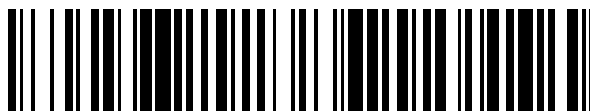


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 616**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009** **E 10190559 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 2302386**

54 Título: **Inmunoensayo de inmunotransferencia Western que usa una membrana de inmunotransferencia hidrófila, de alta capacidad de unión a proteínas, de baja fluorescencia**

30 Prioridad:

18.08.2008 US 189302 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2014

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821 , US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 461 616 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

Inmunoensayo de inmunotransferencia Western que usa una membrana de inmunotransferencia hidrófila, de alta capacidad de unión a proteínas, de baja fluorescencia

5 "Inmunotransferencia" o "inmunoelctrotransferencia" 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 puede inmovilizar muestras biomoleculares para la detección posterior. Esto plantea requisitos específicos sobre la membrana relacionados con la superficie específica, la porosidad y la capacidad de unión a proteínas.

10 La inmunotransferencia Western es una modificación de esta técnica que implica la inmovilización de proteínas sobre membranas antes de la detección usando anticuerpos monoclonales o policlonales. Antes de la inmovilización de proteínas sobre la membrana, las proteínas de la muestra se separan usando electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) para separar proteínas naturales o desnaturalizadas. A continuación, las proteínas se transfieren o electroinmunotransfieren sobre una membrana, donde se sondan y finalmente se detectan usando anticuerpos específicos para una proteína elegida. Las
15 membranas de inmunotransferencia Western típicamente están hechas de nitrocelulosa (NC) o poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF, por sus siglas en inglés). La especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno puede permitir que se identifique una sola proteína entre una mezcla de proteínas compleja.

En resumen, la inmunotransferencia 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
20 "electroinmunotransferencia" de proteínas separadas sobre una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF). Después de la transferencia, la membrana se "bloquea" para evitar la unión no específica de anticuerpos a la superficie de la membrana. Muchas estrategias de marcaje o etiquetado de anticuerpos son conocidas por los expertos en la técnica. En los protocolos más simples, las proteínas transferidas se incuban o se complejan con un anticuerpo primario marcado con enzima que sirve como una sonda.
25 Después de bloquear lugares de unión no específica, un sustrato adecuado se añade para complejarse con la enzima, y juntos reaccionan para formar productos detectables cromogénicos, quimioluminiscentes o fluorogénicos que permiten la detección visual, por quimioluminiscencia o por fluorescencia, respectivamente. Los esquemas de detección más sensibles hacen uso de fenómenos quimioluminiscentes o fluorescentes. En la detección quimioluminiscente, un complejo enzima-sustrato produce emisiones ópticas detectables (quimioluminiscencia).
30 Estas emisiones se registran y se miden usando detectores adecuados tales como dispositivos peliculares o fotónicos. La ausencia o presencia de señal indica si una proteína específica está presente en el lisado, y la intensidad de señal se relaciona con el nivel de la proteína de interés, que en algunos casos puede ser cuantificable.

El uso de membranas de nitrocelulosa está muy extendido en el trabajo de los ensayos de inmunodetección, particularmente en la inmunotransferencia Western. Esto se debe parcialmente a consideraciones históricas y se
35 debe parcialmente a la facilidad de uso. Las membranas de inmunotransferencia de nitrocelulosa no requieren una etapa de prehumedecimiento con líquido orgánico, un requisito para trabajar con membranas hidrófobas. Las membranas hidrófobas requieren una etapa de prehumedecimiento con alcohol seguida por una etapa de intercambio con agua (para la retirada del alcohol), antes de montar dentro el dispositivos de transferencia de puntos. Las membranas intrínsecamente hidrófobas proporcionan un espacio de tiempo limitado para este dispositivo; el potencial para que la membrana se seque es significativo. Una vez seca, la membrana no se puede rehumedecer a menos que se repita la secuencia de prehumedecimiento. Una vez que la membrana se pone en contacto con el gel, la retirada antes de la transferencia puede estropear efectivamente el gel y las muestras de proteína separadas contenidas. La etapa de prehumedecimiento consume mucho tiempo y puede dificultar considerablemente el volumen de trabajo. Una membrana hidrófila permanecerá húmeda durante un intervalo de
45 tiempo mayor, y se puede rehumedecer con agua si no se seca antes del montaje.

Las membranas de inmunotransferencia de nitrocelulosa son humedecibles con agua y muestran un comportamiento satisfactorio para la mayoría de las aplicaciones de inmunotransferencia. Pero la nitrocelulosa no es mecánicamente o químicamente tan estable como el PVDF. El PVDF mantendrá su integridad mecánica a lo largo de un gran espacio de tiempo, mientras que la NC se volverá frágil y se decolorará. Los puntos de la membrana de
50 PVDF se pueden separar de los anticuerpos y sondarse de nuevo. Los puntos de NC, no. La NC tiende a la oxidación al aire, momento en el que se puede volver peligrosa. Requiere una corriente residual separada, y cuando se desecha se debe mojar con un agente humectante, habitualmente agua.

Las membranas de inmunotransferencia de PVDF hidrófobas poseen una capacidad de unión a proteínas equivalente a las membranas de inmunotransferencia de NC, pero exhiben un comportamiento de
55 inmunotransferencia superior. Se pueden detectar concentraciones de muestra muy inferiores bajo las mismas condiciones en estas membranas de PVDF en comparación con la NC. Las membranas de PVDF hidrófobas de baja fluorescencia de fondo exhiben la misma detección de muestra mejorada mientras que permiten el uso de esquemas de detección fluorescentes.

Se sabe que la solicitud de patente internacional WO 03103814 - A1 (Millipore Corporation) describe medios o membranas porosas que tienen 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 que tiene una combinación superior de propiedades, incluyendo propiedades adsorptivas resistentes a biomoléculas termoestables, resistencia a soluciones alcalinas fuertes y bajos niveles de materia extraíble. Además, la solicitud de patente internacional WO 02087734 (Millipore Corporation) divulga medios o membranas porosas que tienen un revestimiento superficial que incluye un terpolímero reticulado que tiene una combinación superior de propiedades, incluyendo propiedades adsorptivas resistentes a biomoléculas termoestables, resistencia a soluciones alcalinas fuertes y bajos niveles de materia extraíble. En algunas realizaciones preferidas, el medio poroso es una membrana porosa.

Por lo tanto, sería deseable proporcionar una membrana de PVDF hidrófila para ensayos de inmunodetección tales como inmunotransferencia Western, con características de comportamiento que lleguen a los límites inferiores de detección de muestras y baja fluorescencia de fondo que son característicos de las membranas de PVDF hidrófobas. Esta invención se dirige a estos requisitos.

Sumario de la invención

Rasgos esenciales y opcionales de la invención se indican en las reivindicaciones principales y subreivindicaciones adjuntas, respectivamente.

Los expertos en la técnica de la modificación de superficies con el propósito de alterar las energías superficiales de sustratos, y en particular con respecto a superficies destinadas a contacto con sistemas biológicos, estarán de acuerdo con que las modificaciones superficiales hidrófilas tradicionalmente exhiben un mal comportamiento de unión a proteínas. Las realizaciones divulgadas en la presente memoria se basan en el descubrimiento fortuito e inesperado de que polímeros espaciales derivados de ciertas mezclas de acrilamidas monómeras, y formados usando reacciones de polimerización por radicales libres, pueden dar lugar a modificaciones superficiales que no solo son hidrófilas, sino que también demuestran un alto nivel de unión a proteínas.

Mucha de la técnica anterior describe el uso de monómeros que contienen hidroxilo, habitualmente polímeros de acrilato que contienen ésteres carbonílicos, para producir modificaciones superficiales de membranas que tienen carácter hidrófilo y alta resistencia a la unión a proteínas. Sin embargo, se sabe que los polímeros procedentes de tales monómeros no son resistentes a soluciones alcalinas fuertes. Por ejemplo, una solución de hidróxido sódico 1,0 normal hidrolizará los polímeros de acrilato que contienen carbonilo hasta polímeros que contienen ácido acrílico. Tales polímeros que contienen ácido acrílico se cargan iónicamente bajo ciertas condiciones de pH, y atraerán y se unirán a proteínas o biomoléculas cargadas opuestamente, incrementando de ese modo la sorción y el ensuciamiento de la membrana. Además, los polímeros que contienen ácido acrílico se hinchan en agua hasta el punto de que constriñen los pasajes de los poros, reduciendo así la permeabilidad y la productividad de la membrana. Por otra parte, los polímeros procedentes de monómeros que contienen hidroxilo, tales como hidroxiacrilatos, reaccionan más en soluciones alcalinas fuertes y se degradan en fragmentos de bajo peso molecular solubles, que disuelven y exponen el medio poroso o la membrana del sustrato subyacente.

Los operarios que intentan desarrollar membranas optimizadas para aplicaciones bien de filtración o bien no relacionadas con la filtración en las industrias farmacéutica y biotecnológica deben resolver problemas significativos. Haciendo frente a requisitos de coste restringido, rendimiento y seguridad, un operario debe usar materiales y desarrollar métodos de fabricación que produzcan membranas no solo con características de flujo y retención optimizadas, sino que sean económicas de producir, cumplan los criterios de limpieza, sean estables a los diversos ambientes químicos que se encuentran comúnmente y sean bien muy resistentes a la adsorción de biomoléculas o bien muy fuertemente absorbentes, dependiendo del uso final pretendido. Así, en este caso, es muy deseable tener una modificación de la membrana que dé como resultado una superficie hidrófila adsorptiva de biomoléculas que sea térmicamente estable, que sea resistente a la degradación por cualesquiera soluciones de reactivos potenciales y que tenga niveles muy bajos de material capaz de ser extraído de la misma.

Los resultados de la unión a proteínas procedentes de investigaciones previas en modificaciones de superficies poliméricas de acrilamidas mixtas indicaban que ciertas mezclas de monómeros hidrófilos que se reticulan con bisacrilamidas y acrilamidas monofuncionales neutras o cargadas pueden, cuando se copolimerizan usando técnicas de radicales libres iniciadas por radiación UV o iniciadas por haces de electrones, producir modificaciones superficiales hidrófilas con gran capacidad de unión a proteínas. Sin embargo, los niveles de partida iniciales de cada monómero tendrían que disminuirse drásticamente antes de observar una morfología de los puntos y un comportamiento de inmunotransferencia satisfactorios.

Los problemas de la técnica anterior se han resuelto mediante las presentes realizaciones, que proporcionan una membrana hidrófila particularmente adecuada para aplicaciones de inmunotransferencia, preferiblemente inmunotransferencia Western. Más específicamente, un sustrato de membrana hidrófoba prehumedecido, preferiblemente hecho de PVDF, se pone en contacto con una solución de monómeros y se somete a condiciones de polimerización para volver al sustrato permanentemente hidrófilo.

La membrana resultante exhibe baja fluorescencia de fondo, gran unión a proteínas, excelente retención de la morfología de las manchas de la muestra de proteína y un intervalo dinámico ampliado (alta relación de señal a ruido, capacidad de detección mejorada). Cuando se usa quimioluminiscencia para la detección, el nivel de fluorescencia de fondo inherente en la membrana original no modificada no es crítico. La membrana demuestra un comportamiento comparable o superior en aplicaciones de inmunotransferencia Western que las membranas de inmunotransferencia de nitrocelulosa convencionales, particularmente para la detección con bajas concentraciones de muestra, y es directamente humedecible con agua, eliminando la necesidad de una etapa de prehumedecimiento con alcohol antes del uso. La membrana exhibe un humedecimiento completo, instantáneo y uniforme al entrar en contacto con agua, y exhibe un humedecimiento retardado cuando se pone en contacto con una solución acuosa saturada de cloruro de aluminio. Esto es, cuando dicha membrana se pone sobre la superficie de esta solución acuosa saturada de cloruro de aluminio, se humedece a lo largo de un intervalo de tiempo mínimo de no menos de 1 segundo.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1-3 son diagramas de resultados de inmunotransferencia Western que usan membranas tratadas según ciertas realizaciones.

Descripción detallada

Las membranas hidrófilamente modificadas según realizaciones de la presente divulgación proporcionan plataformas para ensayos de inmunodetección que son comparables con o exhiben un comportamiento de inmunotransferencia superior que las membranas de nitrocelulosa, particularmente con respecto a la expansión del extremo inferior del intervalo dinámico de capacidad de detección de la muestra. Por ejemplo, en la FIG. 1, los resultados de la inmunotransferencia Western procedentes de una prueba de avance típica demuestran las diferencias de comportamiento entre las membranas de inmunotransferencia de PVDF hidrófilas de esta invención y las referencias (FL - membrana de PVDF hidrófoba, y NC - membrana Whatman/S&S BA-85). Cada tira horizontal de la figura contiene 5 puntos de transferencia Western separados; tres puntos en las muestras de avance en PVDF hidrófilo y un punto en cada una de las membranas de referencia. Cada tira horizontal de 5 puntos Western es el resultado de un experimento de electroforesis y transferencia (5 geles seguidos por 5 puntos se procesaron en cada experimento). Por diseño, cada experimento plantea condiciones idénticas a cada gel/punto con cantidades idénticas de muestra de proteínas (aplicada en 4 carriles a través de cada gel) antes de la electroforesis y la transferencia. Los resultados mostrados son los puntos transferidos registrados (quimioluminiscentes) para la detección de 2 proteínas (HSP70 y GAPDH) de una mezcla de muestra compleja (lisado), aplicados con concentraciones de muestra decrecientes, de izquierda a derecha en cada gel, y correspondientes a: 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg, 0,67 µg.

Membranas porosas adecuadas incluyen las formadas a partir de polímeros de sulfona aromática, politetrafluoroetileno, polímeros termoplásticos perfluorados, polímeros poliolefinicos, polietileno de peso molecular ultraalto, poliamidas incluyendo Nylon 6 y Nylon 66, y poli(fluoruro de vinilideno), prefiriéndose particularmente el poli(fluoruro de vinilideno). Las membranas porosas incluyen tanto membranas microporosas como membranas de ultrafiltración, y preferiblemente están en forma de láminas. Generalmente, los tamaños medios de los poros incluyen aquellos entre 0,001 y 10 micras. Las membranas de inmunotransferencia son nominalmente materiales de un tamaño de los poros de 0,45 µm. Las membranas de partida preferidas tienen una especificación del intervalo de porosidad (volumen de huecos) de 68-73%. Las membranas de inmunotransferencia son tradicionalmente simétricas. Sin embargo, el revestimiento se podría aplicar a una membrana asimétrica.

El revestimiento polimérico puede ser un copolímero o terpolímero formado a partir de al menos un monómero polifuncional modificado con al menos un grupo funcional hidrófilo, dichos monómero o monómeros polifuncionales hidrófilos seleccionados del grupo que consiste en acrilamidas polifuncionales, metacrilamidas polifuncionales y diacrililpiperacinas, y formados a partir de al menos un monómero monofuncional modificado con al menos un grupo funcional hidrófilo, dichos monómero o monómeros monofuncionales hidrófilos seleccionados del grupo que consiste en acrilamidas monofuncionales, metacrilamidas monofuncionales y acrililpiperacinas.

Se encontró que una membrana hidrófoba porosa, preferiblemente hecha de poli(fluoruro de vinilideno), revestida con un copolímero de acrilamida-metilenbisacrilamida reticulado, se volvía muy hidrófila. Por otra parte, al nivel del copolímero que se aplicaba a las muestras de membrana de PVDF porosa en repeticiones iniciales de esta invención, los ensayos de unión a IgG revelaban que los niveles de unión a proteínas estaban en la proximidad de 400 µg/cm². Este nivel es típico de la membrana de PVDF hidrófoba original y de membranas de nitrocelulosa convencionales. El primer resultado sorprendente era que las membranas así preparadas eran tanto hidrófilas como de gran capacidad de unión a proteínas. Sin embargo, el comportamiento para inmunotransferencias Western de estas muestras iniciales (las que exhibían este alto nivel de unión a proteínas) no era satisfactorio en cuanto a mantener un pequeño tamaño de los puntos de la muestra (morfología de los puntos) y en cuanto a la captura de la muestra en transferencias de puntos. Modificando el nivel de revestimiento de copolímero, se consiguió un comportamiento de inmunotransferencia satisfactorio. Con estos niveles modificados, los niveles de unión a proteínas se reducían hasta entre 250 y 325(00) µg/cm², pero el comportamiento de la inmunotransferencia Western ascendía hasta niveles intermedios entre la nitrocelulosa y la membrana de PVDF hidrófoba original preferida. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que el nivel de unión a proteínas no es el mejor o solo es

indicador del comportamiento de la membrana de inmunotransferencia Western. Sacrificar algo de capacidad de unión a proteínas al modificar el nivel de revestimiento sobre el sustrato puede dar como resultado un comportamiento de inmunotransferencia mejorado.

- 5 Así, los niveles de componentes y las concentraciones relativas de la formulación modificadora son críticos para obtener un comportamiento aceptable en ensayos de inmunodetección. Una concentración de sólidos conjunta baja en una relación de componentes muy específica equilibra el comportamiento de humedecimiento con agua frente al comportamiento de inmunotransferencia.

- 10 Se conserva el nivel de fluorescencia de fondo muy bajo de la membrana usada como sustrato. Sin embargo, si el nivel de química de modificación superficial es demasiado bajo, el resultado es una membrana que no es humedecible con agua hasta un punto aceptable. Si el nivel de modificación superficial es demasiado alto, las membranas resultantes exhiben energías superficiales extremadamente altas. Según se indica previamente, con niveles superiores de química de modificación superficial, la capacidad de unión a proteínas medida es básicamente equivalente a membranas de nitrocelulosa y PVDF, pero resulta un comportamiento de electrotransferencia pobre.

- 15 Según ciertas realizaciones, el nivel de sólidos total en la solución modificadora/reaccionante se ha de ajustar hasta entre 0,90% y 1,10% en peso. Una concentración de sólidos total en este intervalo con la relación de componentes especificada da como resultado un comportamiento de inmunotransferencia óptimo. Esta formulación incluye un componente fotoiniciador UV.

- 20 Las cantidades adecuadas del monómero monofuncional de acrilamida y el monómero de reticulación de bisacrilamida en la solución de reaccionantes han de estar entre 0,20% y 2,00% en peso (cada uno), preferiblemente con cantidades entre 0,30% y 0,60% en peso (cada uno) y lo más preferiblemente entre 0,40% y 0,50% en peso (inclusive, cada uno). La relación preferida de acrilamida a bisacrilamida de la solución de reaccionantes monómeros es aproximadamente 1:1 (masa/masa). La concentración conjunta de monómeros preferida de la solución de reaccionantes monómeros de acrilamida:metilenbisacrilamida está entre 0,5% y 1,5% en masa. Un componente fotoiniciador UV adecuado está presente en de 0,01% a 0,20% en peso, preferiblemente entre 0,05 y 0,15% en peso, y lo más preferiblemente entre 0,09% y 0,11% en peso. Fotoiniciadores UV adecuados incluyen Irgacure 500, 754, 2959 y 819DW. Los métodos para la preparación del sustrato de membrana porosa modificado según ciertas realizaciones incluyen las etapas de proporcionar un sustrato de membrana porosa, poner en contacto la superficie del sustrato de membrana porosa con una solución de reaccionantes que comprende acrilamida y metilenbisacrilamida, y un fotoiniciador adecuado, retirar la membrana de la solución y polimerizar el revestimiento in situ sobre el sustrato de membrana exponiendo el mismo a radiación de una longitud de onda e intensidad adecuadas durante un intervalo de tiempo adecuado. Preferiblemente, la membrana porosa puesta en contacto con la solución de reacción se irradia con una fuente de luz ultravioleta. Se pueden usar filtros para reducir o eliminar longitudes de onda no deseables que pueden provocar un daño a la membrana porosa. La cantidad de tiempo de exposición a la luz UV y su intensidad deben ser familiares para los expertos en la técnica.

- 35 En la realización preferida de la invención, se elabora una preparación a escala de laboratorio de la solución de monómeros reaccionantes disolviendo 1,00 g de acrilamida, $[H_2C=CH-C(O)-NH_2]$ monómero monofuncional; 0,80 g de metilenbisacrilamida, $[H_2C(-NH-C(O)CH=CH_2)_2]$ monómero de reticulación; y 0,20 g de fotoiniciador Irgacure 2959 en 198,00 g de agua Milli-Q®. Se requiere un intervalo de mezclado prolongado de aproximadamente 2 horas para disolver completamente el reticulador y el fotoiniciador.

- 40 Más específicamente, la membrana de partida hidrófoba porosa se prehumedece mediante inmersión en un líquido orgánico o en una solución acuosa del mismo que no hinche o disuelva la membrana porosa, y que prehumedezca toda la superficie porosa de la membrana.

- 45 El líquido puede ser un alcohol de bajo peso molecular o una mezcla de agua y un líquido orgánico miscible. Líquidos o composiciones adecuados incluyen metanol, etanol, isopropanol, sus mezclas con agua, mezclas de acetona/agua y mezclas de tetrahidrofurano/agua de tensión superficial suficientemente baja para afectar al humedecimiento de toda la superficie de la membrana.

- 50 El propósito de esta etapa de prehumedecimiento es asegurar que toda la superficie de la membrana se haga humedecible por agua, y posteriormente por la solución acuosa de monómeros reaccionantes. La etapa de prehumedecimiento debe estar seguida por una rigurosa etapa de intercambio con agua para eliminar la presencia del disolvente orgánico. Estos disolventes de prehumedecimiento o sus mezclas con agua pueden ejercer una influencia negativa sobre la polimerización pretendida de los monómeros reaccionantes.

- 55 La posterior inmersión y agitación suave de la membrana porosa humedecida con agua permite que toda la superficie de la membrana porosa se humedezca con solución de reaccionantes. Con tal de que se retire el exceso de agua de la membrana antes de la inmersión en la solución de reaccionantes, no se producirá una dilución significativa de la solución de reaccionantes.

La muestra se extrae después de un corto intervalo de tiempo (dos minutos) y la solución de reaccionantes en exceso se retira de la muestra de membrana. La membrana humedecida con solución de reaccionantes se expone anaeróbicamente a radiación UV para efectuar la polimerización directamente sobre toda la superficie de la

membrana porosa. La membrana revestida resultante exhibe: Un humedecimiento inmediato, completo y totalmente uniforme cuando se pone en contacto sobre una superficie de agua; Un alto nivel de comportamiento de inmunotransferencia Western; Un alto nivel de unión a proteínas ($\geq 250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de IgG) mediante un ensayo radiomarcado; y Baja fluorescencia de fondo (aproximadamente 2.000 rfu 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 graduada a 86, y ejecutando el paquete informático Magellan 5.0), que es aproximadamente dos veces la fluorescencia de fondo de la membrana no tratada (hidrófoba original no modificada) bajo las mismas condiciones de medida. Cuando se pone sobre la superficie de una solución acuosa saturada de cloruro de aluminio, la membrana se humedecerá totalmente en un intervalo de tiempo mínimo de no menos de 1 segundo y un intervalo de tiempo máximo que puede superar 60 segundos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Membrana de PVDF hidrófoba disponible comercialmente de Millipore Corporation (IPFL00000) se sumergió en alcohol metílico. La membrana se extrajo y se sumergió en agua con agitación para extraer metanol durante 1 minuto. La membrana se extrajo y se sumergió en agua fresca durante un intervalo de 2 minutos adicional y a continuación se puso en agua fresca antes de la inmersión en la solución de monómeros reaccionantes. El exceso de agua se drenó de la membrana y a continuación la membrana se sumergió en la solución de reaccionantes monómeros con agitación suave durante 2 minutos. A continuación la membrana se expuso a radiación UV desde ambas caras en un procedimiento de curado UV a una velocidad lineal de 4,6 a 7,6 m/min. (15 a 25 pies por minuto). La membrana se recuperó y se puso en un baño de agua para retirar monómero sin reaccionar y oligómeros y polímero no adherentes. Las muestras se secaron bien al aire a temperatura ambiente durante la noche, bien en un horno de aire forzado estático entre 60°C y 80°C durante 10 minutos o bien en un secador de choque a 90-110°C a una velocidad lineal de 4,6 a 7,6 m/min. (15 a 25 pies por minuto). Se midió que los materiales extraíbles de la membrana medios según se determinaba mediante un método de TOC (siglas en inglés de carbono orgánico total) interno eran aproximadamente $1,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, según se muestra en la Tabla 1.

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

Id. de Solicitante: ML6UJP37			Membrana IPLF Hidrófila de PVDF Recibida		
Solicitante Antoni Peters			Para Aplicaciones de inm unotransferencia e Inmunoensayos		
			Ext. para Análisis de TOC		
			Extracción Por: A. Pervez		
			TOC Por: M. Santos-Rosa & A. Pervez		
			Fecha: 10/16-19/2006		
Disolvente Te	mp. Ext.	Tiempo Ext.	Vol. Ext.	Área Bet.	
Ext. [°C]		[Horas]	[g]	[cm ²]	
Agua MiliQ	Ambiente	24	40	86,75	
				Resu	ltados
				Resu	midos

(continuación)

Ácido/Óxid	o de TOC	TOC	TOC Corregido	TOC	TOC
Id. de Muestra	[$\mu\text{l}/\text{min.}$]	[ppm de C]	[ppm de C]	[μg de C]	[μg de C/ cm^2]
Referencia 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 medios de monómeros residuales extraíbles se determinaron mediante HPLC. Los valores determinados a partir de 3 muestras se proporcionan en la Tabla 2.

- 5 Tabla 2. Niveles de Monómeros Extraíbles mediante HPLC - Las mismas muestras que se presentan 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

El procedimiento del Ejemplo 1 se usó para tratar membranas de PVDF que tenían las características técnicas, las condiciones de tratamiento y las soluciones de reaccionantes presentadas en las Tablas 3A-D, 4A-D y 5A-D.

Tabla 3A

DATOS DE MODIFICACIÓN para una Membrana de Inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila							
			Temperatura de	Propiedades de la Membrana de Partida			
	Nº Lote	Datos del Lote	Secadora de				
Nº Rodillos	Mezcla de	Membrana	Colada de la	Grosor (µm)	Porosidad (%)	Bbl Pt, kPa (psi)	Tiempo de Flujo
	Monómeros	de Partida	Membrana, C (F)				(segundos)
PRUEBA R - Sin Ajuste de Mezcla - Distancia frente a la Concentración de la Mezcla de Monómeros							
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R01	Mezcla R 1	IPFL 071007 T214	149 (300)	112	72,8	64,8 (9,4)	56,0
R02	Mezcla R 1	IPFL 071007 T205	149 (300)	113	73,0	64,8 (9,4)	63,0
R03	Mezcla R 1	IPFL 071007 T205	149 (300)	113	73,0	64,8 (9,4)	63,0
R04	Mezcla R 1	IPFL 071007 T205	149 (300)	113	73,0	64,8 (9,4)	63,0
R05	Mezcla R 1	IPFL 071007 T205	149 (300)	113	73,0	64,8 (9,4)	63,0
R06	Mezcla R 1	IPFL 071007 T206	149 (300)	111	72,4	65,5 (9,5)	65,0
R07	Mezcla R 1	IPFL 071007 T206	149 (300)	111	72,4	65,5 (9,5)	65,0
R08	Mezcla R 1	IPFL 071007 T206	149 (300)	111	72,4	65,5 (9,5)	65,0
R09	Mezcla R 1	IPFL 071007 T206	149 (300)	111	72,4	65,5 (9,5)	65,0
R10	Mezcla R 1	IPFL 071007 T214	149 (300)	112	72,8	64,8 (9,4)	56,0
R11	Mezcla R 1	IPFL 071007 T214	149 (300)	112	72,8	64,8 (9,4)	56,0
R12	Mezcla R 1	IPFL 071007 T214	149 (300)	112	72,8	64,8 (9,4)	56,0
R12 Final	ND	ND	149 (300)	ND	ND	ND	ND

Tabla 3B

DATOS DE MODIFICACIÓN para una Membrana de Inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila						
		Concentraciones de Componentes de la Mezcla de Monómeros				Distancia
		AC	MBAM	I-2959	Sólidos Totales	Por Rodillo
Nº Rodillos	Mezcla de Monómeros	Real	Real	Real	Reales	Totalizada, m (pies)
	Id. de Muestra	% en peso (HPLC)	% en peso (HPLC)	% en peso (HPLC)	% en peso (HPLC)	
PRUEBA R - Sin Ajuste de Mezcla - Distancia frente a la Concentración de la Mezcla de Monómeros						
ND	TAMBOR de la Mezcla R 1	0,5156	0,4214	0,1130	1,0500	0
R01	Inicio MM1	0,5091	0,4042	0,1102	1,0235	0
R02	MM2	0,5105	0,3957	0,1094	1,0156	152 (500)
R03	MM3	0,5038	0,3837	0,1055	0,9931	244 (800)
R04	MM4	0,4996	0,3773	0,1001	0,9771	335 (1100)
R05	MM5	0,4948	0,3708	0,0999	0,9655	381 (1250)
R06	MM6	0,4935	0,3685	0,1020	0,9640	472 (1550)
R07	MM7	0,4868	0,3618	0,0995	0,9481	564 (1850)
R08	MM8	0,4868	0,3605	0,0974	0,9448	655 (2150)
R09	MM9	0,4777	0,3553	0,0956	0,9286	701 (2300)
R10	MM10	0,4721	0,3528	0,0956	0,9204	792 (2600)
R11	MM11	0,4673	0,3521	0,0932	0,9125	884 (2900)
R12	MM12	0,4682	0,3561	0,0918	0,9161	975 (3200)
R12 Final	MM13 Final	0,4574	0,3546	0,0879	0,8999	1006 (3300)

Tabla 3C

DATOS DE MODIFICACIÓN para una Membrana de Inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila											
	Presión										Nivel de O ₂
	Presión										
N° Rodillos	Paso	Pared	Velocidad	Tipo/n°	Config.	Lámparas	Flujo de N ₂	UV P1	UV P3	UV P2	de Partida
	Cilindro	Cilindro	Lineal	Lámparas	Lámparas	Superior/Inferior		cm (pulg) HWC	cm (pulg) HWC	cm (pulg) HWC	(ppm)
	kPa (psi)	kPa (psi)	m (pies)/min			(SCFM)					
PRUEBA R - Sin Ajuste de Mezcla - Distancia frente a la Concentración de la Mezcla de Monómeros											
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,5 (1,0)	4,1 (1,6)	2,5 (1,0)	90,0
R01	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	70,0
R02	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	56,7
R03	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	39,3
R04	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	33,0
R05	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	28,8
R06	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	27,8
R07	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	26,9
R08	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	26,4
R09	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	27,4
R10	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	25,2
R11	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	27,1
R12	138 (20)	138 (20)	6 (20)	H/4	Zigzag	10/9,5	10/9,5	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	27,8
R12 Final	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,8 (1,1)	4,3 (1,7)	2,8 (1,1)	25,2

Tabla 3D

DATOS DE MODIFICACIÓN para una Membrana de Inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila												
	Velocidad	Humedecimiento con Agua	Humedecimiento con Agua	Tiempo de Humedecimiento con Sal	Tiempo de Humedecimiento con Sal	Tiempo de Humedecimiento con Sal	Tiempo de Humedecimiento con Sal	Tiempo de Humedecimiento con Sal	BKG	Inmunotransferencia QC	Inmunotransferencia	
Nº Rodillos	Humedecimiento con Agua	Uniforme	Completo	Humedecimiento con Sal	Humedecimiento con Sal	Humedecimiento con Sal	Humedecimiento con Sal	Humedecimiento con Sal	Fuores.	Pasa/Falla	Western	
	¿BIEN?	¿X-web?	¿BIEN?	Segundos	Segundos	Segundos	Segundos	Segundos	RFU	Referencia	Lisado Vivo	
PRUEBA R - Sin Ajuste de Mezcla - Distancia frente a la Concentración de la Mezcla de Monómeros												
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥NC
R01	S	S	S	4,7	3,5	3,0	3,7	1750,57	1750,57	Pasa Banda 9	≥NC	≥NC
R02	S	S	S	1,4	2,4	2,4	2,1	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R03	S	S	S	1,4	2,4	2,4	2,1	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R04	S	S	S	2,1	2,2	2,5	2,3	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R05	S	S	S	2,9	3,1	2,9	3,0	2015,63	2015,63	Pasa Banda 9	≥NC	≥NC
R06	S	S	S	2,2	2,3	2,3	2,3	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R07	S	S	S	4,1	3,9	4,0	4,0	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R08	S	S	S	2,3	3,7	3,2	3,1	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R09	S	S	S	5,7	7,3	5,3	6,1	1927,95	1927,95	Pasa Banda 9	≥NC	≥NC
R10	S	S	S	5,4	7,1	5,4	6,0	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R11	S	S	S	6,3	7,5	5,6	6,5	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC	≥NC
R12	S	S	S	8,5	7,8	7,6	8,0	1708,5	1708,5	Pasa Banda 9	≥NC	≥NC
R12 Final	S	S	S	16,7	16,5	16,3	16,5	ND	ND	ND	≥NC	≥NC

Tabla 4A

DATOS DE MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA - Membrana de inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila					
				T Trat. Térmico	Temperatura de
		Nº Lote	Datos del Lote	o Mod Temp.	Secadora de
Segmento	Nº Rodillos	Mezcla de	Membrana	Secadora	Colada de la
de Prueba		Monómeros	de Partida	Lin.	Membrana, °C (°F)
PRUEBAS - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL					
ND	ND	ND	ND		
Análisis	R01	Mezcla S 1	IPFL 079007 T203	96 (205)	149 (300)
S1	R02	Mezcla S 1	IPX 070907 R103	96 (205)	149 (300)
S1	R03	Mezcla S 1	IPX 091407 T103	96 (205)	154 (310)
S1	R04	Mezcla S 1	IPX 120307T107	96 (205)	149 (300)
S1	R05	Mezcla S 1	IPX 091407 T102	96 (205)	154 (310)
S1	R06	Mezcla S 1	IPX 070907 R105	95 (204)	149 (300)
S2	R07	Mezcla S 1	IPX 120307 T907	93 (200)	149 (300)
S2	R08	Mezcla S 1	IPX 120307 T907	Transición	149 (300)
S2	R09	Mezcla S 1	IPX 120307T107	96 (205)	149 (300)
S2	R10	Mezcla S 1	IPX 120307T107	Transición	149 (300)
S2	R11	Mezcla S 1	IPX 120307T107	99 (210)	149 (300)
S2	R12	Mezcla S 1	IPX 120307T107	99 (210)	149 (300)
S2	R13	Mezcla S 1	IPX 120307T107	99 (210)	149 (300)
Segmento 1 Variación de propiedades de la membrana de partida					
Segmento 2 Variación de la velocidad lineal y la temperatura de la secadora					

Tabla 4B

DATOS DE MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA - Membrana de inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila												
Propiedades de la Membrana de Partida			Muestras de Mezclas de Monómeros y Concentraciones							Distancia		
Segmento	Nº Rodillos	Grosor (µm)	Porosidad (%)	Bbl Pt, kPa (psi)	Tiempo de Flujo (segundos)	Mezcla de Monómeros	AC	MBAM	1-2959	Sólidos	Totalizada	
de Prueba							% en peso	Real	% en peso	Reales	Por Rodillo	
						Id. de Muestra	% en peso	% en peso	% en peso	% en peso	m (pies)	
PRUEBA S - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL												
ND	ND	ND	ND	ND	ND	MM1B	0,4978	0,3894	0,1005	0,9878	46 (150)	
Análisis	R01	112	72,8	66 (9,6)	61,0	MM1C inicio	0,4926	0,3877	0,1005	0,9808	91 (300)	
S1	R02	115	74,8	64 (9,3)	55,0	MM2B	0,4893	0,3849	0,0996	0,9738	137 (450)	
S1	R03	115	66,4	66 (9,6)	59,0	MM3B	0,4812	0,3785	0,0971	0,9568	183 (600)	
S1	R04	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM4B	0,4780	0,3760	0,0963	0,9503	229 (750)	
S1	R05	122	66,2	76 (11,1)	78,3	MM5B	0,4761	0,3733	0,0954	0,9448	290 (950)	
S1	R06	130	74,7	74 (10,7)	74,0	MM6B	0,4785	0,3757	0,0953	0,9495	335 (1100)	
S2	R07	926	72,9	65 (9,4)	65,0	MM7B	0,4699	0,3678	0,0934	0,9311	366 (1200)	
S2	R08	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM8B	0,4673	0,3656	0,0926	0,9255	398 (1305)	
S2	R09	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM9B	0,4660	0,3644	0,0925	0,9229	428 (1405)	
S2	R10	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM10B	0,4655	0,3637	0,0917	0,9209	459 (1505)	
S2	R11	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM11B	0,4642	0,3619	0,0910	0,9171	489 (1605)	
S2	R12	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM12B	0,4618	0,3598	0,0903	0,9119	520 (1705)	
S2	R13	126	72,9	65 (9,4)	65,0	MM13B	No Disponible	No Disponible	No Disponible	No Disponible	656 (1855)	
Segmento 1	Variación de propiedades de la membrana de partida											
Segmento 2	Variación de la velocidad lineal y la temperatura de la secadora											

Tabla 4C

DATOS DE MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA - Membrana de inmunotransferencia We stern de PVDF Hidrófila									
		Presión	Presión		Condiciones de la Cámara UV				Nivel de O ₂
		Paso	Pared	Velocidad	Flujo de N ₂	UVP1	UVP3	UVP2	de Partida
Segmento	Nº Rodillos	Cilindro	Cilindro	Lineal	Superior/Inferior	cm (pulg) HWC	cm (pulg) HWC	cm (pulg) HWC	(ppm)
de Prueba		kPa (psi)	kPa (psi)	m (pies)/min	(SCFM)				
PRUEBAS - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL									
ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND
Análisis	R01	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,8 (1,5)	2,8 (1,1)	15,0
S1	R02	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,8 (1,5)	2,8 (1,1)	42,0
S1	R03	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,8 (1,5)	2,8 (1,1)	40,0
S1	R04	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,8 (1,5)	2,8 (1,1)	40,0
S1	R05	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,8 (1,5)	2,8 (1,1)	40,0
S1	R06	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,8 (1,5)	2,8 (1,1)	40,0
S2	R07	20	20	22	10/9,5	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	53,7
S2	R08	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	39,1
S2	R09	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	37,6
S2	R10	20	20	18	10/9,5	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	33,0
S2	R11	20	20	18	10/95	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	12,34
S2	R12	20	20	20	10/9,5	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	24,9
S2	R13	20	20	25	10/95	2,5 (1,0)	3,6 (1,4)	2,8 (1,1)	25,2
Segmento 1 Variación de las propiedades de la membrana de partida									
Segmento 2 Variación de la velocidad lineal y la temperatura de la secadora									

Tabla 4D

DATOS DE MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA - Membrana de inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila													
		Velocidad	Humedec.	Humedec.	Humedec.	Humedec.	Humedec.	Humedec.	Humedec.	Humedec.	Fluores.	Inmunotransf.	Inmunotransf.
Segmento	Nº Rodillos	Humedec con Agua	Uniforme	Completo	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	BKG	Pasa/Falla	Western
de Prueba		¿BIEN?	¿X-web?	¿BIEN?	Segundos	Segundos	Segundos	Segundos	Segundos	Segundos	RFU	Referencia	Lisado Vivo
PRUEBA S - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL													
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Análisis	R01	S	S	S	82	8,8	49	7,3	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S1	R02	S	S	S	26,2	15,2	53	15,6	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S1	R03	S	S	S	4,2	4,2	2 9	3,8	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S1	R04	S	S	S	54	136	10,3	9,8	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S1	R05	S	N	N	7,8	4,6	5,7	6,0	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S1	R06	S	S	S	12,7	8,0	9,9	10,2	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	>NC
S2	R07	S	S	S	>120*	90,0	25,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	>NC
S2	R08	S	S	S	>120*	>120	40,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S2	R09	S	S	S	>120*	>120	30,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S2	R10	S	S	S	>120*	>120	55,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	>NC
S2	R11	S	S	S	>120*	>120	80,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S2	R12	S	S	S	>120*	>120	80,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
S2	R13	S	S	S	>120	>120	55,0	Sin significado	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	N/Disp.	≥NC
Segmento 1	Variación de las propiedades de la membrana de partida												
Segmento 2	Variación de la velocidad lineal v la temperatura de la secadora												

Tabla 5A

DATOS DE MODIFICACIÓN para una Membrana de Inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila						
					T Trat. Térmico	Temperatura
		Nº Lote	Datos del Lote		o Mod Temp.	Secadora de
Segmento	Nº	Mezcla de	Membrana	Buena	Secadora	Colada de la
de Prueba		Monómeros	de Partida	Distancia, m (pies)	Lin.	Membrana, °C (°F)
PRUEBA T - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL						
1	ND	TAMBOR 010908M1		0	ND	ND
1	ND	Depósito 010908M1-MM1		0	ND	ND
1	ND	Depósito 010908M1-MM2 Diluido		0	ND	ND
1	R01	010908M1	IPVH 050107 T101B	47 (155)	93 (200)	
1	R02	010908M1	IPFL 071007 T203	27 (90)	93 (200)	149 (300)
2	R03	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	93 (200)	149 (300)
2	R04	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	93 (200)	149 (300)
2	R05	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	Transición	149 (300)
2	R06	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	104 (220)	149 (300)
2	R07	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	102 (215)	149 (300)
2	R08	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	102 (215)	149 (300)
2	R09	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	Transición	149 (300)
2	R10	010908M1	IPX 120307 T109	27 (90)	104 (220)	149 (300)
3	R11	010908M1	IPX 091407 T101	3 (10)	96,3 (205,4)	149 (300)
3	R12	010908M1	IPX 071007 T2133	27 (90)	96,4 (205,5)	149 (300)
3	R13	010908M1	IPX 120307 T104	27 (90)	96,6 (205,8)	149 (300)
3	R14	010908M1	IPX 070907 T105	27 (90)	97,2 (206,1)	149 (300)
3	R15	010908M1	IPX 070907 R102	27 (90)	96 (205)	149 (300)
3	R16	010908M1	IPX 070907 R106	27 (90)	96 (205)	149 (300)
3	R17	010908M1	IPX 120307 R110	27 (90)	96 (205)	149 (300)
3	ND	010908M1	ND	0	96 (205)	
Segmento 1 Diagnóstico						
Segmento 2 Variación de la Temperatura de la Secadora y la Velocidad Lineal						
Segmento 3 Variación de la Porosidad y el Grosor - Membrana de Partida						

Tabla 5B

DATOS DE MODIFICACIÓN PARA Membrana de inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila											
		Propiedades de la Membrana de Partida				Muestras de Mezclas de Monómeros y Concentraciones					Distancia
Segmento	Nº Rodillos	Grosor (µm)	Porosidad (%)	Bbl Pt, kPa (psi)	Tiempo de Flujo	Mezcla de Monómeros	AC	MBAM	1-2959	Sólidos	Totalizada
de Prueba					(segundos)	Id. de Muestra	% en peso	% en peso	% en peso	Reales	Por Rodillo
PRUEBA T - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL											
1	ND	ND	ND	ND	ND	TAMBOR	076	0,60	0,15	1,51	0
1	ND	ND	ND	ND	ND	MM1	0,75	0,58	0,15	148	0
1	ND	ND	ND	ND	ND	MM2 Inicio	0,51	0,40	0,10	100	0
1	R01	109-125	No	No	No Disponible	No Tomada	ND	ND	ND	ND	375
1	R02	112	72,8	96	61,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	675
2	R03	120	71 0	9,5	63,0	MM3	0,50	0,39	0,10	0,99	775
2	R04	120	71,0	9,5	63 0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	875
2	R05	120	71,0	95	63,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	975
2	R06	120	71,0	9,5	63,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1075
2	R07	120	71,0	95	63,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1175
2	R08	120	71,0	9,5	63,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1275
2	R09	120	71,0	95	63,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1375
2	R10	120	71,0	9,5	63,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1675
3	R11	118	66,7	8,3	4,9 (46,7)	MM4	0,48	038	0,09	0,96	1775
3	R12	116	72,3	9,0	0,721	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1875
3	R13	119	72,4	97	66,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	1975
3	R14	13,0	74,7	107	74,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	2075
3	R15	134	73,4	9,9	29,483 (65,0)	No Tomada	ND	ND	ND	ND	2175

(continuación)

PRUEBA T - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL												
3	R16	114	72,4.	9,7	67,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	ND	2275
3	R17	113	70,2	94	61,0	No Tomada	ND	ND	ND	ND	ND	2375
3	ND	ND	ND	ND	ND	MM5	047	0,37	0,09	0,94	0,94	2676
Segmento 1 Diagnóstico												
Segmento 2 Variación de la Temperatura de la Secadora y la Velocidad Lineal												
Segmento 3 Variación de la Porosidad y el Grosor - Membrana de Partida												

Tabla 5C

DATOS DE MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA - Membrana de inmunotransferencia We stern de PVDF									
		Presión	Presión		Condiciones de la Cámara UV			Nivel de O ₂	
		Paso	Pared	Velocidad	Flujo de N ₂	UVP1	UVP3	UVP2	de Partida
Segmento	Nº Rodillos	Cilindro	Cilindro	Lineal	Superior/Inferior	cm (pulg) HWC	cm (pulg) HWC	cm (pulg) HWC	(ppm)
de Prueba		kPa (psi)	kPa (psi)	m	(SCFM)				
PRUEBA T - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL									
1	ND	20	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	20	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	20	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	R01	20	20	18	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	52,0
1	R02	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	77,0
2	R03	20	20	22-20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	78,0
2	R04	20	20	18	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	44,0
2	R05	20	20	18	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	32,0
2	R06	20	20	18	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	32,0
2	R07	20	20	22-20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	30,0
2	R08	20	20	18	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	26,0
2	R09	20	20	18-20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	20,0
2	R10	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	22,0
3	R11	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	38,0
3	R12	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	34,0
3	R13	20	20	20	10/1,9	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	41,0
3	R14	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	21,0
3	R15	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	21,0
3	R16	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	21,0
3	R17	20	20	20	10/9,5	2,3 (0,9)	3,6 (1,4)	2,5 (1,0)	21,0
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Segmento 1 Diagnóstico									
Segmento 2 Variación de la Temperatura de la Secadora y la Velocidad Lineal									
Segmento 3 Variación de la Porosidad y el Grosor - Membrana de Partida									

Tabla 5D

DATOS DE MODIFICACIÓN para una Membrana de Inmunotransferencia Western de PVDF Hidrófila												
			Velocidad	Humedec. con Agua	Humedec. con Agua	Nivel de	Opacidad/	Tiempo de	Tiempo de	Tiempo de	Tiempo de	Fluores.
												Immunotransf. QC
Segmento	N° Rodillos	Humedec con Agua	Uniforme con Agua	Completo	Moteado	Transparencia	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	Humedec. con Sal	BKG	Pasa/Falla
de Prueba		¿BIEN?	¿X-web?	¿BIEN?	¿BIEN?	¿BIEN?	Segundos	Segundos	Segundos	Segundos	RFU	Referencia
PRUEBA T - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL												
1	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
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	R01	S	S	S	S	S	2,4/5,6	3,4/6,2	3,1/6,2	3,0/6,0	N/Disp.	≥NC
1	R02	S	S	S	S	S	2,9/12,62	3,2/11,4	2,9/2,9	3,0/9,0	N/Disp.	≥NC
2	R03	S	S	S	S	S	1,1/24,1	1,4/108	1,1/4,1	1,2/13,0	N/Disp.	≥NC
2	R04	S	S	S	S	S	1,2/14,5	1,5/19,9	1,3/5 6	1,3/13,3	N/Disp.	≥NC

(continuación)

PRUEBA T - POROSIDAD/GROSOR, TEMP SECADORA VMF4, VELOCIDAD LINEAL													
2	R05	S	S	S	S	S	S	13/10,5	1,5/15,4	1,3/4,2	1,4/10 0	N/Disp.	≥NC
2	R06	S	S	S	S	S	S	1,3/24,7	1,4/9,5	1,3/4,0	1,3/12,7	N/Disp.	≥NC
2	R07	S	S	S	S	S	S	2,5/60,0	2,3/25,4	2,5/5,4	2,4/30,0	N/Disp.	≥NC
2	R08	S	S	S	S	S	S	2,1/9,7	2,6 / 4,0	2,6/5,5	2,8/9,7	N/Disp.	≥NC
2	R09	S	S	S	S	S	S	2,8/3,1	3,5/22,6	2,5 / 5,9	2,9/13,9	N/Disp.	≥NC
2	R10	S	S	S	S	S	S	3,1/28,7	3,5/15,7	2,5/7,1	3,0/17,2	N/Disp.	≥NC
3	R11	S	S	S	S	S	S	24,1	6,5	42	11,6	N/Disp.	≥NC
3	R12	S	S	S	S	S	S	47,1	35,7	86	12,34	N/Disp.	≥NC
3	R13	S	S	S	S	S	S	67,9	70,7	34,5	57,7	N/Disp.	≥NC
3	R14	S	S	S	S	N (ALTO)	N (Blanco)	>180	>180	>180	>180	N/Disp.	≥NC
3	R15	S	S	S	S	N (ALTO)	N (Blanco)	>180	>180	>180	>180	N/Disp.	≥NC
3	R16	S	S	S	S	N (ALTO)	S	>180	57,3	16,4	>180	N/Disp.	≥NC
3	R17	S	S	S	S	S	S	19,3	40,8	5,1	21,7	N/Disp.	≥NC
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Segmento 1 Diagnóstico													
Segmento 2 Variación de la Temperatura de la Secadora y la Velocidad Lineal													
Segmento 3 Variación de la Porosidad y el Grosor - Membrana de Partida													

Ejemplo 3

El protocolo usado para la inmunotransferencia Western y la detección quimioluminiscente es como sigue:

- Las muestras de proteína se separan electroforéticamente usando Bis:Tris (4~12%) midi gradient gel (Invitrogen, WG1402BOX).
- 5 • Las muestras se electrotransfieren a 45 V durante 1 h 15 min. usando un aparato de transferencia de depósito BioRad (Criterion Blotter # 165-6024) sobre una membrana hidrófila preparada como en el Ejemplo 1.
- Los puntos se lavan 2 veces (3 min. cada una) en TBS-T (Tween al 0,1%)
- Los puntos se bloquean durante 1 h a TA en TBS-T con NFM (leche no grasa, Carnation) al 3%.
- 10 • Los puntos se lavan 2 veces (3 min. cada una) en TBS-T (Tween al 0,1%)
- Los puntos se incuban con anticuerpo primario en TBS-T durante 1 h.
- Los puntos se lavan 3 veces (5 min cada una) en TBS-T (Tween al 0,1%)
- Los puntos se incuban con anticuerpo secundario en TBS-T durante 1 h.
- Los puntos se lavan 4 veces (5 min. cada una) en TBS-T (Tween al 0,1%)
- 15 • Los bandas de proteína 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 inmunotransferencia se presentan en las Figuras 1, 2 y 3.

20 Los resultados de la inmunotransferencia Western procedentes de una prueba de avance típica demuestran las diferencias de comportamiento entre la membrana de inmunotransferencia de PVDF hidrófila de esta invención y las referencias (FL - membrana de PVDF hidrófobo, y NC - membrana Whatman/S&S BA-85). Cada tira horizontal de la figura contiene 5 puntos de transferencia Western separados; tres puntos en las muestras de avance de PVDF hidrófilas y un punto en cada una de las membranas de referencia. Cada tira de 5 puntos Western es el resultado de un experimento de electroforesis y transferencia (se utilizaron 5 geles en cada experimento). Por diseño, cada experimento plantea condiciones idénticas con cantidades idénticas de muestra de proteína (aplicadas en 4 carriles a través de cada gel) antes de la electroforesis y la transferencia. Los resultados presentados son los puntos de transferencia para la detección de 2 proteínas (HSP70 y GAPDH) de una mezcla de muestra compleja (lisado), aplicada con sólidos de muestra (concentraciones) decrecientes, de izquierda a derecha y correspondientes a: 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg, 0,67 µg.

30 Nótese que en cada fila (el resultado de un solo experimento de electroforesis y electrotransferencia) se comparan tres membranas de inmunotransferencia hidrófilas de la invención con dos membranas de inmunotransferencia de referencia. Un testigo consiste en una membrana de inmunotransferencia de nitrocelulosa (NC) y el otro testigo es una membrana de inmunotransferencia de PVDF hidrófoba (FL). En el caso de cada experimento simple, la membrana de FL demuestra la intensidad de señal más alta para las 4 concentraciones de solución de proteína de análisis, y la membrana de NC demuestra la intensidad de señal más baja. Se puede observar, cuando se comparan las intensidades de señal entre las membranas de inmunotransferencia de referencia de NC y las membranas de inmunotransferencia de PVDF hidrófilas de la invención, que a las concentraciones de muestra de analito más altas (lado izquierdo de cada punto), las membranas de NC y las de PVDF hidrófilas exhiben intensidades de señal similares. Sin embargo, a medida que se avanza hacia concentraciones de analito cada vez menores (avanzando de izquierda a derecha), la intensidad de señal cae más rápidamente para la membrana de NC. Esto demuestra que la membrana de PVDF hidrófila permite una detección de muestras con concentraciones de proteína inferiores que la membrana de NC.

Esta solicitud es una solicitud divisionaria basada en la solicitud de patente europea 09168000.9 (la "solicitud original").

45 La solicitud original se dirige a una membrana porosa que comprende una membrana de sustrato polimérico, teniendo dicha membrana de sustrato polimérico su superficie modificada con un revestimiento polimérico reticulado que comprende acrilamida y metilenbisacrilamida, en donde dicho revestimiento hace hidrófila a dicha superficie, y en donde dicha superficie tiene una capacidad de unión a proteínas cuando se mide mediante un análisis de unión a IgG de aproximadamente 250-325 µg/cm².

En realizaciones de la invención el nivel medio de carbono orgánico total de dicha membrana está por debajo de 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y/o los niveles de monómeros extraíbles, cuando se determinan mediante HPLC, están por debajo de 0,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la acrilamida, y por debajo de 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la metilenbisacrilamida.

- 5 El sustrato puede tener un valor de fluorescencia de fondo, y en donde dicha membrana modificada exhibe una fluorescencia de fondo de aproximadamente dos veces la de dicho valor de la fluorescencia de fondo del sustrato bajo condiciones de medida idénticas.

El sustrato membranoso comprende poli(fluoruro de vinilideno).

La relación de acrilamida a metilenbisacrilamida de la solución de reaccionantes monómeros puede ser aproximadamente 1:1 (masa/masa).

- 10 La concentración total de monómeros de la solución de reaccionantes monómeros de acrilamida:metilenbisacrilamida puede estar entre 0,5% y 1,5% en masa.

La membrana porosa puede tener un nivel de fotoiniciador entre 0,01% y 0,20%.

- 15 La solicitud original también se dirige a un método para preparar una membrana porosa hidrófila, de baja fluorescencia, de alta capacidad de unión a proteínas que comprende un sustrato de membrana porosa hidrófobo, de baja fluorescencia de fondo, de alta capacidad de unión a proteínas, y una modificación superficial de baja fluorescencia de fondo, comprendiendo el método:

proporcionar un sustrato de membrana porosa hidrófobo, de baja fluorescencia de fondo, de alta capacidad de unión a proteínas;

- 20 poner en contacto la superficie de la membrana porosa con una solución de reaccionantes monómeros que comprende acrilamida y metilenbisacrilamida y un fotoiniciador;

retirar la membrana de la solución de reacción;

retirar el exceso de solución de reaccionantes;

- 25 polimerizar la solución de reaccionantes de acrilamida y metilenbisacrilamida bajo condiciones anaeróbicas directamente sobre toda la superficie de la membrana porosa hidrófoba para formar un revestimiento de fondo continuo hidrófilo de baja fluorescencia de fondo; y

secar la membrana.

Las cantidades de acrilamida y metilenbisacrilamida en la solución de reacción pueden estar entre 0,20% y 2,00%, tales como aproximadamente 0,50% y aproximadamente 0,40%, respectivamente.

- 30 La cantidad del fotoiniciador en la solución de reacción puede estar entre 0,01% y 0,20%, tal como aproximadamente 0,10%.

El fotoiniciador puede ser Irgacure 2959.

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo de inmunodetección por inmunotransferencia Western para detectar proteínas elegidas en una muestra de proteínas, que comprende:

separar electroforéticamente dichas proteínas elegidas de dicha muestra de proteínas;

- 5 transferir las proteínas elegidas separadas a un sustrato polimérico poroso de fluoropolímero que tiene un tamaño medio de los poros entre 0,001 y 10 micras, su superficie revestida con un revestimiento polimérico reticulado hidrófilo que tiene una capacidad de unión a proteínas cuando se mide mediante un análisis de unión a IgG de 250-325 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ que comprende acrilamida y metilenbisacrilamida, en donde los niveles medios de monómeros extraíbles del sustrato revestido, cuando se determinan mediante HPLC, están por debajo de 0,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la acrilamida y por debajo de 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la metilenbisacrilamida, en donde la concentración de sólidos totales de monómeros de acrilamida, monómeros de bisacrilamida y un fotoiniciador UV está entre 0,90% y 1,10% en peso, y la concentración conjunta de monómeros de la solución de monómeros reaccionantes de monómeros de acrilamida:metilenbisacrilamida usada para revestir dicha superficie está entre 0,5% y 1,5% en masa, y además en donde la cantidad de monómeros de acrilamida está entre 0,30% y 0,60% en peso, la cantidad de monómeros de bisacrilamida está entre 0,30% y 0,60% en peso, y la cantidad del fotoiniciador UV está entre 0,01% y 0,20%;

bloquear dicho sustrato para evitar la unión no específica de anticuerpos a dicha superficie del sustrato;

incubar dicho sustrato con un anticuerpo primario capaz de unirse a dichas proteínas elegidas;

incubar dicho sustrato con un anticuerpo secundario marcado capaz de complejarse con la enzima de dicho anticuerpo primario para proporcionar una señal medible; y

- 20 detectar dicha señal mediante detección visual, quimioluminiscente o fluorescente.

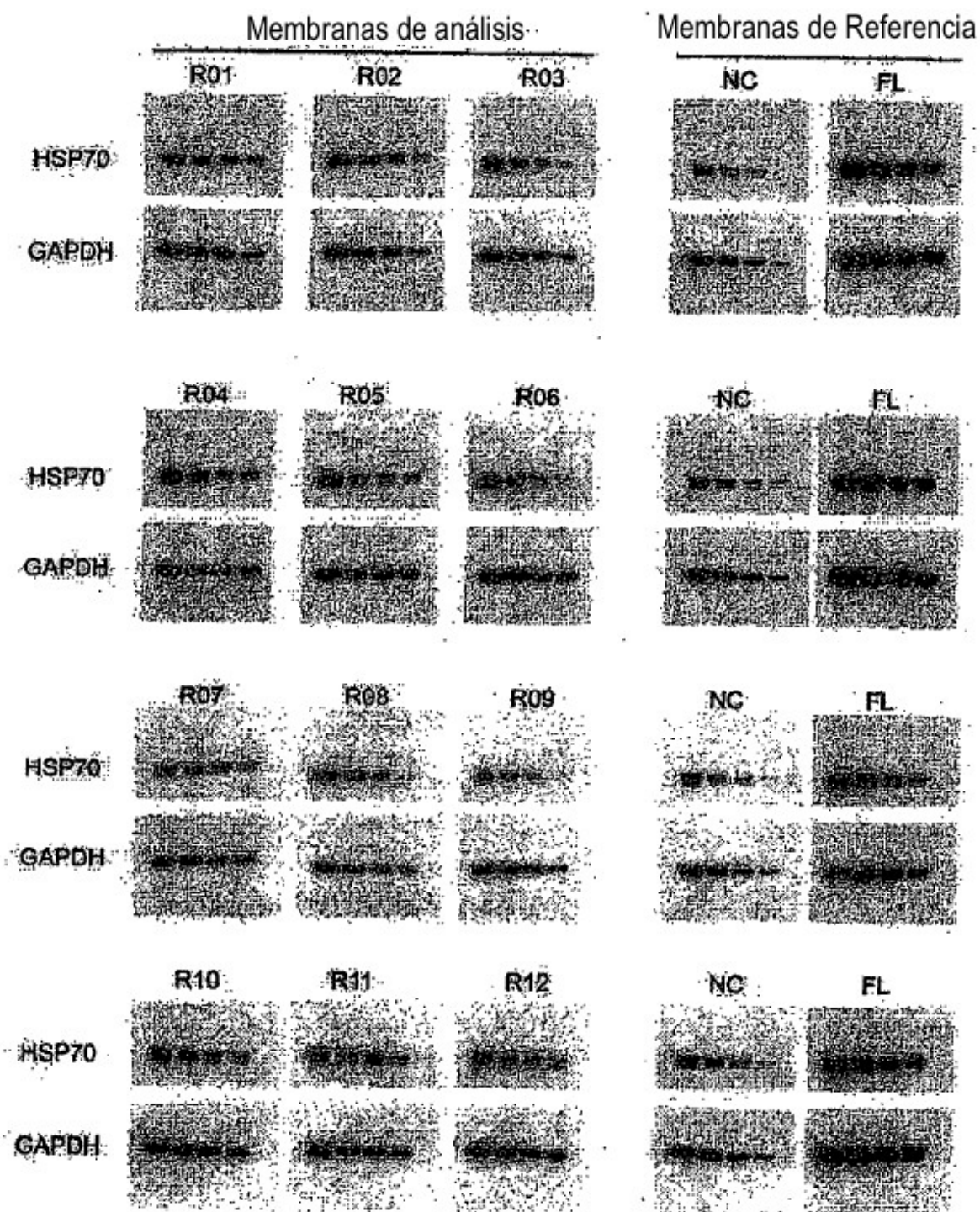
2. El ensayo de inmunodetección por inmunotransferencia Western según la reivindicación 1, en el que el nivel medio de carbono orgánico total de dicho sustrato polimérico poroso está por debajo de 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- 25 3. El ensayo de inmunodetección por inmunotransferencia Western según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato polimérico poroso tiene un valor de fluorescencia de fondo, y en el que dicho sustrato modificado con dicho revestimiento polimérico exhibe una fluorescencia de fondo de dos veces la de dicho valor de fluorescencia de fondo del sustrato bajo condiciones de medida idénticas.

4. El ensayo de inmunodetección por inmunotransferencia Western según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de fluoropolímero comprende poli(fluoruro de vinilideno).

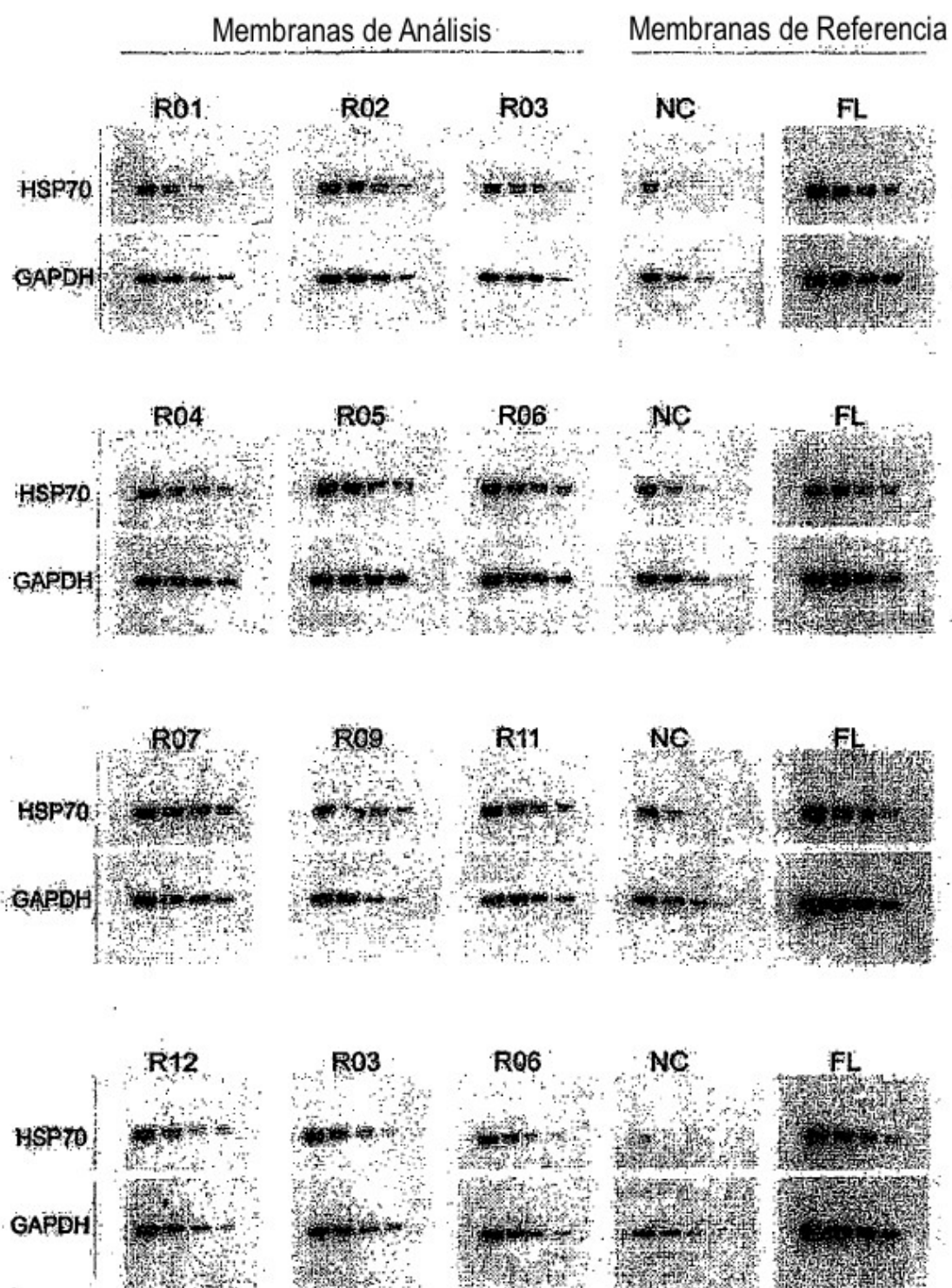
- 30 5. El ensayo de inmunodetección por inmunotransferencia Western según la reivindicación 1, en el que la relación de acrilamida a metilenbisacrilamida es 1:1 (masa/masa).

Figura 1. Resultados de Inmunotransferencia Western procedentes de la Prueba R



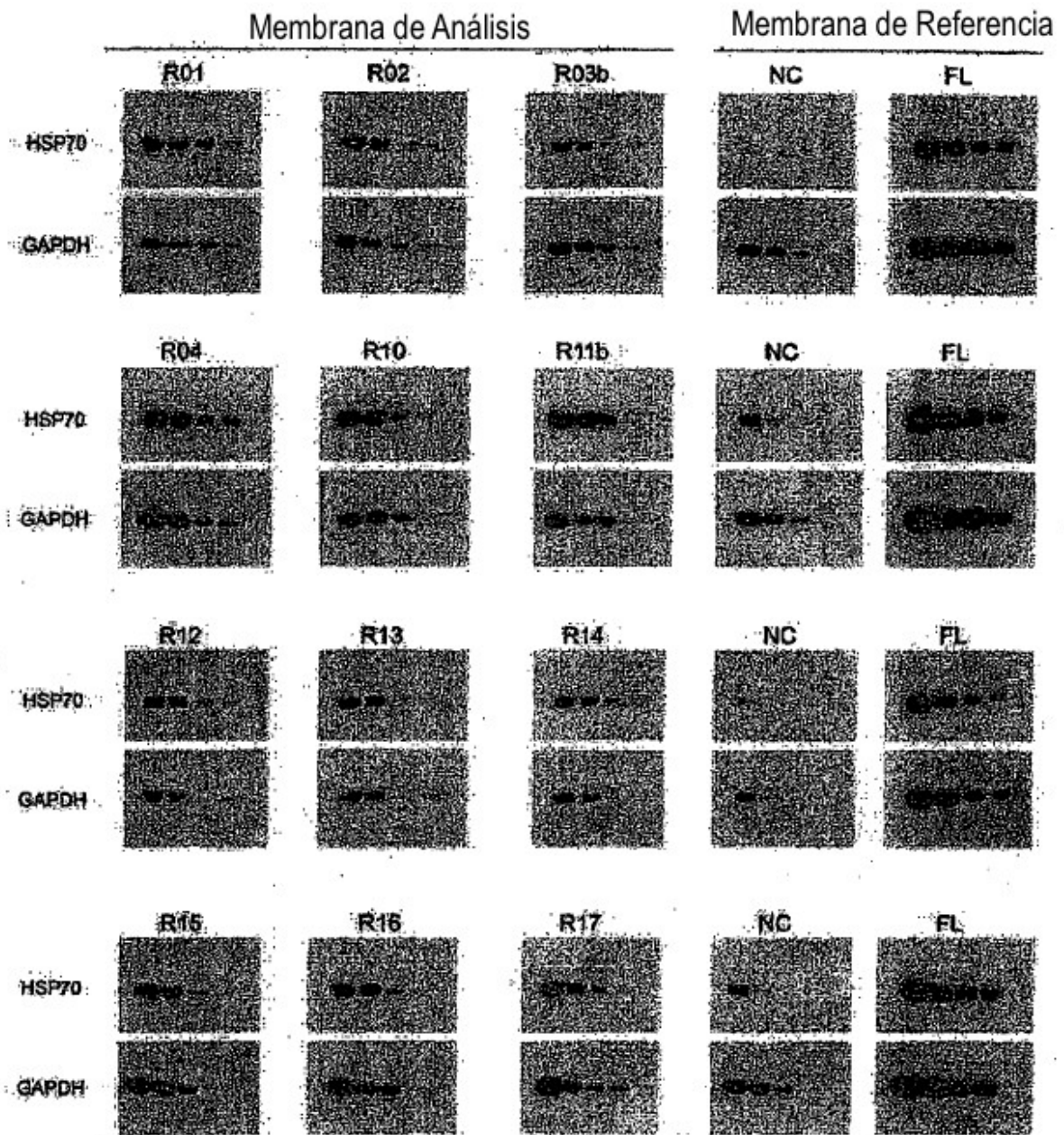
Resultados correspondientes a las condiciones de prueba proporcionadas en la Tabla 1.

Figura 2. Resultados de Inmunotransferencia Western procedentes de la Prueba S



Resultados correspondientes a las condiciones de prueba proporcionadas en la Tabla 2.

Figura 3. Resultados de Inmunotransferencia Western procedentes de la Prueba T



Resultados correspondientes a las condiciones de prueba proporcionadas en la Tabla 3.