67,0	67,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	2275

(continuación)

PROCESO T – POROSIDAD/ESPESOR, TEMPERATURA DE SECADOR VMF4 - VELOCIDAD LINEAL											
3	R17	113	70,2	9,4	61,0	No Extraída	ND	ND	ND	ND	2375
3	ND	ND	ND	ND	ND	MM5	0,47	0,37	0,09	0,94	2675
Segmento 1 Diagnóstico											
Segmento 2 Temperatura de Secador y Variación de Velocidad Lineal											
Segmento 3 Porosidad y Variación de espesor – Membrana de partida											

Tabla 5C

DATOS DE MODIFICACIÓN PARA Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila									
Segmento de Proceso	Nº de Proceso	Presión de contacto en el pasillo (psi)	Presión de contacto en la pared (psi)	Velocidad Lineal (ft/min)	Condiciones de la Cámara de UV				Nivel de O ₂ Inicial (ppm)
					Flujo de N ₂ Superior/ Inferior (SCFM)	UV P1 Pulgadas HWC	UV P3 Pulgadas HWC	UV P2 Pulgadas HWC	
PROCESO T – POROSIDAD/ESPESOR/TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL									
1	NA	20	20	NA	ND	ND	ND	ND	ND
1	NA	20	20	NA	ND	ND	ND	ND	ND
1	NA	20	20	NA	ND	ND	ND	ND	ND
1	R01	20	20	18	10/9,5	0,9	1,4	1,0	52,0
1	R02	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	77,0
2	R03	20	20	22-20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	78,0
2	R04	20	20	18	10/9,5	0,9	1,4	1,0	44,0
2	R05	20	20	18	10/9,5	0,9	1,4	1,0	32,0
2	R06	20	20	18	10/9,5	0,9	1,4	1,0	32,0
2	R07	20	20	22-20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	30,0
2	R08	20	20	18	10/9,5	0,9	1,4	1,0	26,0
2	R09	20	20	18-20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	20,0
2	R10	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	22,0
3	R11	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	38,0
3	R12	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	34,0
3	R13	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	41,0
3	R14	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	21,0
3	R15	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	21,0
3	R16	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	21,0
3	R17	20	20	20	10/9,5	0,9	1,4	1,0	21,0
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Segmento 1 Diagnóstico									
Segmento 2 Temperatura de Secador y Variación de Velocidad Lineal									
Segmento 3 Porosidad y Variación de espesor – Membrana de partida									

Tabla 5D

DATOS DE MODIFICACIÓN PARA Membrana de Transferencia de Western de PVDF Hidrófila													
Segmento de Proceso	Nº de Proceso	Humidificación con Agua Verificación de la Velocidad	Humidificación con Agua Verificación de Red-X Uniforme	Humidificación con Agua Verificación de Paso	Nivel de Moteado Verificación	Opacidad/Transparencia Verificación	Humidificación Salina Tiempo Segundos	Fluorescencia BKG RFU	Control de Calidad de Transferencia Aprobado/Reprobado	Transferencia de Western Lisado Vivo			
PROCESO T – POROSIDAD/ESPESOR, TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL													
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	R01	Y	Y	Y	Y	Y	2,4/5,6	3,4/6,2	3,1/6,2	3,0/6,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
1	R02	Y	Y	Y	Y	Y	2,9/12,6	3,2/11,4	2,9/2,9	3,0/9,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R03	Y	Y	Y	Y	Y	1,1/24,1	1,4/10,8	1,1/4,1	1,2/13,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R04	Y	Y	Y	Y	Y	1,2/14,5	1,5/19,9	1,3/5,6	1,3/13,3	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R05	Y	Y	Y	Y	Y	1,3/10,5	1,5/15,4	1,3/4,2	1,4/10,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R06	Y	Y	Y	Y	Y	1,3/24,7	1,4/9,5	1,3/4,0	1,3/12,7	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R07	Y	Y	Y	Y	Y	2,5/60,0	2,3/25,4	2,5/5,4	2,4/30,0	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R08	Y	Y	Y	Y	Y	2,1/9,7	2,6/14,0	2,6/5,5	2,8/9,7	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R09	Y	Y	Y	Y	Y	2,8/13,1	3,5/22,6	2,5/5,9	2,9/9 3,9	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
2	R10	Y	Y	Y	Y	Y	3,1/28,7	3,5/15,7	2,5/7,1	3,0/17,2	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	R11	Y	Y	Y	Y	Y	24,1	6,5	4,2	11,6	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	R12	Y	Y	Y	Y	Y	47,1	35,7	8,6	30,5	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	R13	Y	Y	Y	Y	Y	67,9	70,7	34,5	57,7	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	R14	Y	Y	Y	N (ALTO)	N (Blanco)	>180	>180	>180	>180	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC

(continuación)

PROCESO T – POROSIDAD/ESPESOR, TEMPERATURA DEL SECADOR VMF4, VELOCIDAD LINEAL															
3	R15	Y	Y	Y	Y	N (ALTO)	N (Blanco)	>180	>180	>180	>180	>180	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	R16	Y	Y	Y	Y	N (ALTO)	Y	>180	57,3	16,4	>180	>180	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	R17	Y	Y	Y	Y	Y	Y	19,3	40,8	5,1	21,7	N/Disponible.	N/Disponible.	N/Disponible.	≥NC
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Segmento 1 Diagnóstico															
Segmento 2 Temperatura de Secador y Variación de Velocidad Lineal															
Segmento 3 Porosidad y Variación de espesor – Membrana de partida															

Ejemplo 3

El protocolo usado para la transferencia de Western y para la detección quimioluminiscente es el siguiente:

- Las muestras de proteínas se separan electroforéticamente usando un gel en gradiente midi Bis:Tris (4~12 %) (Invitrogen, WG1402BOX).
- 5 • Las muestras se electro-transfieren a 45 V durante 1h 15m usando un aparato de transferencia de tanque BioRad (Criterio de Transferencia N° 165-6024) sobre una membrana hidrófila preparada como se indica en el Ejemplo 1.
- Las manchas se lavan 2x (3 min cada una) en TBS-T (Tween al 0,1 %)
- 10 • Las manchas se bloquean durante 1 h a TA en TBS-T con NFM (leche descremada, *non fat milk*, Carnation) al 3 %
- Las manchas se lavan 2x (3 min cada una) en TBS-T (Tween al 0,1 %)
- Las manchas se incuban con anticuerpo primario en TBS-T durante 1 h.
- Las manchas se lavan 3x (5 min cada una) en TBS-T (Tween al 0,1 %)
- Las manchas se incuban con anticuerpo secundario en TBS-T durante 1 h.
- 15 • Las manchas se lavan 4x (5 min cada una) en TBS-T (Tween al 0,1 %)
- Las bandas de proteínas se visualizan usando ECL (Millipore Immobilon-HRP) y película de rayos X.

Este protocolo se usó sobre las muestras preparadas en el Ejemplo 2 y los resultados de la transferencia se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

20 Los resultados de la transferencia de Western de un proceso de desarrollo típico demuestran las diferencias de rendimiento entre la membrana de transferencia de PVDF hidrófila de la presente invención y los controles (membrana FL – hidrófoba de PVDF y membrana NC – Whatman/S y S BA-85). En las figuras, cada tira horizontal contiene 5 manchas de transferencia de Western separadas; tres manchas en muestras de desarrollo de PVDF hidrófila y una mancha en cada una de las membranas de control. Cada tira de 5 manchas Western es el resultado de un experimento de electroforesis y de transferencia (se procesaron 5 geles en cada experimento). Por diseño,

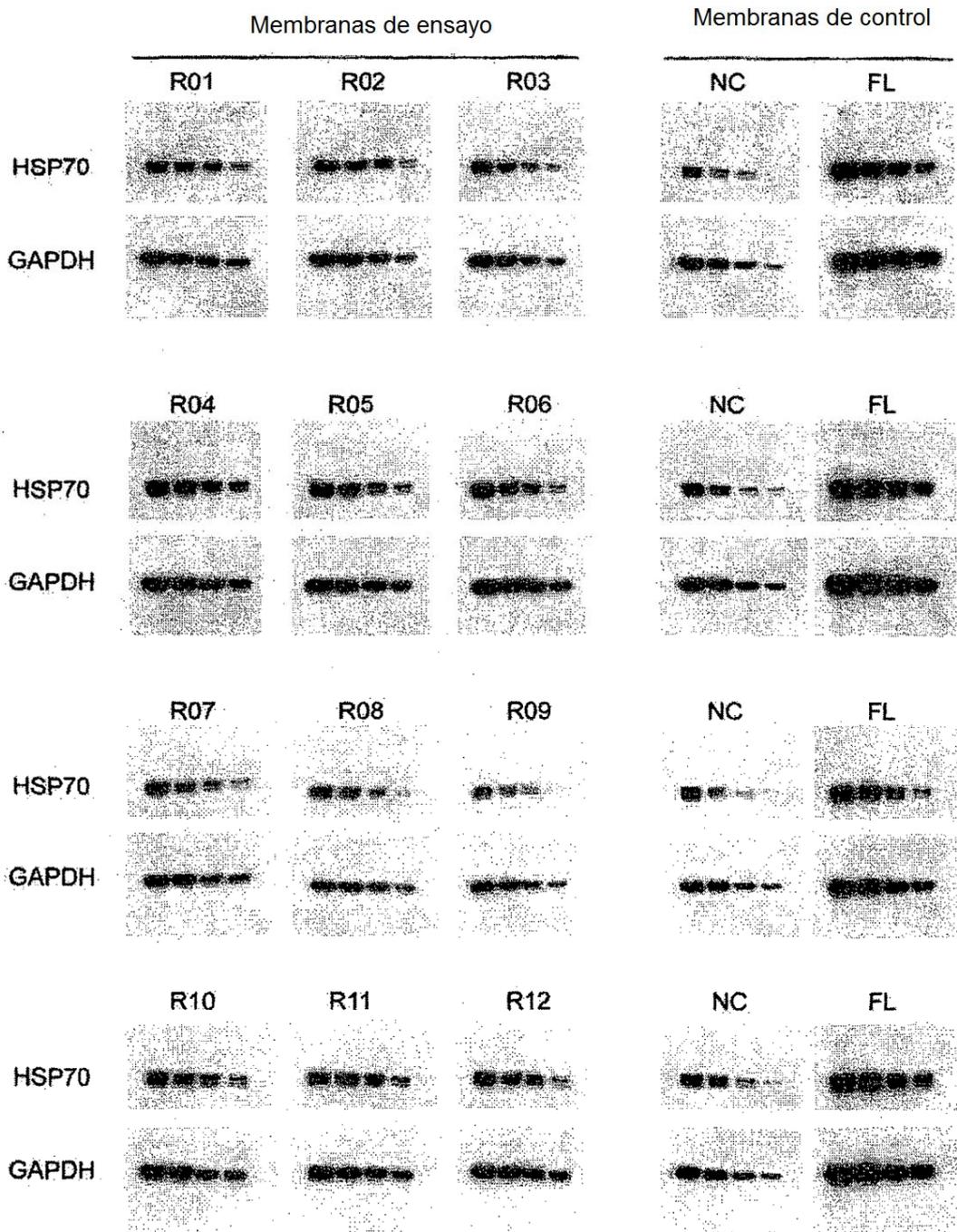
25 cada experimento representa condiciones idénticas con idénticas cantidades de muestra de proteína (aplicada en 4 carriles a través de cada gel) antes de la electroforesis y transferencia. Los resultados mostrados son las manchas de transferencia para la detección de 2 proteínas (HSP70 y GAPDH) de una mezcla de muestra compleja (lisado), aplicada a sólidos de muestra en disminución (concentraciones), de derecha a izquierda y correspondiente a: 5 ug, 2,5 ug, 1,25 ug, 0,67 ug.

30 Obsérvese que en cada fila, se compara el resultado de una sola electroforesis y experimento de electrotransferencia, tres membranas de transferencia hidrófilas de la presente invención, con dos membranas de transferencia de control. Un control consiste en una membrana de transferencia de nitrocelulosa (NC) y el otro control es una membrana de transferencia de PVDF hidrófoba (FL). En el caso de cada experimento individual, la membrana de FL demuestra que existe una intensidad de señal más alta para las cuatro titulaciones de la solución

35 de proteína analito, y la membrana de NC demuestra una intensidad de señal más baja. Puede observarse, cuando se comparan los tramos de señal entre las membranas de transferencia de control de NC y las membranas de transferencia de PVDF hidrófilas de la invención, que a titulaciones de muestra analito más altas (lado izquierdo de cada mancha) las membranas de NC y las de PVDF hidrófilas presentan tramos de señal similares. Sin embargo, con el avance a titulaciones de muestra analito cada vez menores (progresando de izquierda a derecha), los tramos de señal disminuyen más rápidamente para la membrana de NC. Esto demuestra que, comparada con la membrana

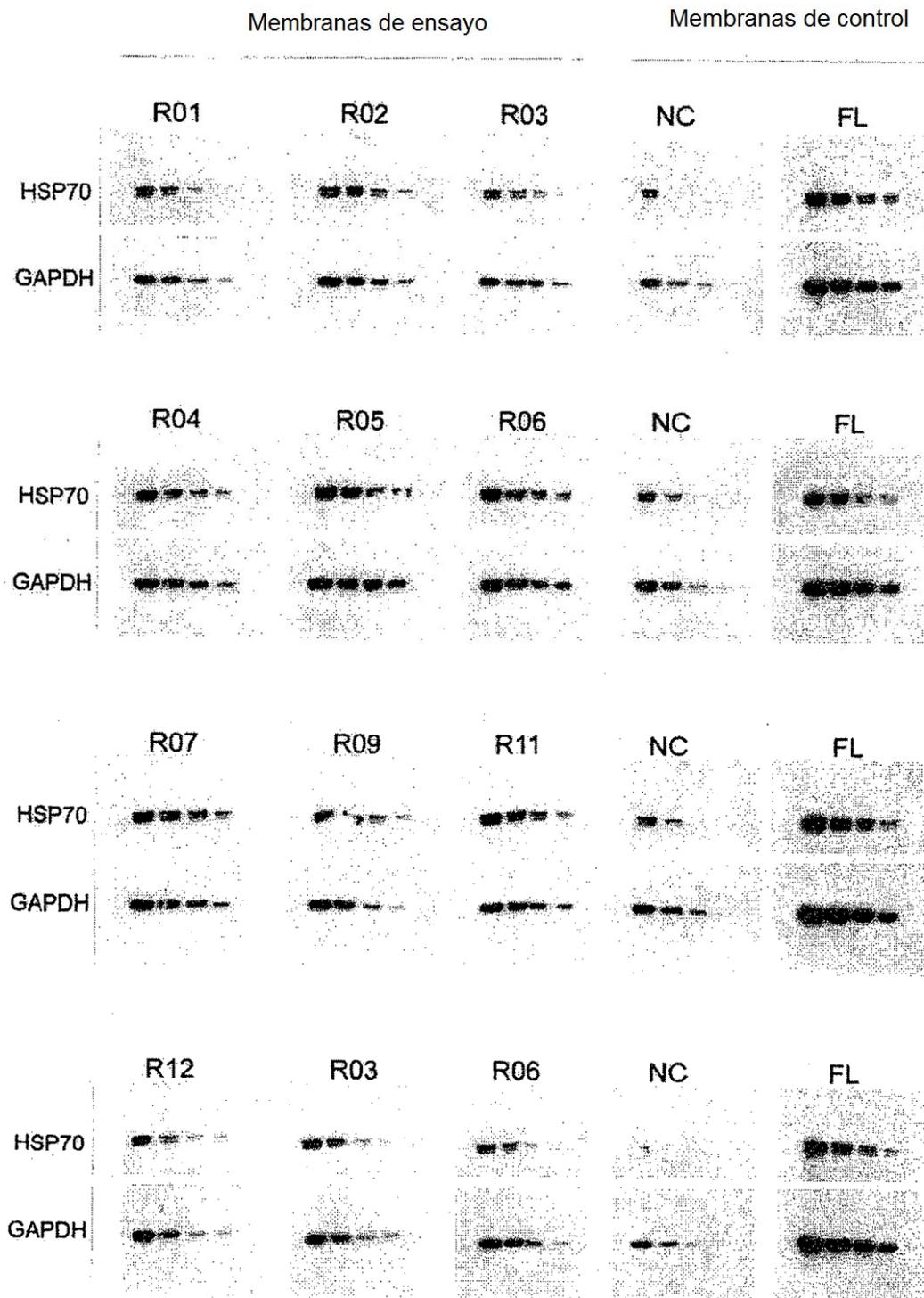
40 de NC, la membrana de PVDF hidrófila permite una detección de muestra a menores concentraciones de proteína.

Figura 1 Resultados de transferencias de Western del proceso R.



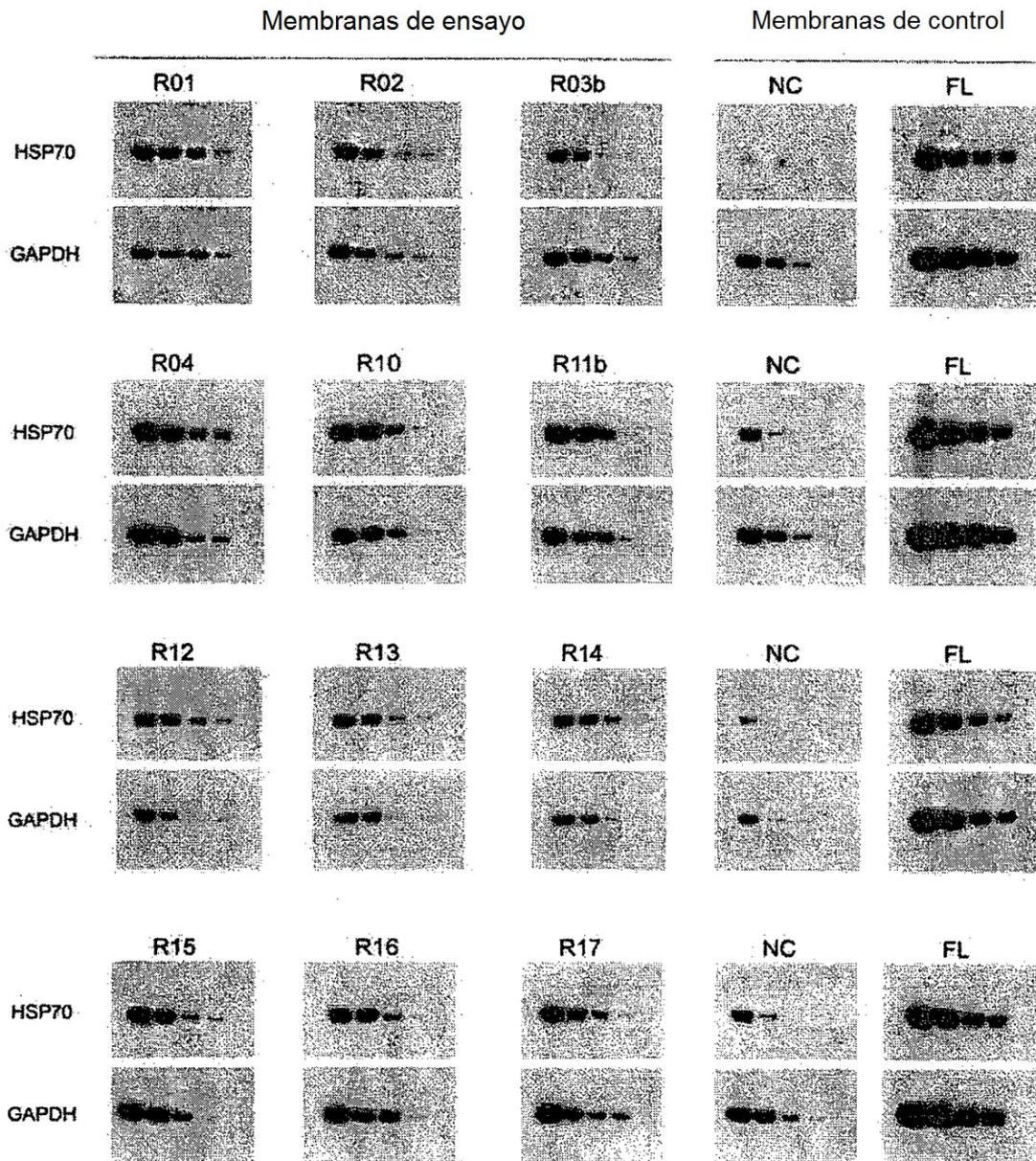
Los resultados corresponden a las condiciones del proceso proporcionadas en la Tabla 1.

Figura 2. Resultados de transferencias de Western del proceso S



Los resultados corresponden a las condiciones del proceso proporcionadas en la Tabla 2.

Figura 3 Resultados de transferencias de Western del proceso T



Los resultados corresponden a las condiciones del proceso proporcionadas en la Tabla 3