

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 160**

51 Int. Cl.:

B01D 69/02 (2006.01)

B01D 71/68 (2006.01)

B01D 67/00 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2006 E 06255274 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1775016**

54 Título: **Membranas de ultrafiltración convertidas en hidrofílicas mediante hidroxialquil celulosa, procedimiento de fabricación y aplicación de dichas membranas**

30 Prioridad:

14.10.2005 US 726745 P

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

14.05.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOYA, WILSON y
KOZLOV, MIKHAIL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 403 160 T3

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

DESCRIPCIÓN

Membranas de ultrafiltración convertidas en hidrofílicas mediante hidroxialquil celulosa, procedimiento de fabricación y aplicación de dichas membranas

- 5 La invención se relaciona con membranas que tienen al menos una capa de ultrafiltración, con un nuevo método de fabricar dichas membranas y con el uso de las membranas. Más particularmente, la invención se relaciona con membranas de ultrafiltración que tienen una superficie hidrofílica modificada, su método de obtención y su uso para eliminar virus de una solución biomolecular.

Antecedentes de la invención

- 10 Las membranas de ultrafiltración y microporosas se utilizan en procesos de filtración a presión. Profesionales del campo de los procesos de separación mediante membranas diferencian fácilmente entre membranas microporosas y de ultrafiltración y generalmente distinguen entre ellas basándose en su aplicación y aspectos de su estructura. Las membranas microporosas y de ultrafiltración se fabrican, venden y usan como productos separados y distintos. A pesar de algo de solapamiento en nomenclatura, son entidades separadas, y son tratadas como tales en el mundo comercial.

- 15 Las membranas de ultrafiltración se utilizan principalmente para concentrar o diafiltrar macromoléculas solubles tal como proteínas, ADN, virus, almidones y polímeros naturales o sintéticos. En la mayoría de los usos, la ultrafiltración se realiza en el modo de filtración de flujo tangencial (TFF), donde el líquido de alimentación se pasa a través de la superficie de membrana y aquellas moléculas menores que el tamaño de poro de la membrana pasan a través (filtrado) y las moléculas que quedan (retenido) son retenidas en la primera cara de la membrana (aguas arriba). Como también pasa a través fluido existe la necesidad de reciclar o añadir al retenido flujo para mantener una operación TFF eficiente. Una ventaja de utilizar una aproximación TFF es que como el fluido es arrastrado constantemente a través de la cara de la membrana éste tiende a reducir la contaminación y la polarización de los solutos, en y cerca de la superficie de la membrana, conduciendo a una vida más extensa de la membrana. Las membranas de ultrafiltración también pueden utilizarse en modo de filtración sin salida. La filtración sin salida se refiere a la filtración donde la corriente de fluido entera a filtrar pasa a través del filtro sin flujo de reciclaje o retenido. Cualquier material que no pasa a través del filtro queda en la cara superior (aguas arriba).

Las membranas microporosas se utilizan principalmente para eliminar partículas, tales como sólidos, bacterias, y geles, de una corriente de líquido o gas en modo de filtración sin salida.

- 30 Las membranas de ultrafiltración son generalmente membranas asimétricas deslaminadas fabricadas en su mayoría sobre un soporte que permanece como parte permanente de la estructura de membrana. El soporte puede ser un tejido tejido o no-tejido, o una membrana preformada. Alternativamente, una membrana de ultrafiltración soportada puede formarse moldeando conjuntamente dos o más soluciones poliméricas seguido de coagulación de la solución para formar una membrana multicapa donde al menos una capa es una membrana de ultrafiltración.

- 35 Filtros de membrana para la eliminación de virus se están utilizando cada vez más en la industria de la biotecnología para la seguridad de los productos terapéuticos manufacturados. Estos filtros deben eliminar una elevada proporción de cualquier virus que pueda estar presente mientras que permiten que si no todo la mayoría de la proteína producto pase a través de la membrana. Adicionalmente, es necesario que la filtración no se detenga o frene prematuramente a una velocidad de flujo bajo no rentable por obturación del filtro poroso. Los profesionales en el campo del desarrollo de membranas han encontrado que es de hecho un reto, desarrollar un producto membrana con esta combinación deseada de propiedades.

- 40 En el estado de la técnica las membranas para la eliminación de virus son normalmente membranas de ultrafiltración, fabricadas para ser hidrofílicas y de baja unión a proteínas por polimerización de un recubrimiento polimérico entrecruzado sobre la superficie porosa interna y las superficies faciales de la membrana. Sin limitarse por la siguiente explicación, se cree que dichos procesos de recubrimiento confieren un espesor del recubrimiento distribuido aleatoriamente sobre las superficies de los poros, debido a la distribución de los tamaños de poro y la naturaleza estocástica de la polimerización de radicales libres. Puesto que las tolerancias requeridas por una membrana mejorada de eliminación de virus son muy estrictas, se buscó un método para controlar de forma más cercana el espesor del recubrimiento.

- 50 Cuando se filtran soluciones de proteínas acuosas para eliminar virus de las mismas con una membrana de ultrafiltración, las membranas tienen un tamaño de poro suficientemente pequeño para efectuar la retención de los virus mientras que permiten el paso de la proteína a través de la membrana. Es deseable que las membranas tengan una elevada retención de virus y al mismo tiempo un elevado rendimiento. La retención de virus se define

como el valor de reducción logarítmico (LRV), y el número de veces 10 debe ser multiplicado para obtener la relación de concentración de virus en la alimentación respecto a la del filtrado. Por ejemplo, una membrana con LRV de 4,0 significa que es capaz de reducir la carga vírica por un factor de 10,000 (10^4). El rendimiento se define como el volumen de solución de proteína que puede pasar a través de un área dada de membrana antes de que ocurra la contaminación total. Tal como se utiliza aquí, el término "contaminación total" se refiere a una condición de la membrana donde menos del 10 % del flujo original de la membrana se observa cuando se efectúa filtración con la membrana para alcanzar una retención de virus de un LRV de 3,5 o superior. Se observa generalmente que ambos un flujo más elevado a través de la membrana y una baja unión de proteínas a la superficie de membrana conducen a un rendimiento más elevado. Los valores de rendimiento de una membrana dada varían enormemente dependiendo del tipo y la concentración de proteína utilizada, presión, fuerza iónica y otras condiciones del ensayo. Bajo condiciones típicas de proceso las membranas de ultrafiltración satisfactorias tienen rendimientos de aproximadamente 100 l/m² o superiores.

Un indicador más representativo del comportamiento de una membrana de retención vírica es el área de membrana que se calcula según el método V_{max} . Millipore Corporation ha utilizado históricamente el método V_{max} . Para determinar los requerimientos de área para dispositivos de filtración de flujo normal. (Nota técnica AN1025EN00 de Millipore Corporation). Este método se base en el modelo de contaminación de poro gradual que asume que la contaminación de membrana es el resultado de una constricción uniforme de los poros de membrana cilíndricos. La ecuación que gobierna el modelo es:

$$(1) \quad t_b / V = (t_b / [V_{max} * A] + 1/[Q_i * A])$$

donde

A = área de filtración (m²)

V= volumen de proceso (L)

V_{max} = obtenido de la pendiente inversa de una representación de t/V vs. t (l/m²)

Q_i = velocidad de flujo volumétrico inicial (l/min*m²)

t_b = tiempo de proceso (min)

La ecuación (1) puede modificarse para estimar el tamaño de filtro como sigue:

$$(2) \quad A / V = 1/V_{max} + 1/[Q_i * t_b]$$

En esta ecuación, la contribución a los resultados de tamaño de ambos el término de capacidad, ($1/V_{max}$) y el término de tiempo de flujo ($1/(Q_i * t_b)$).

La mayoría de las aplicaciones biofarmacéuticas son corrientes contaminantes intermedias; por ello ambas la capacidad y la velocidad de flujo son importantes en el tamaño. Esto significa que ambos el término de capacidad ($1/V_{max}$) y el término de tiempo de flujo ($1/(Q_i * t_b)$) deben ser utilizados. Ignorar el término tiempo de flujo puede resultar en un error significativo en la determinación del área de filtración total requerido. Ejemplos de aplicaciones en las que esto ocurre sería en etapas de reducción de carga biológica, tal como la previa a una etapa de purificación en columna, o después de etapas de filtración en profundidad. Además muchas aplicaciones de tampones y medios están dentro de este intervalo V_{max} . Cuanto más bajo es el valor de A, más deseable es la membrana.

Además cuando se filtra una solución acuosa de proteína la membrana de ultrafiltración debe ser hidrofílica, es decir, inmediatamente humectable con agua. Un método relevante para determinar la hidrofiliadad de una membrana es medir la tensión superficial crítica de humectación (CWST) como se describe en U.S. Pat. 4,880,548. Brevemente, el CWST de un medio poroso puede ser determinado aplicando individualmente a su superficie una serie de líquidos con tensión superficial variable, tal como solución acuosa de alcohol alifático o sales inorgánicas, y observando la absorción o no-absorción de cada líquido. El CWST de un medio poroso en

unidades de dinas/cm se define como el valor principal de la tensión superficial del líquido que es absorbido y el de un líquido de tensión superficial vecina que no es absorbido.

5 Otra característica deseable de una membrana de ultrafiltración utilizada para filtrar soluciones de proteína es que sea estable a sustancias cáusticas puesto que comúnmente se utilizan soluciones cáusticas para el almacenamiento y la esterilización de las membranas antes de su uso.

10 En las patentes U.S. 4,794,002 y 5,139,881 se ha propuesto proporcionar una membrana de ultrafiltración o microfiltración porosa formada por un sustrato inherentemente hidrofóbico tal como una membrana de sustrato de polímero sulfona, por ejemplo, polisulfona o poliétersulfona, el cual se modifica para presentar una superficie hidrofílica así como un proceso para fabricar la membrana con una superficie hidrofílica, donde la superficie hidrofílica se crea mediante adsorción irreversible de un polímero con peso molecular no inferior a 10,000. En un aspecto de la invención, la superficie de la membrana de sustrato se modifica con una hidroxialquilcelulosa tal como hidroxipropilcelulosa. En el proceso de fabricación de la membrana, la membrana de sustrato se pone en contacto con la hidroxialquilcelulosa para efectuar la adsorción sobre o en la membrana de sustrato seguido de eliminación del exceso de hidroxialquilcelulosa modificadora no adsorbida.

15 La Patente U.S. 6,21,382 divulga una membrana hidrofílica que está fabricada esencialmente mediante el mismo proceso que en 4,794,002 utilizando solo un polímero modificador con número medio de peso molecular de 2,000 a 8,000.

20 La Patente U.S. 4,413,074 divulga un proceso para transformar en hidrofílica la superficie de una membrana porosa hidrofóbica tal como una polisulfona. La membrana hidrofóbica se pone en contacto con una solución de hidroxialquilcelulosa y un surfactante en un disolvente tal como agua o una mezcla de agua y un alcohol alifático. A continuación se elimina el disolvente de la membrana mediante calentamiento bajo condiciones de sequedad para insolubilizar la hidroxialquilcelulosa.

25 Sería deseable proporcionar una membrana de ultrafiltración capaz de eliminar virus de soluciones de proteína que tenga un rendimiento elevado en cuanto a que pueda efectuarse un elevado flujo y una baja unión a proteína. Una membrana tal, proporcionaría la eliminación eficaz y económica de virus de grandes lotes de solución de proteína. Además, sería deseable proporcionar una membrana tal que pueda ser esterilizada de forma cáustica sin afectar negativamente a su rendimiento.

La presente invención proporciona un proceso según las reivindicaciones 1 a 6 y la membrana de ultrafiltración formada de este modo.

30 La presente invención implica un proceso para la adhesión de polímeros hidrofílicos que proporciona una capa sustancialmente uniforme en las paredes de los poros, y un espesor controlado por la termodinámica de adhesión, más que por la naturaleza estocástica de la polimerización. El motor inicial de la adhesión entre el polímero hidrofílico y la superficie hidrofóbica es fuerte, pero se reduce enormemente después de que la primera capa se ha formado, porque el polímero en la superficie tiene una cantidad de disolvente asociada a él reducida, y polímeros solubles no tienen un motor termodinámico que elimina el disolvente para adherirse a tal polímero. Esto tiende a limitar la capa de polímero hidrofílico y proporcionar un recubrimiento sustancialmente uniforme sobre las paredes de los poros, minimizando la restricción de flujo.

35 La presente invención también proporciona una membrana de ultrafiltración fibra hueca o lámina o monocapa o multicapa, soportada o no soportada formada por un sustrato de membrana poroso teniendo una superficie hidrofílica modificada. En una realización de esta invención la membrana de ultrafiltración comprende una membrana multicapa teniendo una capa de ultrafiltración y al menos una otra capa teniendo un tamaño de poro medio superior al tamaño de poro medio de la capa de ultrafiltración. Esta segunda capa proporciona soporte a la capa de ultrafiltración proporcionándole con ello resistencia adicional sin afectar de forma adversa la propiedad de flujo de la capa de ultrafiltración. La superficie del sustrato inherentemente hidrofóbica se transforma en hidrofílica mediante inmovilización de una hidroxialquilcelulosa sobre o en la superficie del sustrato. El ámbito de esta invención no se limita a un mecanismo particular de inmovilización de la hidroxialquilcelulosa sobre la superficie de membrana. Puede ser inmovilizada a la superficie mediante adsorción, recubrimiento, entrecruzamiento, unión química o similar.

40 En una realización de esta invención la membrana multicapa se forma moldeando conjuntamente dos o más soluciones poliméricas sobre una capa soporte. Los polímeros para la membrana incluyen polímeros sulfona, tal como polisulfona, poliétersulfona y polifenilsulfona. Las soluciones multicapa se ponen a continuación en contacto con un no-solvente de las capas de polímero para efectuar la coagulación y la formación de poros de las capas poliméricas para efectuar de este modo la formación de la membrana multicapa de sustrato utilizada en la presente invención.

- 5 Para hacer las superficies de sustrato hidrofílicas, la membrana multicapa de sustrato se pone en contacto tal como por inmersión en una solución acuosa, o una mezcla de agua con otro disolvente, y una hidroxialquilcelulosa para efectuar la inmovilización de la hidroxialquilcelulosa sobre o en la membrana multicapa de sustrato. A continuación el exceso de hidroxialquilcelulosa se elimina opcionalmente de la membrana de sustrato tal como por aclarado en agua. A continuación la membrana se expone a agua caliente y/o vapor, lo cual puede ser llevado a cabo, por ejemplo, mediante esterilización en autoclave, ebullición, vapor, calentamiento en un contenedor cerrado con agua líquida, o similar. Se ha encontrado que las membranas resultantes teniendo las superficies hidrofílicas esterilizadas en autoclave en agua caliente y/o vapor tienen flujo y rendimiento significativamente mejorados, mientras que mantienen una retención vírica elevada, comparadas con el estado de la técnica. El recubrimiento hidrofílico que ha sido inmovilizado sobre la membrana de este modo puede ser además tratado químicamente con el fin de entrecruzamiento, unir grupos químicos específicos, tal como ligandos de moléculas biológicas, impartir carga a la membrana o similar. Estas etapas adicionales pueden ser realizadas mediante todos los procedimientos adecuados conocidos en el estado de la técnica, e incluirían procesos químicos en lote, reacciones radio-inducidas, o similares.
- 10
- 15 La invención además incluye el uso de las membranas de la presente invención en un proceso para eliminar partículas virales de una solución que contiene proteína, donde la membrana es capaz de prevenir sustancialmente el paso a través de la misma de partículas víricas y permitir sustancialmente el paso a través de la misma de la proteína.

Descripción de realizaciones específicas

- 20 La membrana de sustrato hidrofóbica utilizada en la presente invención puede ser fibra hueca o lámina o monocapa o multicapa y puede ser soportada o no soportada.

25 Cuando la membrana de sustrato multicapa hidrofóbica de la presente invención es utilizada, tiene al menos una capa de ultrafiltración y al menos una capa de soporte y está fabricada moldeando conjuntamente una pluralidad de soluciones poliméricas tal como soluciones de polímero sulfona sobre un soporte para formar una lámina líquida multicapa. A continuación la lámina se sumerge en un baño de coagulación líquido para efectuar la separación de fase y formar una membrana de ultrafiltración porosa. Las diferencias de tamaño de poro entre la capa de ultrafiltración (UF) y la capa microporosa (MF) pueden diferir en un orden de magnitud. Asimismo, la velocidad de formación de membranas UF y MF es diferente, formándose UF significativamente más rápido en baño de coagulación. Después de la formación, la membrana porosa se lava libre de disolvente y otros materiales solubles. Puede ser a continuación además extraída para reducir materiales fugitivos a un nivel bajo y entonces opcionalmente secarse.

30

35 Por simplicidad el proceso de fabricar una membrana de ultrafiltración compuesta (*composite*) por comoldeo multicapa se describirá para un ejemplo de dos capas. Aunque tres o más capas también pueden fabricarse mediante el mismo proceso. El proceso preferido comprende las etapas de preparar dos soluciones poliméricas tal como dos soluciones de polímero sulfona, una para cada capa. Las soluciones para hacer membranas porosas mediante moldeo por inmersión consisten generalmente en un polímero, disolvente y aditivos para modificar y controlar el tamaño de poro final y la naturaleza porosa de la membrana (es decir, el porcentaje de porosidad, la distribución de tamaños de poro, etc.).

40 Membranas de sustrato inherentemente hidrofóbicas adecuadas se forman de polímeros sulfona tal como polisulfona, polietersulfona o polifenilsulfona, o mezclas de los mismos o una mezcla de los mismos con un polímero hidrofílico tal como polivinilpirrolidona o similar.

Disolventes adecuados incluyen pero no están limitados a dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida o N-metil pirrolidona.

45 Ejemplos de los muchos porógenos utilizados en el estado de la técnica, incluyen pero no están limitados a formamida, varios alcoholes y compuestos polihídricos, agua, varios polietilen glicoles, polivinil pirrolidona y varias sales, tales como cloruro cálcico y cloruro de litio.

50 Después de que las soluciones se han preparado se aplican a un portador de soporte móvil. Para una membrana sin soporte que no tiene una red unida a la membrana final, el portador es generalmente una película de plástico, tal como polietilen tereftalato, o un papel recubierto de polietileno, o una red continua suave similar que puede ser fácilmente retirada de la membrana multicapa formada.

Por conveniencia el proceso de comoldeo para formar la membrana de sustrato porosa se describirá aquí en referencia a polímeros sulfona. La aplicación puede hacerse mediante cualquier método estándar. El objetivo es recubrir un portador con una primera solución de polímero sulfona y con una segunda solución de polímero sulfona la primera solución. Un método altamente preferido es comoldeo, en el que las dos capas se aplican por

recubrimiento esencialmente sin diferencia de tiempo. Esto puede hacerse con un aparato de recubrimiento de doble cuchilla, o una cabeza de recubrimiento de pendiente dual presurizada. Comoldeo significa que las capas individuales se moldean esencialmente de forma simultánea sin intervalo de tiempo entre el moldeo de una capa y el moldeo de la siguiente capa. Este método se describe en detalle en la solicitud de patente publicada US 20030217965. Comoldeo permite la formación de regiones de tamaño de poro controlado en las uniones de las capas. En el estado de la técnica anterior, una línea de demarcación bien definida se forma entre las capas secuencialmente moldeadas. Un cambio drástico en el tamaño de poro que va desde una estructura más abierta a una más apretada puede conducir a una acumulación rápida indeseada de soluto retenido en la interfaz y consecuentemente a una caída drástica del flujo. Una interfaz cortante puede ser reemplazada, si se desea, por un cambio más sutil en tamaño de poro entre dos capas adyacentes con un proceso de comoldeo. Una zona interfacial de este tipo es beneficiosa para el comportamiento retenedor de la estructura total de la membrana multicapa.

Después que las capas han sido comoldeadas sobre el portador movable, el soportador con la lámina líquida se sumerge en un líquido que es un no-solvente del polímero, y es miscible con el disolvente y los porógenos. Esto causará la separación de fase y la formación de una membrana porosa.

La membrana compuesta (composite) formada se separa entonces generalmente del soportador y se lava para eliminar el disolvente residual y otro material. La membrana puede ser secada a continuación. Las membranas de ultrafiltración se secan generalmente con un humectante como glicerina, sumergiendo primero la membrana lavada en una solución acuosa de glicerina, de concentración del 5 % al 25 % en peso, y eliminando el exceso de líquido antes de proceder a través de la etapa de secado. El secado se realiza de una manera para eliminar la mayoría del agua y dejar suficiente glicerina para prevenir el colapso de los poros.

Alternativamente, las membranas de sustrato pueden ser formuladas mediante mezcla de un polímero hidrofóbico y un polímero hidrofílico, donde el polímero hidrofílico queda en el producto final. Esto se utiliza por ejemplo en el caso de polietersulfona y polivinilpirrolidona. Las membranas que se preparan de este modo son generalmente inherentemente hidrofílicas, sin embargo, pueden ser además modificadas utilizando el proceso de la presente invención para conferir una baja unión a proteína y otras propiedades.

La presente invención proporciona una membrana de ultrafiltración fibra hueca o lámina o monocapa o multicapa, soportada o no soportada con resistencia cáustica teniendo un valor LRV para retener virus de al menos 4,0, preferentemente al menos 5,0, teniendo una superficie hidrofílica y teniendo un rendimiento inicial de 1000 l/m² o superior, preferentemente 1500 l/m² o superior y que está fabricada con la membrana polimérica hidrofílica de superficie modificada descrita arriba. El término "rendimiento" como se utiliza aquí significa el volumen máximo de una solución de 1,45 g/l de albúmina de suero bovina (BSA) en tampón Difko FA que puede ser filtrada a presión constante de 2 bar (30 psi) a 22 °C a través de un metro cuadrado de membrana. Tal como se utiliza aquí el término "contaminación completa" se refiere a una condición de la membrana donde el 10 % o menos del flujo original de la membrana es observado cuando se efectúa la filtración con la membrana para alcanzar una retención de virus de LRV inicial de 4,0 o superior. Debe entenderse que las alimentaciones de proteína pueden ser altamente variables, y el rendimiento observado puede ser superior o inferior dependiendo de un lote particular de proteína y su manufacturación. Sin embargo las mejoras en el rendimiento de membrana cuando se compara con membranas comerciales o membranas preparadas según el estado de la técnica serán similares dentro de un lote particular de proteína.

Otras alimentaciones de ensayo pueden ser también empleadas en ensayos de rendimiento. Puesto que una de las aplicaciones posibles de las membranas de filtración de virus es purificar soluciones de anticuerpos monoclonales, es deseable ensayar membranas hidrofílicas con soluciones de proteínas relevantes tal como IgG. Una solución disponible comercialmente de IgGs mezcladas derivadas del suero sanguíneo humano es suministrada por SeraCare Life Sciences Inc. (West Bridgewater, MA) y fue utilizada en un número de ensayos de rendimiento sobre las membranas hidrofílicas descritas en esta invención. Se determinó que esta alimentación de ensayo contenía grandes agregados de proteína y otros componentes sanguíneos, que causaron contaminación más rápida de las membranas de retención de virus por mecanismo de tamaño de exclusión.

La membrana de sustrato multicapa está modificada en superficie por inmovilización sobre la misma una hidroxialquilcelulosa teniendo la hidrofiliad deseada y una baja unión a proteína. Hidroxialquilcelulosas adecuadas incluyen hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa, preferentemente, hidroxipropilcelulosa. Hidroxietil o hidroxipropil son grupos con buena unión porque pequeñas moléculas con estos restos humectan, y en algunos casos plastifican o disuelven un polímero sulfona. La membrana de polímero sulfona multicapa hidrofóbica se impregna en una solución de hidroxialquilcelulosa disuelta en agua o una mezcla de agua y un alcohol tal como alcohol isopropílico. En una realización preferente de esta invención se utiliza hidroxipropilcelulosa en agua y del 5 al 100 % en volumen, preferentemente 10 a 30 % en volumen de alcohol isopropílico. Se ha encontrado que un aumento en el rendimiento de membrana para la

membrana de superficie modificada se obtiene cuando se utiliza esta composición de disolventes e hidroxipropilcelulosa. El tiempo de impregnación se selecciona cuidadosamente, puesto que debe ser suficientemente largo para asegurar que la superficie del sustrato se cubre bien, y no demasiado largo que afecte radicalmente el flujo. El tiempo preferido de adsorción es 2 a 60 minutos. Otra consideración de tiempo importante es la fabricación de membrana hidrofílica en una manera continua lo cual requiere que el tiempo de impregnación sea razonablemente corto. La patente U.S. 6,214,382 enseña que el tiempo de contacto entre la membrana y la solución modificadora no debe ser de menos de 10 minutos, lo cual es prohibitivamente largo para la mayoría de las operaciones continuas de membrana. De acuerdo con esta invención se ha determinado que la realización de la inmovilización de hidroxialquilcelulosa sobre la superficie de membrana utilizando las condiciones descritas aquí permite acortar el tiempo a prácticamente 3 minutos. En una realización preferida de esta invención se utiliza un tiempo de adsorción de aproximadamente 2 a 10 minutos. Las membranas resultantes de superficie modificada pueden entonces, aunque no es un requisito, ser lavadas con exceso de disolvente (es decir, una solución modificadora menos el polímero modificador) durante preferentemente aproximadamente 2 a 30 minutos para eliminar exceso de polímero no interactivo. Alternativamente la membrana puede ser secada justo después de impregnarse en la solución de polímero modificador y entonces someterse al tratamiento de calor en agua caliente y/o vapor descrito abajo. El producto resultante es una membrana que comprende la membrana de sustrato la mayoría de cuyas superficies son modificadas mediante adsorción de una capa muy fina de la hidroxialquilcelulosa.

La membrana multicapa modificada puede ser entonces opcionalmente secada a temperatura ambiente. En la etapa de proceso final, la membrana de superficie modificada se calienta entonces bien en autoclave en presencia de agua o vapor tal como en agua hirviendo o en una atmósfera de corriente o en un autoclave a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 140 °C, preferentemente entre aproximadamente 90 °C y aproximadamente 122 °C o es sumergida en un baño de agua hirviendo (100 °C). Se ha encontrado que esterilizando en autoclave en presencia de agua o vapor, o sumergiendo la membrana en agua hirviendo, se obtienen membranas de superficie modificada con un flujo significativamente mejorado comparado con membranas que no se someten a esterilización en autoclave o con membranas que se someten a esterilización en autoclave en ausencia de agua o vapor. También se ha encontrado que las membranas que se tratan de acuerdo con esta invención tienen una tensión superficial crítica de humectación (CWST) superior a las obtenidas mediante simple adsorción de hidroxialquilcelulosa tal como hidropilcelulosa (HPC), siendo tratadas en autoclave en presencia de agua o vapor o siendo sumergidas en agua hirviendo generalmente de aproximadamente 3-4 días/cm. Los datos obtenidos de películas de polietersulfona indican que el tratamiento de HPC adsorbida con vapor de agua caliente reduce significativamente los ángulos de contacto dinámico de agua, lo más notablemente, disminuyendo los ángulos de contacto del agua (de aproximadamente 30 grados a aproximadamente 9 grados) lo cual es una manifestación de un mayor carácter hidrofílico.

Otra indicación de la mejora de membrana con esterilización en autoclave en presencia de agua o vapor o por sumergirse en agua a ebullición es la relación entre agua y flujo de aire a través de la membrana. El flujo de agua es medido obviamente en una membrana mojada, caracterizando de este modo el recubrimiento hidrofílico en el estado hidratado, aumentado. Por otro lado, el flujo de aire de una membrana seca es una medida de la modificación de membrana sin tener en cuenta el aumento. Los flujos de aire y agua de membranas modificadas antes y después del tratamiento con vapor caliente fueron comparados. Mientras que el flujo de aire no cambia significativamente (sugiriendo que el polímero modificador no ha sido eliminado en una extensión apreciable), el flujo de agua mejora radicalmente, lo cual indica que el polímero modificador es ahora menos susceptible de aumentar.

	Relación del flujo de agua de la membrana hidrofílica respecto al de la membrana fóbica (25 psi, 20 °C)	Relación del flujo de aire de la membrana hidrofílica respecto al de la membrana fóbica (10 psi, 20 °C)
Membrana modificada con hidroxipropilcelulosa y no tratada con vapor de agua	32,7 %	85,6 %
Membrana modificada con hidroxipropilcelulosa y tratada con vapor de agua	48,3 %	89,8 %

45

Debido al aumento del rendimiento de las membranas de esta invención, la filtración de solución de proteína para eliminar virus con estas membranas proporciona ventajas significativas en que las membranas pueden ser utilizadas para filtrar grandes cantidades de solución de proteína, y mayor flujo acorta el tiempo de filtración en comparación con las membranas del estado de la técnica.

5 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no pretenden limitar la misma.

Ejemplo 1

Una membrana de sustrato de dos capas de polietersulfona se fabricó mediante dos soluciones de polietersulfona en N-metil pirrolidona seguido del contacto de las dos capas con agua para formar una capa de ultrafiltración y una capa de microfiltración. La membrana de sustrato tenía un LRV de 4,0 por PhiX174 y flujo de agua de 80 l/m²h-psi. La membrana de sustrato se sumergió en una solución acuosa que contiene el 1 % de hidroxipropilcelulosa y el 20 % de alcohol isopropílico a temperatura ambiente. La membrana se sumergió en esta solución durante 50 minutos, se retiró de la misma y se aclaró con agua desionizada durante 5 minutos con agitación suave. Se colocó entonces en agua a ebullición durante 10 min y se secó a temperatura ambiente. La membrana tenía una tensión superficial crítica al agua (CWST) de 77 dinas/cm. Se registró el flujo de membrana de 33,3 l/m²h-psi midiendo el flujo de una solución tampón fosfato de Difko FA (150 mM NaCl, pH 7,2) a presión constante de 30 psi. El rendimiento fue 2152 l/m² medido con una solución de BSA de 1,45 g/l (Serologicals Inc., Temecula, CA) en la misma solución de tampón fosfato que fue filtrada a través de la membrana a presión constante de 30 psi.

Ejemplo comparativo 1 a.

20 Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sin someter la membrana a agua en ebullición después de la modificación. La membrana tenía un CWST de 74 dinas/cm.

Ejemplo comparativo 1 b.

Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con solución acuosa que contenía el 1 % de hidroxipropilcelulosa sin alcohol añadido deliberadamente.

25 **Ejemplo comparativo 1 c.**

Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con solución al 1 % de hidroxipropilcelulosa en isopropanol.

Ejemplo comparativo 1 d.

30 Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con solución acuosa que contenía 1 % de hidroxipropilcelulosa sin alcohol añadido deliberadamente. La adsorción se realizó durante 16 horas, se aclaró y secó a temperatura ambiente.

Ejemplo comparativo 1 e.

Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con un tiempo de impregnación acortado a 3 minutos.

Ejemplo comparativo 1 f.

Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sin aclarar la membrana con agua fría después de impregnar.

35 **Ejemplo comparativo 2.**

Una membrana de sustrato retenedora de virus de dos capas de polietersulfona se preparó mediante el comoldeo de dos soluciones de polietersulfona en N-metil pirrolidona seguido de contacto de las dos capas con agua para formar una capa de ultrafiltración y una capa de microfiltración. La membrana de sustrato tenía un LRV de 4,0 por PhiX174 y flujo de agua de 80 l/m²h-psi. La membrana de sustrato se sumergió en una solución acuosa que contiene el 0,5 % de hidroxipropilcelulosa, el 20 % de alcohol isopropílico y el 0,023 % de surfactante Zonyl FSN (DuPont, Bridgeport, CT) a temperatura ambiente.

La membrana se sumergió en esta solución durante 2 minutos, se retiró de la misma, se eliminó el exceso de la misma y la membrana se calentó a 120 °C durante 15 minutos. Se registró el flujo de membrana de 41,8 l/m²h-psi y el rendimiento fue 1608 l/m².

45

Ejemplo 3

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2. La membrana se sumergió en agua a ebullición durante 5 minutos.

5 Tabla 1. Flujo de membrana tal como fue registrado midiendo el flujo de una solución de tampón fosfato Difko FA (150 mM NaCl, pH 7,2) a presión constante de 30 psi y rendimiento medido con solución de BSA de 1,45 g/l (Serologicals, Inc., Temecula, CA) en la misma solución de tampón fosfato Difko FA que fue filtrada a través de la membrana a presión constante de 30 psi. A fue calculado mediante la Ecuación 2 indicada arriba.

	Flujo (l/m ² h-psi)	Rendimiento (l/m ²)	Área requerida (m ²)
Ejemplo 1	33,3	2152	3,6
Ejemplo 1a	22,5	2080	4,3
Ejemplo 1b	39,7	1190	5,3
Ejemplo 1c	20,8	1665	5,0
Ejemplo 1d	11,7	2021	6,0
Ejemplo 1e	38,2	2185	3,4
Ejemplo 1f	26,3	2232	3,8
Ejemplo 2	41,8	1608	4,1
Ejemplo 3	54,1	2719	2,6
Capa única de membrana Viresolve® comercial NFP (Millipore Corporation)	44,9	475	11,6

REIVINDICACIONES

- 1.- Un proceso para formar una membrana de ultrafiltración que tiene un rendimiento superior a aproximadamente 1000 l/m² que comprende:
- 5 (a) proporcionar una membrana de sustrato que tiene al menos una capa microporosa formada por un primer polímero sulfona que tiene una primera superficie exterior y una capa de ultrafiltración formada por un segundo polímero sulfona que tiene una segunda superficie exterior,
- (b) poner en contacto la primera superficie exterior y dicha segunda superficie exterior con una solución de una hidroxialquilcelulosa para adsorber dicha hidroxialquilcelulosa sobre o en dicha primera superficie exterior y dicha segunda superficie exterior
- 10 (c) opcionalmente eliminar el exceso de hidroxialquilcelulosa de dicha membrana de sustrato para producir una membrana de sustrato de superficie modificada,
- (e) someter la membrana de sustrato de superficie modificada de la etapa (b) o de la etapa (c) a una siguiente etapa seleccionada del grupo consistente en (1) esterilizar en autoclave en presencia de vapor o agua; y (2) sumergir en agua en ebullición,
- 15 donde el término "rendimiento" se define como el volumen máximo de una solución de 1,45 g/l de albúmina de suero bovino (BSA) en un tampón de 150 mM NaCl a pH 7,2 que puede ser filtrada a presión constante de 2 bar (30 psi) a 22 °C a través de un metro cuadrado de membrana.
- 2.- El proceso según la reivindicación 1, donde la etapa (e) comprende esterilizar en autoclave en presencia de agua en ebullición.
- 20 3.- El proceso según la reivindicación 1 o 2, donde la hidroxialquilcelulosa es hidropropilcelulosa.
- 4.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho primer polímero sulfona y dicho segundo polímero sulfona son el mismo polímero sulfona y dicho mismo polímero sulfona es polisulfona o polietersulfona.
- 5.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 4, donde o bien dicho primer polímero sulfona o dicho segundo polímero sulfona es polisulfona o polietersulfona.
- 6.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde un disolvente para la solución de la etapa (b) es agua y entre aproximadamente el 5 y el 100 % en volumen de isopropanol.
- 7.- Una membrana de ultrafiltración formada por el proceso según la reivindicación 1, donde dicha capa microporosa está formada por el primer polímero sulfona y dicha capa de ultrafiltración está formada por el 30 segundo polímero sulfona.
- 8.- La membrana de ultrafiltración multicapa según la reivindicación 7, donde dicho primer polímero sulfona y dicho segundo polímero sulfona son el mismo polímero sulfona.
- 9.- La membrana de ultrafiltración multicapa según la reivindicación 8, donde el mismo polímero sulfona es o bien polisulfona o polietersulfona.
- 35 10.- La membrana de ultrafiltración multicapa según la reivindicación 7, donde o bien dicho primer polímero sulfona o dicho segundo polímero sulfona es polisulfona o polietersulfona.
- 11.- La membrana de ultrafiltración según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que tiene un rendimiento superior a aproximadamente 1500 l/m².
- 40 12.- La membrana de ultrafiltración multicapa según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde la hidroxialquilcelulosa es hidropropilcelulosa.
- 13.- Un procedimiento para eliminar virus de una solución de proteína que comprende poner en contacto la solución de proteína con la membrana de ultrafiltración multicapa formada mediante un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o con la membrana de ultrafiltración de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la reivindicación 12.