

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 945**

51 Int. Cl.:

B01J 20/24 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01)

B01J 20/285 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

B01D 15/32 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2014** **PCT/GB2014/000401**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015** **WO15052465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2014** **E 14786703 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017** **EP 3055059**

54 Título: **Medio de cromatografía**

30 Prioridad:

09.10.2013 WO PCT/GB2013/052626

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

05.07.2017

73 Titular/es:

PURIDIFY LTD. (100.0%)

Stevenage Bioscience Catalyst Gunnels Wood Road

Stevenage Hertfordshire SG1 2FX, GB

72 Inventor/es:

HARDICK, OLIVER;

BRACEWELL, DANIEL GILBERT y

DODS, STEWART

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 621 945 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

Medio de cromatografía

5 Campo de la invención

La invención se refiere a medios de cromatografía funcionalizados que son adecuados para aislar moléculas biológicas de fases móviles.

10 Antecedentes a la invención

El mercado de la biotecnología es el sector que está creciendo más rápido dentro del mercado farmacéutico mundial, representando el 20 % (153 billones de dólares) de todas las ventas en el mercado en 2012. Este crecimiento del 10 % de la participación de mercado en 2002 está establecido que crezca el 41 % entre 2012 y 2018 de 153 billones de dólares a 215 billones de dólares. Actualmente hay aproximadamente 200 productos de anticuerpos monoclonales (mAb) en el mercado y con más de 1000 en ensayos clínicos la necesidad de avance tecnológico en esta área es evidente. Con respecto a la última década, los títulos de fermentación típicos de biomoléculas han crecido de 0,5 g/l - 50 g/l, y mientras que los procesos de purificación aguas abajo también han recibido alguna investigación y desarrollo, mejoras en este área no se han correspondido con aquellas aguas arriba. Las operaciones de unidades de cromatografía fuertemente basadas en unir / eluir son, en términos económicos, la clave para avances en el procesamiento aguas abajo de biomoléculas, tales como mAb. La cromatografía explica una parte muy significativa de los costes de procesamiento aguas abajo de las biomoléculas, que a su vez afecta los costes globales de las propias biomoléculas.

Históricamente, la cromatografía de lecho empacutado convencional ha sido una herramienta de separación extremadamente poderosa. Sin embargo, está siendo cada vez más evidente que deben emplearse sistemas radicalmente nuevos para permitir que las biomoléculas se recuperen eficiente y económicamente después de la preparación.

Un área que ha visto desarrollo es la síntesis de nuevos ligandos para sustituir los actuales ligandos de afinidad caros.

Otra vía que ha sido explorada es la modificación de estructuras de soporte convencionales tales como adsorbentes de lecho empacutado de perlas porosas. Esto es normalmente para tratar inconvenientes asociados a tales adsorbentes, en particular problemas con la caída de presión y los tiempos de residencia. Estos inconvenientes normalmente producen separaciones ineficientes. El desarrollo de nuevas estructuras de adsorbente que permitan operación independiente del caudal ofrece la ventaja de elevado rendimiento, pero solo se ha demostrado que es generalmente útil a pequeña escala. Los problemas con el incrustamiento de adsorbente son comunes, y esto limita frecuentemente las técnicas de separación cromatográfica a operaciones de pulido de etapa tardía. Debe hacerse una compensación entre la incrustación y la capacidad de captura con respecto a los tamaños de poro de adsorbente. Se requieren pequeños tamaños de poro para la buena separación con curvas de rendimiento afiladas, pero producen elevado incrustamiento. En cambio, adsorbentes de tamaño de poro más grande (10 μm - 150+ μm) pueden ofrecer mejor manipulación de los incrustantes, pero biomoléculas diana pequeñas pueden pasar a través de un adsorbente tal sin unión.

Más recientemente, se ha informado de cromatografía de membrana como una alternativa potencialmente viable en el modo de captura de contaminantes.

Otro foco de la investigación ha sido el desarrollo de estructuras monolíticas que han demostrado ofrecer buena separación para biomoléculas grandes tales como plásmidos y virus debido a poros relativamente grandes presentes sobre la superficie. La tendencia de la industria actual a moverse hacia sistemas de un solo uso favorece la cromatografía de membrana, ya que la economía de las membranas de un solo uso es más favorable que las columnas de lecho empacutado de un solo uso.

Otra vía para el desarrollo es un cambio a procesamiento continuo. La marcha hacia el procesamiento continuo puede permitir lograr eficiencias en muchos sistemas. Así, la operación continua presenta oportunidades para la monitorización de procesos en tiempo real y el control automatizado con posibles beneficios que incluyen especificación de producto predecible, costes de laboratorio reducidos e integración con otros procesos continuos. Sin embargo, hasta la fecha se ha desarrollado poco con respecto a la operación de cromatografía realmente continua.

Por tanto, se apreciará que hay muchas vías diferentes de investigación que se emplean para proporcionar procesos mejorados para recuperar biomoléculas.

Las nanofibras poliméricas electrohiladas tienen propiedades que ofrecen una posible solución a los problemas observados con matrices de soporte convencionales usadas en el bioprocesamiento aguas abajo. Sus propiedades

se prestan fácilmente a superficies de soporte de ligando con las posibilidades de operaciones de alta capacidad y de alta velocidad de transferencia de masa, dando así unión independiente del caudal con una alta porosidad y sistema de tamaño de poro de superficie relativamente pequeña.

Se ha informado de cartuchos de adsorbente que contienen nanofibras poliméricas electrohiladas con funcionalidad de dietilaminoetilo (DEAE) con capacidades de unión de aproximadamente el 10 % de un sistema de lecho empaquetado típico, pero con caudales de aproximadamente cincuenta veces el de un sistema de lecho empaquetado típico. Tales sistemas de nanofibra presentan una relación de área superficial con respecto a volumen similar a la de un sistema de perlas poroso. Sin embargo, tales sistemas de nanofibra existentes tienen capacidades de unión algo más bajas que los sistemas de lecho empaquetado típicos. Los sistemas de nanofibra conocidos también muestran mala reproducibilidad cuando la misma membrana se usa múltiples veces. Esto representa un límite sobre su utilidad en la recuperación de biomoléculas.

Así, previamente no ha sido posible preparar sistemas de adsorbente de nanofibra con capacidades de unión superiores a aproximadamente el 10 % de un sistema de lecho empaquetado típico mientras que retienen la porosidad y operaciones reproducibles robustas asociadas a tales sistemas de nanofibra.

El espesor de los sistemas de adsorbente de nanofibra producidos por electrohilado está limitado durante la fabricación, ya que la deposición de nanofibras sobre una superficie de colector conectado a tierra da una superficie menos conectada a tierra a medida que aumenta la deposición. La carga residual en las fibras depositadas hace, por tanto, que el área sea menos atractiva a la deposición continuada, haciendo que las fibras se extiendan además sobre la superficie del colector. Esto tiene el efecto de limitar el espesor de las esteras de nanofibra producidas por el electrohilado a aproximadamente 100-200 μm . El espesor limitado de estas esteras de nanofibra trae consigo un límite inherente en la resistencia física de la estera global que limita la utilidad de materiales para aplicaciones de proceso tales como cromatografía.

Un sistema de adsorbente de nanofibra conocido se describe en Ma, et al, Journal of Membrane Science 265 (2005) 115-123. Este documento describe un proceso de producción de una membrana de nanofibra de celulosa, que implica tratar térmicamente una única capa de malla de fibra no tejida que consiste en nanofibras de acetato de celulosa, tratar las fibras de acetato de celulosa calentadas con NaOH y funcionalizar las fibras de celulosa resultantes con Cibacron Blue. Pueden apilarse juntas múltiples membranas, pegarse los bordes y colocarse la pila en un portafiltros.

Sumario de la invención

Se ha encontrado ahora que una serie específica de etapas de procesamiento físico y químico aumenta enormemente la capacidad de unión de sistemas de adsorbente de nanofibra, normalmente aumentando dicha capacidad de unión más del 250 % bajo condiciones de operación típicas. También se ha encontrado que ciertas etapas de procesamiento físico específico mejoran la resistividad química de sistemas de adsorbente de nanofibra. Esto significa que tanto los sistemas de adsorbente de la invención pueden usarse bajo condiciones más agresivas, como también que los sistemas de adsorbente pueden usarse múltiples veces sin pérdida de rendimiento.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía polimérico funcionalizado, proceso que comprende

- (I) proporcionar dos o más hojas no tejidas apiladas una encima de la otra, comprendiendo cada dicha hoja una o más nanofibras de polímero,
- (II) simultáneamente calentar y comprimir la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, y
- (III) poner en contacto el producto comprimido y calentado con un reactivo que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía.

Más específicamente, fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes implica fusionar puntos de contacto entre secciones de una nanofibra de polímero en una hoja con secciones de una nanofibra de polímero en una hoja adyacente. Normalmente, esto también implica fusionar puntos de contacto entre secciones de una nanofibra de polímero en una hoja con otras secciones de la misma nanofibra.

La presente invención también proporciona:

- Un medio de cromatografía funcionalizado obtenible por el proceso de la presente invención.
- Un proceso para preparar un cartucho de cromatografía, proceso que comprende llevar a cabo el proceso de la presente invención e incorporar el producto así obtenido en un cartucho.
- Un cartucho de cromatografía que (a) es obtenible por dicho proceso, o (b) que comprende uno o más medios de cromatografía funcionalizados de la invención.

- Uso de un medio de cromatografía funcionalizado de la invención o un cartucho de cromatografía de la invención en cromatografía.
- Un proceso para aislar una o más moléculas biológicas de una fase móvil, proceso que comprende poner en contacto una o más moléculas biológicas en una fase móvil con un medio de cromatografía funcionalizado de la invención o un cartucho de cromatografía de la invención.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra el rendimiento de un medio de cromatografía funcionalizado de la invención en cromatografía de intercambio aniónico.
- La Figura 2 muestra el rendimiento de un medio de cromatografía funcionalizado de la invención en cromatografía de intercambio aniónico.
- La Figura 3 muestra un sistema experimental para determinar la estabilidad química de membranas de cromatografía.
- La Figura 4 muestra fotografías de una membrana no según la invención y una membrana según la invención tras la exposición a NaOH.
- La Figura 5 muestra el espesor y las densidades de membranas no según la invención y membranas según la invención.
- La Figura 6 muestra las propiedades de flujo de membranas no según la invención y membranas según la invención.
- La Figura 7 muestra el efecto de presión sobre el espesor y las densidades de membranas según la invención.
- La Figura 8 muestra el efecto de presión sobre las propiedades de flujo de membranas según la invención.
- La Figura 9 muestra el efecto de presión sobre la capacidad de unión dinámica de membranas según la invención.
- La Figura 10 muestra el efecto del número de ciclos de funcionalización sobre las propiedades de flujo de membranas según la invención.
- La Figura 11 muestra el efecto del número de ciclos de funcionalización sobre la capacidad de unión dinámica de membranas según la invención.
- La Figura 12 muestra las propiedades de unión - elución de una membrana funcionalizada con SP de la invención.
- La Figura 13 muestra las propiedades de unión - elución de una membrana funcionalizada con CM de la invención.
- La Figura 14 muestra las propiedades de unión - elución de una membrana funcionalizada con Q de la invención.
- La Figura 15 muestra las propiedades de unión - elución de una membrana funcionalizada con proteína A de la invención.
- La Figura 16 muestra las propiedades de unión - elución de una membrana funcionalizada con fenilo de la invención.
- La Figura 17 muestra fotografías de membranas no según la invención tras la exposición a NaOH.
- La Figura 18 muestra el espesor y las densidades de membranas no según la invención y membranas según la invención.
- La Figura 19 muestra las propiedades de flujo de membranas no según la invención y membranas según la invención.
- La Figura 20 muestra la capacidad de unión dinámica de membranas no según la invención y membranas según la invención.

La Figura 21 muestra fotografías de una membrana según la invención (imagen superior) y una membrana no según la invención (imagen inferior) siguiendo múltiples ciclos de funcionalización.

Descripción detallada de la invención

Nanofibras de polímero

Los medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención se forman a partir de una o más nanofibras de polímero. Las nanofibras de polímero normalmente son nanofibras de polímero electrohiladas. Tales nanofibras de polímero electrohiladas son muy conocidas para el experto en la materia y condiciones optimizadas para su producción pueden encontrarse en, por ejemplo, O. Hardick, et al, J. Mater. Sci. 46 (2011) 3890. Los procesos de la presente invención normalmente comprenden una etapa inicial de electrohilado de un polímero para producir una o más nanofibras de polímero. Esto puede implicar electrohilar un polímero para producir una o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero

Las nanofibras de polímero para su uso en la presente invención tienen diámetros medios de 10 nm a 1000 nm. Para algunas aplicaciones, son apropiadas nanofibras de polímero que tienen diámetros medios de 200 nm a 800 nm. Las nanofibras de polímero que tienen diámetros medios de 200 nm a 400 nm pueden ser apropiadas para ciertas aplicaciones.

La longitud de las nanofibras de polímero para su uso en la presente invención no está particularmente limitada. Así, procesos de electrohilado convencionales pueden producir nanofibras de polímero de muchos cientos de metros o incluso kilómetros de longitud. Normalmente, sin embargo, la una o más nanofibras de polímero tienen una longitud de hasta 10 km, preferentemente de 10 m a 10 km.

La una o más nanofibras de polímero se proporcionan en forma de dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero. Una hoja no tejida que comprende una o más nanofibras de polímero es una estera de dicha una o más nanofibras de polímero con cada nanofibra orientada esencialmente al azar, es decir, no ha sido fabricada de tal manera que la nanofibra o nanofibras adopten un patrón particular. Hojas no tejidas que comprenden nanofibras de polímero normalmente se proporcionan por métodos conocidos, tales como el desvelado en O. Hardick, et al, J. Mater. Sci. 46 (2011) 3890. Hojas no tejidas pueden, en ciertas circunstancias, consistir en una única nanofibra de polímero. Alternativamente, las hojas no tejidas pueden comprender dos o más nanofibras de polímero, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nanofibras de polímero.

Las hojas no tejidas normalmente tienen densidades de área de 1 a 40 g/m², preferentemente de 5 a 25 g/m², en algunas circunstancias de 1 a 20 o 5 a 15 g/m².

Las hojas no tejidas normalmente tienen un espesor de 5 a 120 µm, preferentemente de 10 a 100 µm, en algunas circunstancias de 50 a 90 µm, en otras circunstancias de 5 a 40, 10 a 30 o 15 a 25 µm.

El polímero usado para producir las nanofibras usadas en los procesos de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que el polímero sea adecuado para su uso en aplicaciones de cromatografía. Así, normalmente, el polímero es un polímero adecuado para su uso como un medio de cromatografía, es decir, un adsorbente, en un método de cromatografía. Polímeros adecuados incluyen poliamidas tales como nailon, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilonitrilo, poliestireno, polisulfonas, policaprolactona, colágeno, quitosano, poli(óxido de etileno), agarosa, acetato de agarosa, celulosa, acetato de celulosa, y combinaciones de los mismos. Se prefieren celulosa y acetato de celulosa.

Normalmente, el proceso de la presente invención es para preparar un medio de cromatografía de celulosa funcionalizado, y el proceso comprende proporcionar dos o más nanofibras de acetato de celulosa. Preferentemente, el proceso comprende proporcionar dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa. El acetato de celulosa se electrohila fácilmente y puede transformarse fácilmente en celulosa después del electrohilado. Así, el proceso comprende preferentemente proporcionar dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa electrohiladas.

Modificación física de nanofibras

Los procesos de la presente invención implican modificación física de nanofibras de polímero en las hojas no tejidas, concretamente calentamiento y compresión, antes de la modificación química. Estas etapas mejoran la estabilidad estructural del material. Las condiciones de compresión y calentamiento también pueden variarse para alterar el espesor y/o la porosidad del material resultante.

El uso de múltiples hojas no tejidas de nanofibras de polímero permite preparar un material más grueso que tiene una mayor capacidad de adsorbencia (una vez funcionalizado). También se ha encontrado que las membranas producidas calentando y comprimiendo múltiples hojas no tejidas de nanofibras de polímero tienen propiedades mejoradas en comparación con pilas formadas a partir de hojas individuales de nanofibras de polímero tratadas con calor. Así, el proceso de la presente invención comprende proporcionar dos o más hojas no tejidas apiladas una

encima de la otra, comprendiendo cada dicha hoja una o más nanofibras de polímero, y simultáneamente calentar y comprimir la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes. Así, el proceso de la presente invención implica proporcionar una pila de dos o más hojas no tejidas, como se define en el presente documento, en la etapa (I) y la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía polimérico funcionalizado, proceso que comprende

- (I) proporcionar una pila de dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada dicha hoja una o más nanofibras de polímero,
- (II) simultáneamente calentar y comprimir la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, y
- (III) poner en contacto el producto comprimido y calentado con un reactivo que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía.

Normalmente, se proporciona una pila de dos a treinta hojas no tejidas. En ciertas circunstancias, puede proporcionarse una pila de entre cinco y veinticinco hojas no tejidas. En ciertas circunstancias, puede proporcionarse una pila de entre 10 y 20 hojas no tejidas. El número de hojas no tejidas empleado afectará el espesor del eventual medio de cromatografía, y su permeabilidad a los líquidos. Así, un medio más grueso generalmente tendrá una permeabilidad más baja que un medio más delgado. Así, donde se requiera una alta permeabilidad, normalmente se empleará un número más bajo de hojas. Donde se requiera un medio de permeabilidad más baja, puede emplearse un número más alto de hojas.

Para evitar dudas, las hojas no tejidas se comprimen (con calentamiento) en una dirección paralela a su dimensión más delgada. Las hojas no tejidas normalmente tendrán dos dimensiones que son mucho más grandes en la tercera dimensión, y las hojas se comprimen paralelas a esta tercera dimensión. Donde se proporcionan y comprimen dos o más hojas no tejidas, las dos o más hojas no tejidas se apilan una encima de la otra de manera que se solapen sustancialmente y se alinee la dimensión más pequeña de cada hoja no tejida. Esto forma una pila de hojas que es posteriormente calentada y comprimida. Las hojas en la pila se solapan entre sí y se alinea la dimensión más pequeña de cada hoja no tejida.

Normalmente, el comprimir las hojas no tejidas implica someterlas a una presión de 0,01 a 5 MPa, más normalmente de 0,05 a 3 MPa, por ejemplo de 0,1 a 1 MPa. Presiones adecuadas para su uso en el proceso de la presente invención normalmente son mayores que 1 kPa, preferentemente superiores a 5 kPa, en algunas circunstancias superiores a 10 kPa. Normalmente, se usan presiones de no superiores a 500 kPa, preferentemente no superiores a 200 kPa, más preferentemente no superiores a 150 kPa, por ejemplo no superiores a 100 kPa, 50 kPa o 30 kPa. Intervalos de presión adecuados pueden ser, por ejemplo, de 1 a 500 kPa, de 5 a 200 kPa, de 5 a 150 kPa, de 5 a 100 kPa de 5 a 50 kPa, o de 10 a 30 kPa. La presión puede aplicarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, puede aplicarse presión usando una prensa manual o prensa hidráulica. La presión aplicada puede variarse para alterar las propiedades físicas de los medios. Generalmente, una presión más alta producirá un medio más robusto, que tiene una porosidad más baja y espesor más bajo. Una presión más baja tiende a dar un medio comparativamente menos robusto, con una porosidad más alta y espesor más alto. Pueden preferirse medios de cromatografía más gruesos cuando se desean maximizar las propiedades de unión.

La longitud de tiempo durante la que las hojas no tejidas se comprimen no está particularmente limitada, y tiempos de compresión típicos pueden ser determinados por un experto en la materia. El calentamiento y la compresión simultáneos de las dos o más hojas no tejidas normalmente se lleva a cabo durante de 1 a 30 minutos, preferentemente de 1 a 10 minutos, más preferentemente de 3 a 7 minutos, incluso más preferentemente durante aproximadamente 5 minutos.

El calentamiento de las dos o más hojas no tejidas puede efectuarse mediante medios convencionales, por ejemplo usando un horno. El calentamiento y la compresión simultáneos de las dos o más hojas no tejidas pueden efectuarse por una prensa calentada o colocando las dos o más hojas no tejidas entre pesos, por ejemplo hojas metálicas, en un horno calentado.

La pila de hojas no tejidas se calienta y comprime para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes.

Donde dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras, se apilan una encima de la otra y se someten a condiciones de calor y presión, las secciones de una nanofibra de polímero en una hoja pueden estar en contacto con secciones de la misma nanofibra, y/o con secciones de otras nanofibras en la misma hoja no tejida, y/o con secciones de nanofibras en hojas adyacentes no tejidas. Secciones de nanofibras en hojas no tejidas no están normalmente en contacto con secciones de nanofibras en otras hojas no tejidas que no son adyacentes.

Así, el calentar y comprimir una pila de dos o más hojas no tejidas puede fusionar puntos de contacto entre secciones de una nanofibra en una hoja con otras secciones de la misma nanofibra, y/o entre secciones de una nanofibra en una hoja con secciones de otra nanofibra (si está presente) en la misma hoja no tejida, y/o entre secciones de una nanofibra en una hoja con secciones de una nanofibra en una hoja no tejida adyacente.

Normalmente, calentar y comprimir simultáneamente dos o más hojas no tejidas fusiona puntos de contacto entre secciones de una nanofibra de polímero en una hoja con secciones de una nanofibra de polímero en una hoja adyacente. Preferentemente, calentar y comprimir simultáneamente dos o más hojas no tejidas fusiona puntos de contacto entre secciones de una nanofibra de polímero en una hoja con otras secciones de la misma nanofibra, y fusiona puntos de contacto entre secciones de la nanofibra de polímero en la hoja con secciones de una nanofibra de polímero en una hoja adyacente. Más preferentemente, calentar y comprimir dos o más hojas no tejidas fusiona puntos de contacto entre secciones de una nanofibra en una hoja con otras secciones de la misma nanofibra, y entre secciones de una nanofibra en una hoja con secciones de otra nanofibra (si está presente) en la misma hoja no tejida, y/o entre secciones de una nanofibra con secciones de una nanofibra en una hoja no tejida adyacente. Lo más preferentemente, calentar y comprimir dos o más hojas no tejidas fusiona puntos de contacto entre secciones de una nanofibra en una hoja con otras secciones de la misma nanofibra, y entre secciones de la nanofibra en la hoja con secciones de otra nanofibra (si está presente) en la misma hoja no tejida, y entre secciones de la nanofibra en la hoja con secciones de una nanofibra en una hoja no tejida adyacente.

En un ejemplo simple donde se proporcionan dos hojas no tejidas, cada hoja no tejida que contiene una única nanofibra de polímero, calentar y comprimir la primera y segunda hojas no tejidas fusiona preferentemente puntos de contacto entre secciones de la nanofibra de polímero en la primera hoja no tejida con otras secciones de la nanofibra de polímero en la primera hoja no tejida, y entre secciones de la nanofibra de polímero en la primera hoja no tejida con secciones de la nanofibra de polímero en la segunda hoja no tejida, y normalmente también entre secciones de la nanofibra de polímero en la segunda hoja no tejida con otras secciones de la nanofibra de polímero en la segunda hoja no tejida.

Normalmente, las hojas no tejidas se calientan a una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero. El uso de una temperatura más alta podría producir la destrucción de la estructura de la nanofibra. En algunas circunstancias es ventajoso usar una temperatura que está por debajo de la temperatura de transición vítrea del polímero. En otras circunstancias puede usarse una temperatura por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero. Los puntos de fusión y las temperaturas de transición vítrea de polímeros adecuados para su uso en los procesos reivindicados son muy conocidos para el experto.

Normalmente, se calientan hojas no tejidas a una temperatura entre una temperatura a la que los puntos de contacto entre secciones de la una o más nanofibras de polímero empiezan a fundir y el punto de fusión del polímero. Preferentemente, las hojas no tejidas se calientan a una temperatura entre una temperatura a la que los puntos de contacto entre secciones de la una o más nanofibras de polímero empiezan a fundir y la temperatura de transición vítrea del polímero.

Normalmente, se usa una temperatura superior a 40 °C, preferentemente 30 °C, más preferentemente 20 °C, por debajo del punto de fusión del polímero. Normalmente, se usa una temperatura no superior a 1 °C, preferentemente 2 °C, más preferentemente 5 °C, por debajo del punto de fusión del polímero. Así, normalmente se usa un intervalo de temperatura de 40 °C por debajo del punto de fusión del polímero a 1 °C por debajo del punto de fusión del polímero, preferentemente de 30 °C por debajo del punto de fusión del polímero a 2 °C por debajo del punto de fusión del polímero, más preferentemente de 20 °C por debajo del punto de fusión del polímero a 5 °C por debajo del punto de fusión del polímero.

En el caso en el que el polímero sea acetato de celulosa, las hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa, se calientan a o a una temperatura entre 190 y 220 °C, preferentemente de 195 a 218 °C, por ejemplo de 195 a 215 °C, 195 a 210 °C, 190 a 210 °C, 195 a 205 °C o 210 a 215 °C. Otros intervalos de temperatura adecuados que pueden usarse incluyen 200 a 220 °C, preferentemente de 205 a 218 °C, por ejemplo de 205 a 210 °C o 210 a 215 °C. El calentamiento y compresión simultáneos de hojas de acetato de celulosa no tejidas normalmente emplea una temperatura de entre 190 y 220 °C, por ejemplo de 190 a 210 °C, 195 a 218 °C, 195 a 215 °C, 195 a 210 °C, 195 a 205 °C, 210 a 215 °C, 200 a 220 °C, 205 a 218 °C, o 205 a 210 °C, en algunas circunstancias aproximadamente 207 °C.

Las hojas no tejidas normalmente se calientan durante de 1 a 120 minutos, por ejemplo de 5 a 60 minutos. Las hojas no tejidas se calientan y comprimen simultáneamente, y el calentamiento se lleva a cabo normalmente durante de 1 a 30 minutos, preferentemente de 1 a 10 minutos, más preferentemente de 3 a 7 minutos, incluso más preferentemente durante aproximadamente 5 minutos.

Normalmente, las hojas no tejidas tienen un tamaño de poro promedio después de la compresión y calentamiento, es decir, el producto comprimido y calentado resultante, de 0,1 a 1,0 μm , preferentemente de 0,3 a 0,9 μm , más preferentemente de 0,4 a 0,8 μm , incluso más preferentemente de 0,5 a 0,7 μm , todavía más preferentemente de 0,6 a 0,7 μm , por ejemplo de 0,6 a 0,65 μm .

Normalmente, las hojas no tejidas tienen una densidad promedio después de la compresión y calentamiento, es decir, el producto comprimido y calentado resultante, de 200 a 1000 kg/m^3 , preferentemente 250 a 750 kg/m^3 , más preferentemente de 350 a 650 kg/m^3 , en algunas circunstancias de 450 a 550 kg/m^3 . Otras densidades preferibles incluyen de 200 a 750 kg/m^3 , 200 a 650 kg/m^3 , 200 a 550 kg/m^3 , 250 a 750 kg/m^3 , 250 a 650 kg/m^3 y 250 a 550 kg/m^3 .

kg/m³.

Las hojas no tejidas se calientan y comprimen simultáneamente. El calentamiento y la compresión simultáneos normalmente se llevan a cabo en una prensa calentada o colocando las nanofibras de polímero u hojas no tejidas entre pesos, por ejemplo hojas metálicas, en un horno calentado.

El proceso de la presente invención puede también implicar humedecer las hojas no tejidas antes de la compresión y el calentamiento. Así, el proceso puede implicar una etapa adicional entre las etapas (I) y (II) de humedecer la pila de hojas. Alternativamente, el proceso puede implicar formar una pila de hojas no tejidas humedecidas en la etapa (I). Normalmente se usa un disolvente orgánico acuoso opcional para humedecer las hojas no tejidas/pila de hojas, preferentemente un disolvente orgánico acuoso. Los disolventes orgánicos normalmente se eligen para disolver las nanofibras de polímero. Un experto sabrá que disolventes pueden usarse para disolver las nanofibras de polímero. Se prefieren los alcoholes como disolvente orgánico, por ejemplo metanol, etanol o isopropanol, preferentemente etanol. Se prefiere etanol acuoso en algunos casos. Así, algunas realizaciones pueden implicar humedecer, tras calentar y comprimir simultáneamente. Normalmente, las hojas comprimidas y calentadas, es decir, el producto comprimido y calentado, tienen un espesor de 0,05 a 10 mm, por ejemplo 0,1 a 5 mm.

Modificación química de nanofibras

Los procesos de la presente invención normalmente implican modificación química de las dos o más hojas no tejidas para funcionalizarlas para su uso en cromatografía. En su forma más simple esto implica poner en contacto las dos o más hojas no tejidas (que han sido simultáneamente comprimidas y calentadas) con un reactivo para funcionalizar el producto como medio de cromatografía.

Opcionalmente, antes de esta etapa de poner en contacto con un reactivo, las dos o más hojas no tejidas (que han sido simultáneamente comprimidas y calentadas) pueden tratarse para desproteger o activar cualquier grupo funcional sobre el polímero.

La desprotección de los grupos funcionales normalmente se efectúa de manera que los grupos funcionales puedan reaccionar con el reactivo. Por ejemplo, cuando el polímero es celulosa, normalmente se proporcionan dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa, y, antes de poner en contacto con un reactivo, el acetato de celulosa se trata para convertirlo en celulosa. Esto implica la desprotección de grupos hidroxilo acetilados para dar grupos hidroxilo. La conversión de acetato de celulosa a celulosa normalmente se efectúa usando álcali acuoso, preferentemente NaOH en agua:etanol, más preferentemente agua:etanol 2:1, durante un periodo superior a 12 h, por ejemplo de 12 a 36 horas. Esta etapa normalmente tiene lugar después de que las dos o más hojas no tejidas, que comprenden cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa, hayan sido comprimidas y calentadas. Alternativamente, esta etapa puede llevarse a cabo antes de que las dos o más u hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa, hayan sido comprimidas y calentadas. La activación de grupos funcionales se trata más adelante.

El reactivo normalmente funcionaliza el medio de cromatografía introduciendo uno o más restos que convierten el producto funcionalizado que comprende el uno o más restos adecuados para su uso como un medio de cromatografía. El uno o más restos introducidos dependerán de la técnica de cromatografía particular para la que el medio va a usarse. Restos y reactivos adecuados se tratan además más adelante. Normalmente, el reactivo reacciona con uno o más grupos funcionales presentes sobre la una o más nanofibras de polímero contenidas dentro de las dos o más hojas no tejidas, para crear el uno o más restos. Grupos funcionales típicos incluyen grupos hidroxilo, amino y carboxi. Así, normalmente uno o más grupos hidroxilo, amino y/o carboxi están funcionalizados en el proceso de la presente invención.

Aunque la presente invención prevé procesos que implican solo un único tratamiento con un reactivo, se prefieren procesos que implican múltiples etapas de funcionalización. Tales procesos pueden conducir a productos con propiedades de unión mejoradas.

Así, normalmente, la funcionalización poniendo en contacto con un reactivo se efectúa poniendo en contacto en un modo discontinuo dos o más veces con un reactivo. Funcionalización discontinua significa que el material de nanofibra de polímero (que ha sido comprimido, calentado y opcionalmente desprotegido y/o activado) se hace reaccionar con un reactivo para funcionalizarlo, reacción que entonces se detiene y el material (parcialmente) funcionalizado resultante reacciona con un lote separado de reactivo. La reacción en un modo discontinuo no se refiere simplemente a añadir, por ejemplo, más porciones de reactivo a un recipiente de reacción.

La funcionalización discontinua normalmente se lleva a cabo de dos a diez veces, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. Preferentemente, la funcionalización discontinua se lleva a cabo entre dos y cuatro veces.

Cada etapa de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo normalmente comprende (a) poner en contacto con el reactivo, (b) aislar el producto de la etapa (a) del reactivo, (c) opcionalmente tratar el producto de la etapa (b) con álcali acuoso, y (d) opcionalmente lavar el producto de la etapa (b)/(c) con agua. Preferentemente,

cada etapa de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo comprende (a) poner en contacto con el reactivo, (b) aislar el producto de la etapa (a) del reactivo, (c) tratar el producto de la etapa (b) con álcali acuoso, y (d) opcionalmente lavar el producto de la etapa (b)/(c) con agua. Más preferentemente, cada etapa de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo comprende (a) poner en contacto con el reactivo, (b) aislar el producto de la etapa (a) del reactivo, (c) tratar el producto de la etapa (b) con álcali acuoso, y (d) lavar el producto de la etapa (b)/(c) con agua.

Las etapas para tratar con álcali acuoso normalmente emplean álcali acuoso caliente, es decir, entre 70 y 90 °C. Alternativamente, la etapa para tratar con álcali acuoso puede llevarse a cabo a temperatura ambiente.

El reactivo usado en cada etapa de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo puede ser igual o diferente, pero es preferentemente el mismo.

En circunstancias donde se emplean entre dos y cuatro etapas de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo, las dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero, que han sido comprimidas, calentadas y opcionalmente desprotegidas, normalmente se tratan

- (1) (a1) poniendo en contacto con el reactivo, (b1) aislando el producto de la etapa (a1) del reactivo, (c1) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b1) con álcali acuoso, y (d1) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b1)/(c1) con agua, y

- (2) (a2) poniendo en contacto el producto de la etapa (b1)/(c1)/(d1) con el reactivo, (b2) aislando el producto de la etapa (a2) del reactivo, (c2) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b2) con álcali acuoso, y (d2) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b2)/(c2) con agua; o

- (1) (a1) poniendo en contacto con el reactivo, (b1) aislando el producto de la etapa (a1) del reactivo, (c1) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b1) con álcali acuoso, y (d1) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b1)/(c1) con agua,

- (2) (a2) poniendo en contacto el producto de la etapa (b1)/(c1)/(d1) con el reactivo, (b2) aislando el producto de la etapa (a2) del reactivo, (c2) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b2) con álcali acuoso, y (d2) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b2)/(c2) con agua, y

- (3) (a3) poniendo en contacto el producto de la etapa (b2)/(c2)/(d2) con el reactivo, (b3) aislando el producto de la etapa (a3) del reactivo, (c3) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b3) con álcali acuoso, y (d3) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b3)/(c3) con agua; o

- (1) (a1) poniendo en contacto con el reactivo, (b1) aislando el producto de la etapa (a1) del reactivo, (c1) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b1) con álcali acuoso, y (d1) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b1)/(c1) con agua,

- (2) (a2) poniendo en contacto el producto de la etapa (b1)/(c1)/(d1) con el reactivo, (b2) aislando el producto de la etapa (a2) del reactivo, (c2) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b2) con álcali acuoso, y (d2) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b2)/(c2) con agua,

- (3) (a3) poniendo en contacto el producto de la etapa (b2)/(c2)/(d2) con el reactivo, (b3) aislando el producto de la etapa (a3) del reactivo, (c3) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b3) con álcali acuoso, y (d3) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b3)/(c3) con agua, y

- (4) (a4) poniendo en contacto el producto de la etapa (b3)/(c3)/(d3) con el reactivo, (b4) aislando el producto de la etapa (a4) del reactivo, (c4) opcionalmente tratando el producto de la etapa (b4) con álcali acuoso, y (d4) opcionalmente lavando el producto de la etapa (b4)/(c4) con agua.

Normalmente, cada etapa de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo comprende tratar con el reactivo durante entre 1 y 20 minutos.

En ciertas circunstancias, poner en contacto con un reactivo puede comprender colocar dos o más hojas no tejidas, comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero, que han sido comprimidas, calentadas, y opcionalmente desprotegidas y/o activadas (es decir, el material de polímero) en un recipiente, y provocar que un reactivo circule a través del recipiente de manera que el reactivo circule en contacto con el material de polímero que funcionaliza el material de polímero como medio de cromatografía. El funcionalizar el material de polímero de este modo puede en ciertas circunstancias ser más eficiente que simplemente poner en contacto el material de polímero con el reactivo, en, por ejemplo, un matraz o vaso de precipitados.

Normalmente, el recipiente es un portafiltros adaptado para contener el material de polímero. Normalmente, el portafiltros contiene el material de polímero de forma que una sustancia acuosa o líquida que se pasa a través del portafiltros circule en contacto con el material de polímero. Así, en el contexto de la presente invención, el portafiltros contiene preferentemente el material de polímero de forma que se provoque que un reactivo que circula a través del portafiltros circule en contacto con el material de polímero.

Normalmente, se provoca que el reactivo circule a través del recipiente a presión.

Normalmente, se provoca que el reactivo circule a través del recipiente usando una bomba, preferentemente una bomba de HPLC.

5 Normalmente, se provoca que el reactivo circule a través del recipiente en una manera cíclica. Así, cualquier reactivo que sale del recipiente se recircula y pasa a través del recipiente una o más veces adicionales.

Normalmente, se provoca que el reactivo circule a través del recipiente durante un periodo de tiempo de 1 a 20 minutos.

10 Normalmente, se provoca que el reactivo circule a través del recipiente a una tasa de 10 a 100 ml/min.

Normalmente, después de que se ha provocado que el reactivo circule a través del recipiente, el producto resultante se trata con álcali acuoso, y opcionalmente se lava con agua. Preferentemente, después de haberse provocado que el reactivo circulara a través del recipiente, el producto resultante se trata con álcali acuoso, y se lava con agua. El

15 tratamiento con álcali acuoso es preferentemente tratamiento con álcali acuoso caliente, como se ha definido anteriormente. Normalmente, después de haberse provocado que el reactivo circulara a través del recipiente, el producto resultante se saca el recipiente antes de cualquier etapa de tratamiento adicional. Así, preferentemente, después de que se ha provocado que el reactivo circulara a través del recipiente, el producto resultante se saca del recipiente, se trata con álcali acuoso, y opcionalmente se lava con agua. Más preferentemente, después de que se

20 ha provocado que el reactivo circulara a través del recipiente, el producto resultante se saca del recipiente, se trata con álcali acuoso y se lava con agua.

El reactivo funcionaliza el producto de las etapas de procesamiento físico y químicos precedentes para dar un medio de cromatografía, específicamente un medio de cromatografía funcionalizado. Normalmente, el reactivo funcionaliza

25 el producto de las etapas precedentes de manera que sea adecuado para su uso en un método de cromatografía de intercambio iónico, de captura por afinidad o hidrófoba. Así, poniendo en contacto con el reactivo normalmente da un medio de cromatografía que está funcionalizado con uno o más restos que están negativamente cargados, uno o más restos que están positivamente cargados, una o más proteínas, ligandos miméticos o sintéticos que imitan la acción de los ligandos de proteína, péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, colorantes, histidina, grupos

30 que contienen un catión metálico, o grupos hidrófobo. Ejemplos de tales grupos se definen adicionalmente más adelante. Reactivos adecuados para introducir tales grupos serán evidentes para el experto. Se prefieren clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietilamina (DEACH) y glicidiltrimetilamonio como reactivo, particularmente cuando el medio de cromatografía funcionalizado sea para uso en un método de cromatografía de intercambio aniónico. Otros reactivos preferidos son TEMPO, seguido de perclorato de sodio, o alil glicidil éter, seguido de disulfito de sodio,

35 particularmente cuando el medio de cromatografía funcionalizado es para uso en un método de cromatografía de intercambio catiónico. Otro reactivo preferido es NaIO_4 , seguido de Proteína A, particularmente cuando el medio de cromatografía funcionalizado es para uso en un método de cromatografía de afinidad. Otro reactivo preferido es óxido de estireno, particularmente cuando el medio de cromatografía funcionalizado es para uso en un método de cromatografía hidrófoba.

40

Medios y métodos de cromatografía

Los productos del proceso de la presente invención son medios de cromatografía funcionalizados, es decir, medios de cromatografía que han sido modificados químicamente para convertirlos en adecuados para su uso en uno o más

45 métodos de cromatografía. Modificaciones químicas específicas se tratan más abajo en más detalle. En términos generales, tal modificación química cambia las propiedades químicas y/o físicas del medio de cromatografía. Esto afecta a su vez cómo el medio de cromatografía se comporta cuando se usa en un método de cromatografía. Las modificaciones pueden, por ejemplo, cambiar la polaridad, hidrofobia o propiedades de unión biológica del medio de cromatografía funcionalizado en comparación con su forma sin funcionalizar. Las modificaciones pueden, en ciertas

50 circunstancias, cambiar más de una de la polaridad, hidrofobia o propiedades de unión biológica del medio de cromatografía funcionalizado en comparación con su forma sin funcionalizar. En una realización, la modificación cambia la polaridad e hidrofobia del medio de cromatografía funcionalizado en comparación con su forma sin funcionalizar.

55 Los medios de cromatografía normalmente están en forma de membranas. Tales membranas son adecuadas para su uso en métodos de cromatografía de membrana. Los métodos de cromatografía de membrana son muy conocidos para el experto en la materia y se tratan en "Membrane Processes in Biotechnologies and Pharmaceuticals" ed. Catherine Charcosset, Elsevier, 2012.

60 Normalmente, los medios de cromatografía de polímero funcionalizados son adecuados para su uso en métodos de cromatografía elegidos de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de captura por afinidad, cromatografía hidrófoba y cromatografía de modo mixto. En ciertas circunstancias, el método de cromatografía opera en "modo mixto", es decir, utilizando más de una forma de interacción, es decir, intercambio iónico, captura por afinidad e interacción hidrófoba. Normalmente, tal cromatografía de "modo mixto" implica intercambio de iones (iónico) e interacciones hidrófobas. Preferentemente, los medios de cromatografía de polímero funcionalizados son adecuados

65 para su uso en métodos de cromatografía elegidos de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de captura

por afinidad y cromatografía hidrófoba. En operación, tales métodos de cromatografía implican pasar una fase móvil que contiene molécula deseada sobre una fase de adsorbente, aquí los medios de cromatografía funcionalizados. La fase de adsorbente se elige normalmente de forma que la molécula deseada sea retenida encima en preferencia a otros componentes también presentes en la fase móvil.

Normalmente, el medio de cromatografía de polímero está funcionalizado con DEAE, Q, SP, CM, Proteína A, fenilo, o grupos MEP, por ejemplo grupos DEAE o CM. Generalmente, el polímero es celulosa y el medio de cromatografía está funcionalizado con DEAE, Q, SP, CM, Proteína A, fenilo, o grupos MEP, por ejemplo grupos DEAE o CM. Así, el medio de cromatografía funcionalizado puede ser celulosa derivatizada con DEAE, Q, SP, CM, Proteína A, fenilo, o grupos MEP, por ejemplo grupos DEAE o CM.

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica para separar moléculas, normalmente iones o moléculas polares, basándose en su carga iónica. Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en tales métodos, por tanto, contienen uno o más restos que están positiva o negativamente cargados. Las cargas positivas y/o negativas en los medios de cromatografía funcionalizados están normalmente equilibradas con uno o más contraiones. La cromatografía de intercambio iónico implica una o más de cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en la cromatografía de intercambio catiónico contienen uno o más restos que están negativamente cargados. Restos negativamente cargados típicos incluyen uno o más grupos carboxilato, sulfonato o fosfonato, o mezclas de los mismos, es decir, los restos normalmente contienen uno o más grupos $-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{P}(\text{OH})_2\text{O}^-$, o mezclas de los mismos. Medios de cromatografía funcionalizados típicos para su uso en cromatografía de intercambio catiónico contienen uno o más restos $-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$, $-\text{CH}_2\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ o $-\text{P}(\text{OH})_2\text{O}^-$.

Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en cromatografía de intercambio aniónico contienen uno o más restos que están positivamente cargados. Restos positivamente cargados típicos incluyen uno o más grupos amina cuaternaria. Medios de cromatografía funcionalizados típicos para su uso en cromatografía de intercambio aniónico contienen uno o más restos $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2(\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3)$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{H}$.

La cromatografía de captura por afinidad es una técnica para separar moléculas basándose en su afinidad por ligandos particulares, normalmente pero no siempre ligandos biológicos. Este método puede, por ejemplo, basarse en las fuerzas atractivas entre anticuerpos y antígenos o enzimas y sustratos. Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en cromatografía de captura por afinidad normalmente contienen uno o más restos elegidos de una o más proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, colorantes, histidina, o grupos que contienen un catión metálico. Alternativamente, los medios de cromatografía funcionalizados para su uso en la cromatografía de captura por afinidad pueden contener ligandos miméticos o sintéticos que imitan la acción de ligandos de proteína.

Proteínas típicas para su uso en la cromatografía de captura por afinidad son muy conocidas para el experto en la materia e incluyen Proteína A, Proteína G y Proteína L.

Anticuerpos típicos y fragmentos de los mismos para su uso en cromatografía de captura por afinidad son muy conocidos para el experto en la materia e incluyen IgG.

Colorantes típicos para su uso en cromatografía de captura por afinidad son muy conocidos para el experto en la materia e incluyen Yellow HE-4R, Red HE-3B y Cibacron Blue F3G.

Grupos típicos que contienen cationes metálicos para su uso en cromatografía de captura por afinidad son muy conocidos para el experto en la materia. Tales grupos normalmente contienen un agente quelante para inmovilizar cationes metálicos. El catión metálico normalmente se elige de cationes cobre, níquel, cinc y cobalto, preferentemente Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} .

La cromatografía de interacción hidrófoba es una técnica para separar moléculas basándose en su hidrofobia. Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en tales métodos, por tanto, contienen uno o más restos que contienen uno o más grupos hidrófobos. Grupos hidrófobos típicos incluyen grupos propilo, butilo, fenilo y octilo.

La cromatografía de modo mixto (o multimodal) es una técnica para separar moléculas basándose en dos o más características, normalmente hidrofobia y carga iónica. Esto puede implicar una combinación de hidrofobia y propiedades aniónicas, o una combinación de hidrofobia y propiedades catiónicas. Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en tales métodos, por tanto, normalmente contienen uno o más restos que están positivamente o negativamente cargados, normalmente como se ha definido anteriormente, y que contienen uno o más grupos hidrófobos, normalmente como se ha definido anteriormente. Las cargas positivas y/o negativas en los medios de cromatografía funcionalizados están normalmente equilibradas con uno o más contraiones. Medios de cromatografía funcionalizados para su uso en tales métodos también pueden contener uno o más grupos hidrófobos

que son ionizables, para su uso en la llamada cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC). Así, en una realización, la cromatografía de modo mixto es cromatografía de inducción de carga hidrófoba. Grupos adecuados para su uso en tales métodos son grupos 4-mercapto-etil-piridina (MEP) y grupos octilamina.

5 Los medios de cromatografía funcionalizados para su uso en métodos de cromatografía de modo mixto que implican una combinación de interacciones hidrófobas y aniónicas contienen uno o más restos que están positivamente cargados, normalmente como se ha definido anteriormente, y uno o más grupos hidrófobos, normalmente como se ha definido anteriormente. Grupos adecuados para su uso en tales métodos son grupos N-bencilmetiletanolamina y grupos N-benzoil-homocisteína. Los medios de cromatografía funcionalizados para su uso en métodos de cromatografía de modo mixto que implican una combinación de interacciones hidrófobas y catiónicas contienen uno o más restos que están negativamente cargados, normalmente como se ha definido anteriormente, y uno o más grupos hidrófobos, normalmente como se ha definido anteriormente. Grupos adecuados para su uso en tales métodos son grupos N-benzoil-homocisteína.

15 Los procesos reivindicados en la presente invención para preparar medios de cromatografía funcionalizados normalmente implican introducir uno o más restos en un medio de cromatografía de forma que el producto funcionalizado resultante que comprende el uno o más restos sea adecuado para su uso como un medio de cromatografía en un método de cromatografía. Restos típicos, medios, reactivos y métodos son como se han definido anteriormente. El uno o más restos se introducen haciendo reaccionar un reactivo con uno o más grupos funcionales contenidos en las dos o más hojas no tejidas, que comprende cada una una o más nanofibras de polímero, que han sido comprimidas, calentadas y opcionalmente desprotegidas y/o activadas. Grupos funcionales típicos incluyen grupos hidroxilo, amino y carboxilo.

25 El uno o más grupos funcionales pueden activarse antes de la reacción con un reactivo. Pueden emplearse métodos de activación convencionales conocidos en la técnica. Así, en el caso en el que el grupo funcional sea un grupo hidroxilo, un grupo tal puede activarse tratando con carbonildiimidazol (CDI), bisoxiranos, ácido cianúrico, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o tolueno-4-sulfonato de 2-fluoro-1-metilpiridinio (FMP). En el caso en el que el grupo funcional sea un grupo amino, un grupo tal puede activarse tratando con epíclorhidrina, glutaraldehído como epóxido. En el caso en el que el grupo funcional sea un grupo carboxilo, un grupo tal puede activarse tratando con CDI o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

30 Un experto puede elegir reactivos adecuados para introducir restos particulares en polímeros particulares, por ejemplo basándose en los grupos funcionales contenidos en aquellos polímeros. Reactivos típicos incluyen clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietilamina (DEACH).

35 Normalmente,

- el método de cromatografía es un método de intercambio catiónico, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo carboxilato, sulfonato o fosfonato;
- 40 - el método de cromatografía es un método de intercambio aniónico, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo amino cuaternario o dietilamina;
- el método de cromatografía es un método de cromatografía de captura por afinidad, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con una proteína, péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, colorante, histidina, o grupo que contiene un catión metálico;
- 45 - el método de cromatografía es un método de cromatografía de interacción hidrófoba, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo propilo, butilo, fenilo u octilo; o
- el método de cromatografía es un método de cromatografía de modo mixto, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo MEP, octilamina, N-bencilmetiletanolamina o N-benzoil-homocisteína.

50 Preferentemente,

- el método de cromatografía es un método de intercambio catiónico, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo carboxilato, sulfonato o fosfonato;
- el método de cromatografía es un método de intercambio aniónico, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo amino cuaternario o dietilamina;
- 55 - el método de cromatografía es método de cromatografía de captura por afinidad, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con una proteína, péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, colorante, histidina, o grupo que contiene un catión metálico; o
- el método de cromatografía es un método de cromatografía de interacción hidrófoba, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo propilo, butilo, fenilo u octilo; o
- 60

Realizaciones particulares del proceso de la invención

65 La presente invención normalmente proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía polimérico funcionalizado, proceso que comprende (I) proporcionar dos o más hojas no tejidas como se define en el presente documento, apiladas una encima de la otra y comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero como se

define en el presente documento, (II) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes como se define en el presente documento, y (III) poner en contacto el producto comprimido y calentado con un reactivo como se define en el presente documento que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía como se define en el presente documento.

En una realización preferida de la invención, la etapa de funcionalizar con un reactivo se lleva a cabo en un modo discontinuo. Esto aumenta la capacidad de unión del medio de cromatografía polimérico funcionalizado resultante. Así, en esta realización preferida, la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía polimérico funcionalizado, proceso que comprende (I) proporcionar dos o más hojas no tejidas como se define en el presente documento, apiladas una encima de la otra y comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero como se define en el presente documento, (II) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes como se define en el presente documento, y (III) poner en contacto el producto de la etapa (II) en un modo discontinuo al menos dos veces con un reactivo como se define en el presente documento que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía como se define en el presente documento.

En otra realización preferida de la invención, la etapa de funcionalizar con un reactivo se lleva a cabo por flujo convectivo. Un proceso tal normalmente es más eficiente que un proceso difusivo convencional. Así, en esta realización preferida adicional, la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía polimérico funcionalizado, proceso que comprende (I) proporcionar dos o más hojas no tejidas como se define en el presente documento, apiladas una encima de la otra y comprendiendo cada una una o más nanofibras de polímero como se define en el presente documento, (II) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes como se define en el presente documento, y (III) poner el producto de la etapa (II) en un recipiente como se define en el presente documento, y (IV) provocar que un reactivo como se define en el presente documento circule a través del recipiente de manera que el reactivo circule en contacto con el producto de la etapa (II) que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía como se define en el presente documento.

Se prefiere que el medio de cromatografía de polímero funcionalizado sea un medio de cromatografía de celulosa funcionalizado.

En una realización más preferida de la invención, la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía de celulosa funcionalizado, proceso que comprende (i) proporcionar dos o más hojas no tejidas como se define en el presente documento, apiladas una encima de la otra y comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa como se define en el presente documento, (ii) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de acetato de celulosa de hojas adyacentes como se define en el presente documento, (iii) tratar el producto comprimido y calentado para convertir el acetato de celulosa en celulosa como se define en el presente documento, y (iv) poner en contacto el producto así obtenido con un reactivo como se define en el presente documento que funcionaliza el producto de la etapa (iii) como medio de cromatografía como se define en el presente documento.

En una realización más preferida de la invención, la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía de celulosa funcionalizado, proceso que comprende (i) proporcionar dos o más hojas no tejidas como se define en el presente documento, apiladas una encima de la otra y comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa como se define en el presente documento, (ii) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de acetato de celulosa de capas adyacentes como se define en el presente documento, (iii) tratar el producto comprimido y calentado para convertir el acetato de celulosa en celulosa como se define en el presente documento, y (iv) poner en contacto el producto así obtenido en un modo discontinuo entre dos y cuatro veces con un reactivo como se define en el presente documento que funcionaliza el producto de la etapa (iii) como medio de cromatografía como se define en el presente documento.

En otra realización más preferida de la invención, la presente invención proporciona un proceso para preparar un medio de cromatografía de celulosa funcionalizado, proceso que comprende (i) proporcionar dos o más hojas no tejidas como se define en el presente documento, apiladas una encima de la otra y comprendiendo cada una una o más nanofibras de acetato de celulosa como se define en el presente documento, (ii) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de acetato de celulosa de hojas adyacentes como se define en el presente documento, (iii) tratar el producto comprimido y calentado para convertir el acetato de celulosa en celulosa como se define en el presente documento, (iv) poner el producto así obtenido en un recipiente como se define en el presente documento, y (v) provocar que un reactivo como se define en el presente documento circule a través del recipiente de manera que el reactivo circule en contacto con el producto obtenido en la etapa (iii) que funcionaliza el producto de la etapa (iii) como medio de cromatografía como se define en el presente documento.

Se prefiere que entre dos y treinta, más preferentemente entre cinco y veinticinco de dichas hojas, se apilen una encima de la otra en la etapa (I), comprendiendo cada hoja 1, 2 o 3 nanofibras de polímero y teniendo cada hoja un

espesor de 5 a 40 μm

5 También se prefiere en la etapa (II) que la pila de hojas se caliente simultáneamente a una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero y se comprima bajo una presión de 0,01 a 5 MPa durante 1 a 120 minutos para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, teniendo el producto comprimido y calentado resultante una densidad promedio de 250 a 750 kg/m^3 y un espesor de 0,05 a 10 mm.

Es más preferido que:

- 10 - entre dos y treinta, más preferentemente entre cinco y veinticinco de dichas hojas, se apilen una encima de la otra en la etapa (I), comprendiendo cada hoja 1, 2 o 3 nanofibras de polímero y teniendo cada hoja un espesor de 5 a 40 μm ; y
- 15 - en la etapa (II) que la pila de hojas se caliente simultáneamente a una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero y se comprima bajo una presión de 0,01 a 5 MPa durante 1 a 120 minutos para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, teniendo el producto comprimido y calentado resultante una densidad promedio de 250 a 750 kg/m^3 y un espesor de 0,05 a 10 mm.

20 Se prefiere que entre dos y treinta, más preferentemente entre cinco y veinticinco de dichas hojas, se apilen una encima de la otra en la etapa (I), consistiendo cada hoja en una nanofibra de polímero única, y teniendo cada hoja un espesor de 5 a 120 μm y una densidad del área de 1 a 40 g/m^2 .

25 También se prefiere en la etapa (II) que la pila de hojas se caliente simultáneamente a una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero y se comprima bajo una presión de 1 a 500 kPa durante 1 a 30 minutos para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, teniendo el producto comprimido y calentado resultante una densidad promedio de 200 a 1000 kg/m^3 y un espesor de 0,05 a 10 mm.

Es más preferido que:

- 30 - entre dos y treinta, más preferentemente entre cinco y veinticinco de dichas hojas, se apilen una encima de la otra en la etapa (I), consistiendo cada hoja en una nanofibra de polímero única, y teniendo cada hoja un espesor de 5 a 120 μm y una densidad del área de 1 a 40 g/m^2 ; y
- 35 - en la etapa (II) que la pila de hojas se caliente simultáneamente a una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero y se comprima bajo una presión de 1 a 500 kPa durante 1 a 30 minutos para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, teniendo el producto comprimido y calentado resultante una densidad promedio de 200 a 1000 kg/m^3 y un espesor de 0,05 a 10 mm

Medio de cromatografía funcionalizado de la invención

40 La presente invención también proporciona un medio de cromatografía funcionalizado que es obtenible por el proceso de la presente invención.

También se proporciona un medio de cromatografía funcionalizado que se obtiene por el proceso de la presente invención.

45 El medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención normalmente tiene una porosidad de 0,1 a 1,0 μm , preferentemente de 0,3 a 0,9 μm , más preferentemente de 0,4 a 0,8 μm , incluso más preferentemente de 0,5 a 0,7 μm , todavía más preferentemente de 0,6 a 0,7 μm , por ejemplo de 0,6 a 0,65 μm .

50 El medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención tiene una densidad de 200 a 1000 kg/m^3 , preferentemente 250 a 750 kg/m^3 , más preferentemente de 350 a 650 kg/m^3 , en algunas circunstancias de 450 a 550 kg/m^3 . Otras densidades preferibles incluyen de 200 a 750 kg/m^3 , 200 a 650 kg/m^3 , 200 a 550 kg/m^3 , 250 a 750 kg/m^3 , 250 a 650 kg/m^3 y 250 a 550 kg/m^3 .

55 Normalmente, el medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención tiene un espesor de 0,05 a 10 mm, por ejemplo 0,1 a 5 mm.

60 Preferentemente, el medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención está funcionalizado de manera que sea adecuado para su uso en un método de cromatografía como se define en el presente documento, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de captura por afinidad y cromatografía hidrófoba.

El medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención normalmente está en forma de una membrana.

Cartucho de cromatografía de la invención

65 La presente invención también proporciona un cartucho de cromatografía. El cartucho de cromatografía de la presente invención comprende uno o más medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención.

Alternativamente, el cartucho de cromatografía de la presente invención es obtenible llevando a cabo el proceso de la presente invención e incorporando el producto así obtenido en un cartucho.

5 También se proporciona un proceso para preparar un cartucho de cromatografía que comprende llevar a cabo el proceso de la presente invención e incorporar el producto así obtenido en un cartucho.

El cartucho de cromatografía normalmente es adecuado para su uso en cromatografía, preferentemente un método de cromatografía como se define en el presente documento.

10 Un cartucho de cromatografía de la presente invención comprende normalmente uno o más medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención dentro de un recipiente, por ejemplo un recipiente como se ha definido anteriormente. El soporte normalmente es cilíndrico.

15 Normalmente, el cartucho de cromatografía comprende uno o más medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención apilados dentro de un recipiente cilíndrico.

Normalmente, el cartucho de cromatografía comprende dos o más medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención. Normalmente, el cartucho de cromatografía comprende hasta veinte medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención.

20 Normalmente, el cartucho de cromatografía también comprende una o más fritas dentro del recipiente normalmente cilíndrico. Las fritas son muy conocidas para el experto en la materia y se refieren a estructuras porosas rígidas, normalmente estructuras porosas de metal rígido, poliméricas o cerámicas, preferentemente de metal rígido o cerámicas. Las fritas normalmente están incluidas en un cartucho de cromatografía para mejorar la distribución de
25 flujo a través del cartucho y/o para soportar el uno o más medios de cromatografía funcionalizados de la presente invención. Los poros en las fritas típicas tienen diámetros de 1 a 1000 μm , preferentemente de 5 a 500 μm , más preferentemente de 10 a 150 μm . Otros diámetros de poro de fritas adecuados incluyen de 1 a 20 μm , preferentemente de 5 a 10 μm , más preferentemente de 3 a 7 μm

30 Normalmente, el cartucho de cromatografía también comprende uno o más medios de distribución de fluido de entrada y/o medios de recogida de fluido de salida. Tales medios son muy conocidos para el experto en la materia.

Método de cromatografía de la invención

35 La presente invención también proporciona el uso de un medio de cromatografía funcionalizado de la invención o un cartucho de cromatografía de la invención en cromatografía, particularmente en un método de cromatografía como se define en el presente documento.

40 La presente invención también proporciona un proceso para aislar una o más moléculas biológicas de una fase móvil, proceso que comprende poner en contacto una o más moléculas biológicas en una fase móvil con un medio de cromatografía funcionalizado de la invención o un cartucho de cromatografía de la invención. El medio de cromatografía o cartucho de cromatografía se une preferencialmente a la una o más moléculas biológicas en la fase móvil, normalmente en preferencia a otros componentes (por ejemplo, otras moléculas biológicas) también presentes en la fase móvil. Esto puede llevarse a cabo según métodos convencionales conocidos para la fase de
45 unión de tales métodos cromatográficos.

Así, normalmente, este proceso cromatográfico es un proceso de cromatografía de intercambio iónico (aniónico o catiónico), captura por afinidad, interacción hidrófoba o de modo mixto.

50 Preferentemente, el proceso cromatográfico es un proceso de cromatografía de intercambio aniónico y el medio de cromatografía está funcionalizado con DEAE o Q; el proceso cromatográfico es un proceso de cromatografía de intercambio catiónico y el medio de cromatografía está funcionalizado con SP o CM; el proceso cromatográfico es un proceso de cromatografía de captura por afinidad y el medio de cromatografía está funcionalizado con Proteína A; o el proceso cromatográfico es un proceso de cromatografía de interacción hidrófoba y el medio de cromatografía
55 está funcionalizado con grupos fenilo.

Así, la presente invención proporciona un proceso de cromatografía que comprende la etapa anterior. Normalmente, el proceso de cromatografía se lleva a cabo según un método de cromatografía como se ha definido anteriormente.

60 El proceso de cromatografía normalmente comprende otra etapa de recuperar la una o más moléculas biológicas del medio de cromatografía funcionalizado o cartucho de cromatografía. Esta etapa puede normalmente efectuarse poniendo en contacto el medio de cromatografía funcionalizado o cartucho de cromatografía al que se adsorbe la una o más moléculas biológicas con un tampón de elución. Esto puede llevarse a cabo según métodos convencionales conocidos para la fase de eluir de tales métodos cromatográficos. Así, el proceso normalmente es
65 un método cromatográfico de unir-eluir.

Entre las etapas de unir y eluir, el proceso puede comprender además una etapa de lavar el medio de cromatografía funcionalizado o cartucho de cromatografía de la invención al que se adsorbe la una o más moléculas biológicas. Esta etapa de lavado se lleva a cabo para eliminar cualquier componente que no se una al medio de cromatografía funcionalizado o cartucho de cromatografía. Esto puede llevarse a cabo según métodos convencionales conocidos para la fase de lavado de tales métodos cromatográficos.

Después de la etapa de eluir, el proceso puede comprender además una etapa de regenerar el medio de cromatografía funcionalizado o cartucho de cromatografía de la invención. Normalmente, esto se efectúa poniendo en contacto el medio de cromatografía funcionalizado o cartucho de cromatografía del que se han eluido la una o más moléculas biológicas con un tampón. Esto puede llevarse a cabo según métodos convencionales conocidos para la fase de regeneración de tales métodos cromatográficos.

Normalmente, la una o más moléculas biológicas se eligen de proteínas, polipéptidos, anticuerpos, aminoácidos, virus y ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, vacunas virales y ADN de plásmido.

El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o un anticuerpo de dominio delecionado. Preferentemente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Pueden usarse fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos y anticuerpos monocatenarios.

Normalmente, el proceso cromatográfico emplea un sistema de lecho en movimiento simulado o real. Así normalmente, el proceso comprende introducir la una o más moléculas biológicas en una fase móvil en uno o más aparatos de cromatografía de lecho en movimiento simulado o real que tienen una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas, columnas de cromatografía que contienen como adsorbente el medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención.

Puede usarse cualquier aparato de lecho en movimiento simulado o real conocido para llevar a cabo el proceso cromatográfico, a condición de que comprenda, como adsorbente, el medio de cromatografía funcionalizado de la presente invención.

La cromatografía en lecho en movimiento simulado y real son técnicas conocidas, familiares para aquellos expertos en la materia. El principio de operación implica movimiento en contracorriente de una fase de eluyente líquido y una fase de adsorbente sólido. Esta operación permite uso mínimo de disolvente haciendo el proceso económicamente viable. Tal tecnología de separación ha encontrado aplicaciones en diversas áreas que incluyen purificación de moléculas biológicas usando adsorbentes de membrana.

Un sistema de lecho en movimiento simulado consiste en varias columnas individuales que contienen adsorbente que están conectadas juntas en serie. El eluyente pasa a través de las columnas en una primera dirección. Los puntos de inyección de la materia prima y el eluyente, y los puntos de recogida de componentes separados en el sistema, son periódicamente desplazados por medio de una serie de válvulas. El efecto global es simular la operación de una única columna que contiene un lecho en movimiento del adsorbente sólido. Así, un sistema de lecho en movimiento simulado consiste en columnas que, como en un sistema de lecho estacionario convencional, contienen lechos estacionarios de adsorbente sólido a través del que pasa el eluyente, pero en un sistema de lecho en movimiento simulado la operación es tal como simular un lecho en movimiento en contracorriente continuo.

Un lecho en movimiento simulado real es similar en operación a un sistema de lecho en movimiento simulado. Sin embargo, en vez de desplazar los puntos de inyección de la mezcla de alimentación y el eluyente, y los puntos de recogida de componentes separados por medio de un sistema de válvulas, en su lugar una serie de unidades de adsorción (es decir, columnas) son físicamente movidas con respecto a los puntos de alimentación y de extracción. Otra vez, la operación es tal como simular un lecho en movimiento en contracorriente continuo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Materiales y equipo

Se emplearon los siguientes materiales, equipo y técnicas, a menos que se establezca de otro modo

Se compraron proteína BSA Bovine Albumin Serum Fraction V, >96 % con peso molecular de ~66 kDa y todos los otros productos químicos de Sigma-Aldrich Co. (Sigma-Aldrich Company Ltd. Dorset, RU) de la mayor pureza disponible y se usaron sin más purificación, a menos que se establezca de otro modo.

Se compró citocromo c, de corazón equino, ≥90 % con peso molecular de ~12 kDa de Merck Chemical (Merck Serono Ltd. Middlesex, RU).

Ejemplo 1 preparativo*Preparación de membrana de nanofibra*

Se disolvió una solución de 0,20 g/ml de acetato de celulosa, con una masa molecular relativa de 29.000 g/mol, en acetona/dimetilformamida/etanol (2:2:1). Se llevó a cabo electrohilado en una vitrina de control climático Climate Zone (alsafetech Luton, RU) para permitir el control de temperatura y la humedad de las condiciones ambientales. Se usaron condiciones optimizadas de O. Hardick, et al, J. Mater. Sci. 46 (2011) 3890 para producir hojas no tejidas de nanofibras de acetato de celulosa electrohiladas con baja distribución de diámetros de fibra, espesores promedio de 20 micrómetros y densidades de área promedio de 10 g/m².

Una vez electrohiladas, quince hojas no tejidas de nanofibras con un área superficial de la cara de 100 cm² se apilaron las unas encima de las otras y se comprimieron en una prensa hidráulica manual a una presión de 1 MPa durante dos minutos. Después de la compresión, la hoja de material se puso inmediatamente en un horno precalentado a 213 °C durante 5 minutos entre hojas metálicas. La presión entre las hojas metálicas se determinó como 20 kPa. Entonces, el material comprimido y calentado se cortó en múltiples discos de 25 mm de diámetro.

Ejemplo 1*Modificación química por convección*

Se preparó un disco de nanofibra de acetato de celulosa como antes y se modificó químicamente para dar funcionalidad de superficie de intercambio aniónico. Se modificó un disco que tenía un espesor de 0,188 mm y volumen total 0,1 ml como se explica a continuación.

El disco de nanofibra se empaquetó en un portafiltros antes de la derivatización. Se llevó a cabo desacetilación usando 30 ml de NaOH 0,1 M en agua DI:etanol (2:1), que se bombeó a través del disco de una manera cíclica usando una bomba de HPLC P680 Dione a una tasa de 25 ml/min durante 24 horas. Entonces se aclaró el disco con 300 ml de H₂O DI a una tasa de 25 ml/min. Entonces se confirió la funcionalidad de superficie de intercambio aniónico por ciclos de 20 ml de solución acuosa al 99 % de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina al 15 % (DEACH) caliente (40 °C) a través del disco a 40 ml/min durante 10 min. Entonces se sacó el disco de la carcasa de portafiltros y se dejó durante 30 segundos que se secase goteando antes poner en 20 ml de NaOH 0,5 M caliente (80 °C) en un tubo de muestra de 50 ml en una mesa vibratoria con agitación suave durante 10 min. Finalmente, el disco se aclaró en múltiples volúmenes de H₂O DI y se dejó secar antes de uso.

Ejemplo 2

Se llevó a cabo un experimento como se explica en el Ejemplo 1 anterior, excepto que el disco de nanofibra de acetato de celulosa usado tuvo un espesor de 0,376 mm y volumen total 0,2 ml.

Ejemplo 3*Modificación química por difusión*

Se preparó un disco de nanofibra de acetato de celulosa como antes. Se modificó un disco que tenía un espesor de 0,188 mm y volumen total 0,1 ml como se explica a continuación.

El disco se puso en un tubo de muestra de 50 ml que contenía 30 ml de NaOH 0,1 M en agua DI:etanol (2:1) durante 24 horas en una mesa vibratoria de laboratorio para desacetilar el acetato de celulosa para formar celulosa regenerada. Entonces, el disco se aclaró minuciosamente en volúmenes de 10 x 30 ml de agua DI durante 5 minutos cada uno en la mesa vibratoria. Entonces se introdujo funcionalidad de superficie de intercambio aniónico poniendo el disco aclarado en un tubo de muestra con 20 ml de solución acuosa al 99 % de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina al 15 % (DEACH) caliente (40 °C) durante 10 min. Se eliminó el adsorbente y se dejó que se secase goteando durante 30 segundos antes ponerse en 20 ml de NaOH 0,5 M caliente (80 °C) en un nuevo tubo de muestra en la mesa vibratoria durante 10 min. Finalmente, el disco se aclaró en múltiples volúmenes de H₂O DI y se dejó secar antes de uso.

Ejemplo 4

Se llevó a cabo un experimento como se explica en el Ejemplo 1 anterior, excepto que el disco de nanofibra de acetato de celulosa usado tuvo un espesor de 0,376 mm y volumen total 0,2 ml.

Ejemplo 5*Análisis del rendimiento de bioseparación*

Se prepararon discos de nanofibra y modificados según los Ejemplos 1 a 4 se analizaron para comparar el rendimiento de unión a proteína de membranas de nanofibra de masa y volumen equivalentes derivatizada por los dos métodos diferentes. Esto fue para determinar el grado de modificación del área superficial presentada por estos sistemas de nanofibra.

Se realizaron experimentos usando un AKTA Basic (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, RU) con medición en línea de absorbancia UV (280 nm), pH y conductividad.

Se prepararon discos de nanofibra y modificados según los Ejemplos 1 a 4 se equilibraron con 5 ml de bis-Tris 20 mM, tampón de lavado a pH 5,3 a una tasa de 480 cm/h y luego se cargaron con 1 ml de una solución de proteína de dos componentes que contenía 1 mg/ml de BSA y 0,25 mg/ml de citocromo C. Entonces se pasaron 5 ml de tampón de lavado a través del adsorbente antes de introducir 5 ml de tampón de elución de NaCl 0,4 M-bis-Tris 20 mM, pH 5,3. Entonces se analizó la capacidad de elución usando el software Unicorn 5.0 como se mide por la integración del área del pico.

Se usó una mezcla de BSA y citocromo C para aprovechar sus diferentes puntos isoeléctricos y, por tanto, la idoneidad para la separación por cromatografía de intercambio iónico. El citocromo C tiene un pI de 10,0 mientras que BSA tiene un pI de 4,7 en agua a 25 °C. Esto significa que en una solución de tampón bis-Tris a pH 5,3 el citocromo C tendrá una carga neta positiva y no se unirá a la superficie de intercambio aniónica débil del adsorbente de DEAE. A diferencia, a este pH por encima del pI de BSA, BSA tendrá una carga de superficie negativa neta y, por tanto, se unirá al adsorbente de DEAE. Como la concentración de sales aumenta durante la elución, la interacción entre la carga de superficie negativa de BSA y el intercambiador aniónico está fuera de competición por los iones de sal y así el BSA se elimina del adsorbente y se recoge.

El rendimiento del adsorbente se analizó durante varios ciclos de operación para determinar la reproducibilidad con respecto a la vida de los adsorbentes. La tabla a continuación expone las capacidades de unión promedio para los discos probados.

Muestra	Espesor de adsorbente (mm)	Volumen de adsorbente (ml)	Capacidad de unión (mg/ml)
Ejemplo 1	0,188	0,1	5,64 ± 0,10
Ejemplo 3	0,188	0,1	5,56 ± 0,40
Ejemplo 2	0,376	0,2	6,46 ± 0,44
Ejemplo 4	0,376	0,2	5,88 ± 0,56

Para ambos espesores de discos de nanofibra, el proceso de modificación convectiva dio una capacidad de unión más alta que el proceso de modificación difusiva. Este efecto fue más pronunciado para el disco más grueso.

También se observó que la capacidad de reactivos químicos para alcanzar superficies funcionales del sistema de polímero también dependía del espesor de la membrana de nanofibra. Así, para las membranas de nanofibra más gruesas probadas hubo una capacidad de unión significativamente mejorada observada para los adsorbentes de nanofibra de DEAE que se derivatizaron mediante flujo convectivo. Esto sugiere que para los protocolos investigados, la difusión es insuficiente para que los reactivos químicos alcancen todas las áreas superficiales de unión.

Ejemplo 6

Modificación química difusiva repetida

Se llevó a cabo derivatización de superficie de intercambio aniónico de los discos de nanofibra de celulosa como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4, es decir, usando un disco de nanofibra de acetato de celulosa que tiene un espesor de 0,376 mm y volumen total 0,2 ml. La modificación química se repitió entonces desde el punto de la introducción de DEACH hasta el final del protocolo.

Así, el disco obtenido en el Ejemplo 4 se puso en un tubo de muestra con 20 ml de solución acuosa al 99 % de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietilamina al 15 % (DEACH) caliente (40 °C) durante 10 min. Se eliminó el adsorbente y se dejó secar goteando durante 30 segundos antes de ponerse en 20 ml de NaOH 0,5 M caliente (80 °C) en un tubo de muestra nuevo en una mesa vibratoria durante 10 min, entonces se aclaró en múltiples volúmenes de H₂O DI.

Ejemplo 7

Se llevó a cabo un experimento como en el Ejemplo 6, excepto que la modificación química se repitió otra vez.

Así, el disco obtenido en el Ejemplo 6 se puso en un tubo de muestra con 20 ml de solución acuosa al 99 % de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiltilamina al 15 % (DEACH) caliente (40 °C) durante 10 min. Se eliminó el adsorbente y se dejó secar goteando durante 30 segundos antes de ponerse en 20 ml de NaOH 0,5 M caliente (80 °C) en un tubo de muestra nuevo en una mesa vibratoria durante 10 min, entonces se aclaró en múltiples volúmenes de H₂O DI.

Ejemplo 8

Se llevó a cabo un experimento como en el Ejemplo 7, excepto que la modificación química se repitió otra vez.

Así, el disco obtenido en el Ejemplo 7 se puso en un tubo de muestra con 20 ml de solución acuosa al 99 % de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiltilamina al 15 % (DEACH) caliente (40 °C) durante 10 min. Se eliminó el adsorbente y se dejó secar goteando durante 30 segundos antes de ponerse en 20 ml de NaOH 0,5 M caliente (80 °C) en un tubo de muestra nuevo en una mesa vibratoria durante 10 min, entonces se aclaró en múltiples volúmenes de H₂O DI.

Ejemplo 9

Se analizaron los discos producidos en los Ejemplos 4 y 6 a 8 para la capacidad de unión usando el protocolo explicado anteriormente en el Ejemplo 5. También se determinó la caída de presión para cada disco.

La tabla a continuación expone las capacidades de unión promedio y caídas de presión para los discos probados.

Muestra	Modificaciones químicas	Caída de presión (MPa)	Capacidad de unión (mg/ml)
Ejemplo 4	x1	0,210	5,88 ± 0,56
Ejemplo 6	x2	0,205	13,31 ± 3,11
Ejemplo 7	x3	0,245	14,88 ± 0,38
Ejemplo 8	x4	0,205	15,88 ± 0,73

Estos resultados muestran una clara mejora en la sustitución de grupos funcionales con etapas del protocolo de derivatización repetidas. En general, se observó una mejora del 270 % en la capacidad de unión para los adsorbentes probados usando etapas del protocolo repetidas durante la derivatización. La caída de presión no estuvo afectada por la modificación repetida.

No pareció afectarse la estabilidad estructural de los adsorbentes de nanofibra DEAE de derivatización repetida y esto se confirmó por estudios de reproducibilidad que mostraron rendimiento constante durante 50 ciclos de operación típica.

La Figura 1 muestra el flujo a través de citocromo C + BSA no unido como el primer pico durante la carga de una mezcla de 2 componentes y la elución de BSA como el segundo pico. El resultado promedio durante 50 series de unión equivalentes se representa ± 1 desviación estándar de la población de muestra (mostrada por las curvas discontinuas alrededor de la curva principal del mismo color). Estos resultados muestran la reproducibilidad con respecto a las 50 series de unión equivalentes y muestran que para las condiciones elegidas los adsorbentes de nanofibra rindieron reproduciblemente, capturando y eluyendo el 99 % del BSA cargado. La desviación estándar se calculó para mostrar que la nanofibra adsorbente operaba coherentemente.

La Figura 2 muestra el flujo a través de citocromo C + BSA no unido como el primer pico durante la carga de una mezcla de 2 componentes y la elución de BSA como el segundo pico. Se llevaron a cabo múltiples series de unión, y se representaron curvas para series registradas separadas 500 series. Las curvas registradas para las dos series casi se solapan completamente. Esto también demuestra la excelente reproducibilidad obtenida con membranas preparadas según la presente invención. Esto es a diferencia de la significativa disminución en el rendimiento después de múltiples series informadas con membranas del estado de la técnica.

Ejemplo 2 preparativo

Se disolvió una solución de 0,20 g/ml de acetato de celulosa, con una masa molecular relativa de 29.000 g/mol, en disolventes comunes, por ejemplo acetona/dimetilformamida/etanol. Se usaron condiciones optimizadas de O. Hardick, et al, J. Mater. Sci. 46 (2011) 3890 para producir hojas no tejidas de nanofibras de acetato de celulosa electrohiladas con distribución baja de diámetros de fibra, espesores promedio de 20 micrómetros y densidades de área promedio de 20 g/m².

Una vez electrohiladas, se apilaron diez hojas no tejidas de nanofibras con un área superficial de la cara de 100 cm² las unas encima de las otras y se pusieron en un horno precalentado a 208 °C durante 30 minutos entre hojas metálicas. La presión entre las hojas metálicas se determinó como 20 kPa. Entonces, el material comprimido y

calentado se cortó en múltiples discos de 25 mm de diámetro.

Ejemplo 1 analítico - Efecto del calentamiento y la compresión

Se obtuvieron diez hojas de nanofibras de acetato de celulosa como se describe en el Ejemplo 2 preparativo. Las hojas se apilaron las unas encima de las otras y se sometieron a 20 kPa de presión en una prensa calentada mientras que se calentaban simultáneamente a 207 °C. Las hojas apiladas se comprimieron y se calentaron en la prensa durante 5 minutos. Después de la compresión y el calentamiento, se cortó un disco de la membrana resultante. Se desacetilaron las fibras de acetato de celulosa dando celulosa usando el método brevemente expuesto en el Ejemplo 3. Las muestras preparadas de esta forma se refieren más adelante como las muestras de "prensa", que refleja el hecho de que el calentamiento se llevó a cabo en una prensa calentada.

Se puso un disco de "prensa" en una junta tórica de caucho dentro de una jeringa de 50 ml, como recipiente para contener la junta tórica en su sitio. Se colocó un peso en forma de una punta de pipeta de 10 ml (masa 5,81 g) en el centro del disco de nanofibra. Se añadió una solución de NaOH 1 M al recipiente y se usó un cronómetro para determinar el punto de fallo. El punto de fallo se determinó como el momento en el que la punta de pipeta cayó a través del disco. La longitud de tiempo necesaria para que la punta de pipeta caiga a través del disco indica la resistividad química del disco. Este experimento se repitió tres veces.

Este sistema experimental se muestra en la Figura 3.

Se produjeron discos de nanofibra adicionales como se ha descrito anteriormente, excepto que las diez hojas de nanofibra se comprimieron primero en una prensa (sin calentamiento) a una presión de 20 kPa durante una hora, seguido de calentamiento (sin compresión) en un horno durante cinco minutos a 207 °C. Las muestras preparadas de esta forma se refieren más adelante como las muestras de "horno", que refleja el hecho de que el calentamiento se llevó a cabo en un horno.

Se puso un disco de "horno" en una junta tórica de caucho y se sometió a la prueba de resistividad química descrita anteriormente. Otra vez, esto se repitió tres veces.

Los resultados para los discos de "prensa" y de "horno" se exponen en la tabla a continuación.

	Disco 1	Disco 2	Disco 3
Horno	66 minutos	71 minutos	88 minutos
Prensa	>120 h	>120 h	>120 h

Puede observarse de estos resultados que los discos que son comprimidos y calentados simultáneamente tienen resistividad química superior a aquellos que son comprimidos (sin calentar) y posteriormente calentados (sin comprimir).

El disco de "horno" mostró decoloración y corrosión por picaduras en el plazo de 10 minutos desde la exposición a NaOH 1 M. El disco de "prensa" mostró poca degradación incluso después de 120 horas de exposición. Las fotografías de los discos respectivos se muestran como Figura 4.

Se determinó el espesor y la densidad de varios discos de "prensa" y de "horno". Los espesores y las densidades promedio de estos discos se muestran en la Figura 5. Se encontró que los discos de "prensa" eran tanto más finos como más densos que los discos de "horno".

Se analizaron las características de flujo de los discos de "prensa" y de "horno" determinando el delta de caída de presión en la columna a caudales crecientes (2, 5, 10, 20, 30, 40, 60 ml/min) de tampón Tris-HCl (pH 8) a través de los discos. Los datos obtenidos se muestran como la Figura 6. Puede observarse que los discos de "prensa" y de "horno" tienen características de flujo similares.

Ejemplo 2 analítico - Efecto de variar la presión

Se prepararon discos de celulosa regenerada usando el método descrito en el Ejemplo 1 analítico para los discos de "prensa". Los discos preparados de este modo se refieren más adelante como los discos de "20 kPa".

Se prepararon discos adicionales usando el método descrito anteriormente para los discos de "20 kPa", excepto que se usó una presión de 200 kPa en lugar de 20 kPa. Los discos preparados de este modo se refieren más adelante como los discos de "200 kPa".

Se determinaron el espesor y la densidad de varios discos de "20 kPa" y "200 kPa". Los espesores y densidades promedio de estos discos se muestran en la Figura 7. Se encontró que los discos de "200 kPa" eran tanto más finos como más densos que los discos de "20 kPa".

Las características de flujo de los discos de "20 kPa" y "200 kPa" se analizaron usando el método descrito en el Ejemplo 1 analítico. Los datos obtenidos se muestran como la Figura 8. Puede observarse que la caída de presión sobre los discos de "200 kPa" es superior a aquella sobre los discos de "20 kPa".

Los discos de celulosa regenerada de "20 kPa" y "200 kPa" se funcionalizaron con DEAE usando el método del Ejemplo 3. Se determinaron las capacidades de unión dinámica (DBC) para estos discos usando el protocolo similar al explicado en el Ejemplo 5. Se determinó la capacidad de unión dinámica (DBC) a un flujo de 30 ml/min, usando diferentes masas de BSA (1 mg, 2 mg, 4 mg), usando tampón Tris-HCl a pH 8, con una etapa de elución de NaCl 1 M. Los resultados del análisis de DBC se muestran en la Figura 9. La DBC de los discos de "20 kPa" es superior a la de los discos de "200 kPa".

Ejemplo 10

Se prepararon discos de nanofibra según el método del Ejemplo 2 preparativo. Los discos se desacetilaron y se sumergieron en DEACH a temperatura ambiente, entonces se lavaron con NaOH 0,5 M a temperatura ambiente. La inmersión en DEACH y el lavado con NaOH 0,5 M se repitió hasta 5 veces y se refiere más adelante como el número de ciclos de funcionalización. Así, los discos se funcionalizaron usando 1 ciclo, 2 ciclos, 3 ciclos, 4 ciclos y 5 ciclos.

Las características de flujo de los discos de 1, 2, 3, 4 y 5 ciclos se analizaron usando el método descrito en el Ejemplo 1 analítico usando caudales crecientes (2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ml/min), usando tampón Tris-HCl a pH 8. Los datos obtenidos se muestran como la Figura 10. Puede observarse que la caída de presión aumenta con el número de ciclos.

Se analizaron las capacidades de unión dinámica (DBC) para los discos de 1, 2, 3, 4 y 5 ciclos usando el método descrito en el Ejemplo 2 analítico. Los resultados del análisis de DBC se muestran en la Figura 11. La DBC aumenta de 1 a 4 ciclos, y entonces disminuye para el quinto ciclo.

Ejemplo 11 - Preparación de discos funcionalizados con SP

Se prepararon discos de celulosa regenerada usando el método del Ejemplo 2 preparativo y Ejemplo 1.

A una solución de 10 ml de DMSO y 5 ml de NaOH 1 M se añadieron 2 ml de alil glicidil éter, seguido de 10 discos de fibra de celulosa regenerada. Se ajustó una solución de disulfito de sodio (3 g) en 30 ml de H₂O a pH 6,5 mediante la adición de NaOH (1 M). Los discos obtenidos en la primera etapa anterior se trataron entonces con esta mezcla. Los discos se lavaron entonces con HCl 0,1 M, seguido de agua.

Para determinar la capacidad de unión dinámica, se analizaron discos funcionalizados con SP usando un método similar al brevemente expuesto anteriormente en el Ejemplo 5. Se equilibró un sistema de purificación AKTA (GE Healthcare) con tampón acetato de Na 10 mM a pH 5. Se cargó una muestra de 1 mg/ml de lisozima sobre el sistema a 30 ml/min. Se usó una solución de NaCl 1 M (tampón acetato de Na 10 mM a pH 5) para la elución. La señal UV en línea a 280 nm produjo el cromatograma mostrado en la Figura 12.

Ejemplo 12 - Preparación de discos funcionalizados con CM

Se prepararon discos de celulosa regenerada usando el método del Ejemplo 2 preparativo y Ejemplo 1.

Éstos se añadieron a una solución acuosa de NaBr (24,3 mmoles) y TEMPO (1,60 mmoles) y se ajustó usando NaOH a pH 10. A ésta se añadió NaOCl (5,0 mmoles) hasta que no hubo cambio adicional en el pH. Entonces se lavaron discos con EtOH.

Para determinar la capacidad de unión dinámica de los discos, se ejecuta un sistema AKTA a un caudal de 30 ml/min y la muestra usada es lisozima a una concentración de 1 mg/ml con inyección de carga de 1 ml. Se usó tampón acetato sódico 10 mM a pH 5 para equilibrar y lavar el sistema. Se usa una solución de NaCl 1 M (tampón acetato sódico 10 mM a pH 5) para la elución. La señal UV en línea a 280 nm produjo el cromatograma mostrado en la Figura 13.

Ejemplo 13 - Preparación de discos funcionalizados con Q

Se prepararon discos de celulosa regenerada usando el método del Ejemplo 2 preparativo y Ejemplo 1.

Éstos se añadieron a una solución de 2:1:0,1 de DMSO:NaOH 1 M:glicidiltrimetilamonio. Entonces, los discos se lavaron con HCl 0,1 M y agua.

Para determinar la capacidad de unión dinámica se equilibró el sistema de purificación AKTA (GE Healthcare) con tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8. Se cargó una muestra de 1 mg/ml de BSA sobre el sistema a 20 ml/min. Se usa una

solución de NaCl 1 M (tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8) para la elución. La señal UV en línea a 280 nm produjo el cromatograma mostrado en la Figura 14.

Ejemplo 14 - Preparación de discos funcionalizados con Proteína A

Se prepararon discos de celulosa regenerada usando el método del Ejemplo 2 preparativo y Ejemplo 1.

Éstos se añadieron a 80 ml de solución de tampón de acetato sódico (pH 5,5) que contenía 6,5 g de NaO₄. Los discos se lavaron entonces con 50 ml de etilenglicol seguido de agua. Entonces, los discos se lavaron con 0,05 % de Triton X-100, carbonato/bicarbonato 100 mM a pH 9,0. El ligando de proteína A se dializó con 0,05 % de Triton X-100, carbonato/bicarbonato 100 mM a pH 9,0 y luego se añadió a los discos. La solución se decantó entonces y se añadió 0,05 % de Triton X-100, carbonato/bicarbonato 100 mM a pH 9,0. A ésta se añadió solución de borohidruro de sodio 100 mM para dar una concentración de borohidruro final de 4 mM. Entonces esta solución se decantó y se añadieron 20 % de etanol en tampón fosfato 50 mM-cloruro sódico 150 mM a pH 6,7. Las etapas de lavado anteriores se repitieron 9 veces.

Para determinar la capacidad de unión dinámica se ejecutó el sistema AKTA a un caudal de 30 ml/min y la muestra usada fue IgG purificada en Proteína A a una concentración de 1 mg/ml con inyección de carga de 1 ml. Se usó tampón PBS a pH 7,4 para equilibrar y lavar el sistema. Se usa una solución de tampón citrato de sodio 0,1 M a pH 3,0 para la elución. La señal UV en línea a 280 nm produjo el cromatograma mostrado en la Figura 15.

Ejemplo 15 - Preparación de discos funcionalizados con fenilo

Se prepararon discos de celulosa regenerada usando el método del Ejemplo 2 preparativo y Ejemplo 1.

Éstos se añadieron a 75 ml de una solución de una mezcla 2:1 de DMSO:NaOH 1 M. Entonces se añadió óxido de estireno (7,5 ml) a la mezcla de reacción que se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Entonces, los discos se lavaron con metanol, y luego agua.

Para determinar la capacidad de unión dinámica se ejecutó el sistema AKTA a un caudal de 10 ml/min y la muestra usada fue 0,1 mg/ml de lisozima (con sulfato de amonio 1,5 M), con una inyección de carga de 1 ml. Se usó sulfato de amonio 1,5 M con Tris 10 mM a pH 8 para equilibrar y lavar el sistema. Se usa Tris 10 mM a pH 8 para la elución. La señal UV en línea a 280 nm produjo el cromatograma mostrado en la Figura 16.

Ejemplo 3 analítico - Efecto de apilar antes comprimir y calentar

Como se trata anteriormente en el Ejemplo 1 analítico, los discos de celulosa regenerada preparados según la presente invención (los discos de "prensa") aguantaron durante >120 horas en una prueba de resistividad química (mostrada en la Figura 3). Los discos de "prensa" mostraron poca degradación incluso después de 120 horas de exposición a NaOH (como se muestra en la Figura 4).

Se obtuvieron hojas de nanofibras de acetato de celulosa individuales como se describe en el Ejemplo 2 preparativo. Se intercaló una única hoja de capa entre dos hojas de PTFE planas y se puso en un horno a 208 °C durante una hora, según el método descrito en Ma, et al, Journal of Membrane Science 265 (2005) 115-123. La hoja obtenida se desacetiló usando el método brevemente expuesto en el Ejemplo 3. Se cortaron diez discos de la hoja de celulosa resultante y se apilaron juntos como se describe en Ma, et al. Las muestras preparadas de esta forma se refieren más adelante como las muestras de "Ma, et al". Este proceso se repitió ocho veces para crear ocho pilas de diez discos.

Se colocó una pila de discos de "Ma, et al" en una junta tórica de caucho y se sometió a la prueba de resistividad química descrita anteriormente en el Ejemplo 1 analítico. Esto se repitió tres veces. Los tres discos de "Ma, et al" probados fallaron después de diez minutos, diez minutos y dos minutos, respectivamente.

Puede observarse de estos resultados que los discos que se forman a partir de múltiples hojas no tejidas de nanofibras que se apilaron primero y luego se comprimieron y calentaron simultáneamente tienen resistividad química superior a aquellos formados calentando hojas de nanofibra individuales, seguido de apilamiento posterior.

Los discos de "Ma, et al" mostraron decoloración y corrosión por picaduras en el plazo de 10 minutos de exposición a NaOH 1 M como se muestra en la Figura 17. Los discos de "prensa caliente" mostraron poca degradación, incluso después de 120 horas de exposición (Figura 4).

Se determinó el espesor y la densidad de varios discos de "prensa térmica" y de "Ma, et al". Los espesores y las densidades promedio de estos discos se muestran en la Figura 18. Se encontró que los discos de "prensa térmica" eran tanto más finos como más densos que los discos de "Ma, et al".

Las características de flujo de los discos de "prensa térmica" y de "Ma, et al" se analizaron determinando el delta de caída de presión en la columna a caudales crecientes de tampón Tris-HCl (pH 8) a través de los discos. Los datos obtenidos se muestran como la Figura 19. Puede observarse que los discos de "prensa térmica" y de "Ma, et al" tienen características de flujo similares.

5 Se funcionalizaron los discos de "prensa térmica" y de "Ma et al" con ligandos de DEAE usando el método descrito en el Ejemplo 3. La capacidad de unión dinámica de estos discos se determinó usando el protocolo similar al que se expone en el Ejemplo 5. La capacidad de unión dinámica (DBC) se determinó a un flujo de 30 ml/min, usando diferentes masas de BSA (1 mg, 2 mg, 4 mg), usando tampón Tris-HCl a pH 8, con una etapa de elución de NaCl 1 M. Los resultados del análisis de DBC se muestran en la Figura 20. La DBC de los discos de "prensa térmica" es superior a la de los discos de "Ma, et al".

10 Se determinó la posibilidad de realizar funcionalizaciones repetidas de los discos de "prensa térmica" y de "Ma, et al". El método para la funcionalización de DEAE repetida de los discos descrito en el Ejemplo 10 se llevó a cabo en tanto los discos de celulosa regenerada de "prensa térmica" como de "Ma, et al". La mala estabilidad química del material de "Ma, et al" significó que no era posible aumentar DBC usando múltiples ciclos de funcionalización. La máxima DBC que se encontró que era posibles para el material de "Ma, et al" era aproximadamente 7 mg/ml (como se muestra en la Figura 20). Usando múltiples ciclos de funcionalización fue posible aumentar la DBC del material de "prensa térmica" a aproximadamente 16 mg/ml (véase la Figura 11). El material de "Ma, et al" se degradó significativamente después de múltiples ciclos de DEAE. Este problema no se observó con el material de "prensa térmica". Se muestran fotografías del material de "Ma, et al" y de "prensa térmica" después de múltiples ciclos de funcionalización en la Figura 21. El material de "Ma, et al" se muestra como la fotografía inferior y el material de "prensa térmica" como la fotografía superior en la Figura 21.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un medio de cromatografía polimérico funcionalizado, proceso que comprende

(I) proporcionar dos o más hojas no tejidas apiladas una encima de la otra, comprendiendo cada dicha hoja una o más nanofibras de polímero, donde las nanofibras de polímero tienen diámetros medios de 10 nm a 1000 nm, (II) calentar y comprimir simultáneamente la pila de hojas para fusionar puntos de contacto entre las nanofibras de hojas adyacentes, y (III) poner en contacto el producto comprimido y calentado con un reactivo que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía.

2. El proceso según la reivindicación 1, en el que entre dos y treinta, preferentemente entre cinco y veinticinco, de dichas hojas se apilan las una encima de las otras en la etapa (I).

3. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una presión de

(i) de 0,01 a 5 MPa, (ii) superior a 1 kPa, o (iii) no superior a 500 kPa, se aplica a la pila de hojas en la etapa (II).

4. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada hoja no tejida consiste en una única nanofibra de polímero, o comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nanofibras de polímero.

5. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero está seleccionado del grupo que consiste en celulosa, acetato de celulosa, polisulfonas, poliamidas, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilonitrilo, poliestireno, poli(óxido de etileno), y mezclas de los mismos.

6. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas nanofibras son nanofibras de acetato de celulosa, y el producto comprimido y calentado se trata entre las etapas (II) y (III) para convertir el acetato de celulosa en celulosa.

7. El proceso según la reivindicación 6, en el que la pila de hojas se calienta a una temperatura entre 190 y 220 °C en la etapa (II).

8. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo la etapa (III) poner en contacto el producto comprimido y calentado en un modo discontinuo al menos dos veces con un reactivo que funcionaliza el producto comprimido y calentado como medio de cromatografía.

9. El proceso según la reivindicación 8, comprendiendo cada etapa de poner en contacto con un reactivo en un modo discontinuo (a) poner en contacto con el reactivo, (b) aislar el producto de la etapa (a) del reactivo, (c) opcionalmente tratar el producto de la etapa (b) con álcali acuoso, y (d) opcionalmente lavar el producto de la etapa (b) o el producto opcional de la etapa (c) con agua; y/o en el que la funcionalización discontinua se lleva a cabo entre dos y cuatro veces.

10. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo la etapa (III) poner el producto comprimido y calentado en un recipiente, y (IV) provocar que un reactivo circule a través del recipiente de manera que el reactivo circule en contacto con el producto comprimido y calentado que funcionaliza el producto de la etapa (II) como medio de cromatografía.

11. El proceso según la reivindicación 10, en el que la etapa (IV) comprende

- provocar que un reactivo circule a través del recipiente bajo presión; y/o
- provocar que un reactivo circule a través del recipiente usando una bomba; y/o
- provocar que un reactivo circule a través del recipiente en una manera cíclica; y/o
- provocar que un reactivo circule a través del recipiente durante un periodo de tiempo de 1 a 20 minutos.

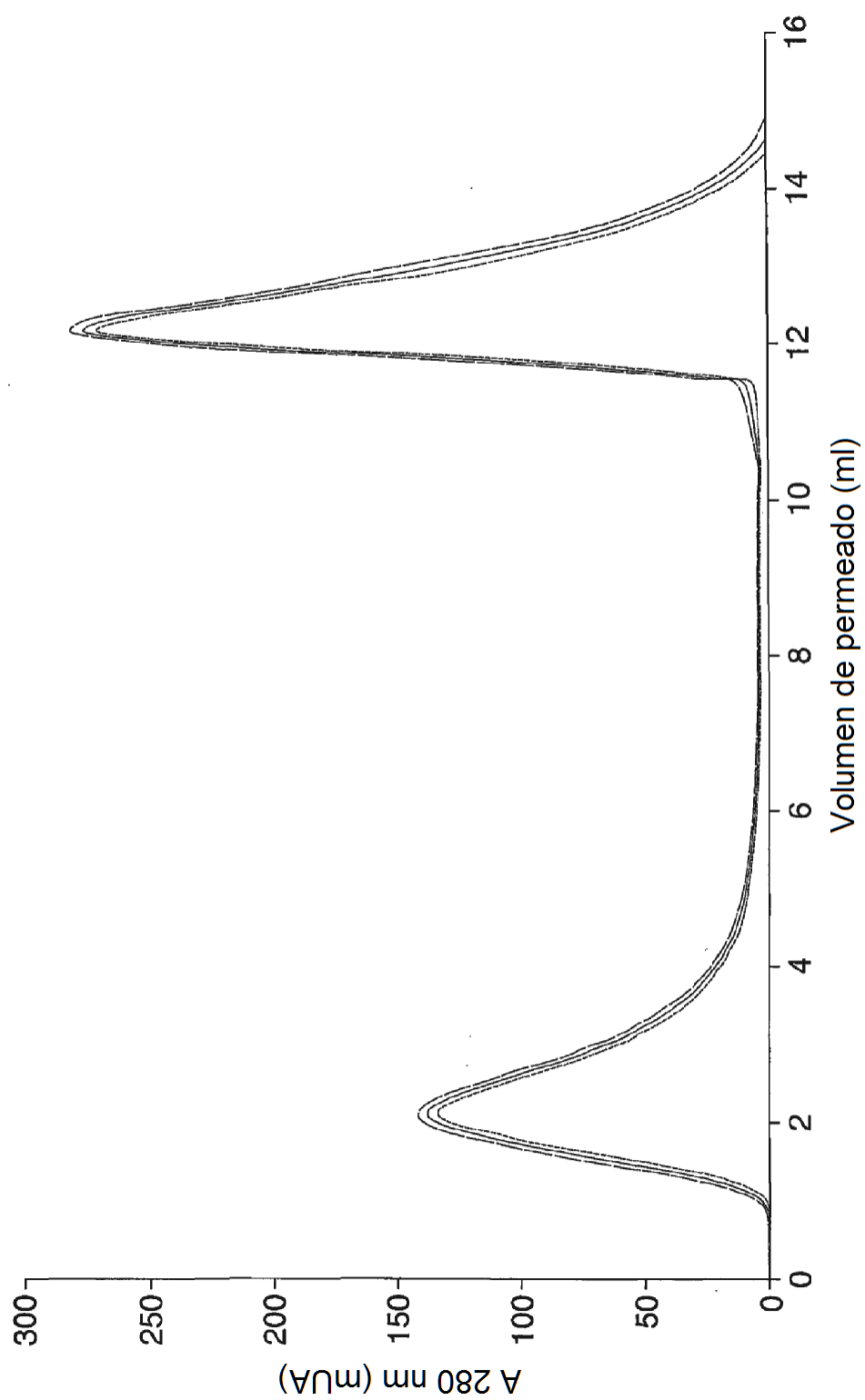
12. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo funcionaliza el producto comprimido y calentado de manera que el medio de cromatografía funcionalizado resultante sea adecuado para su uso en un método de cromatografía elegido del grupo que consiste en métodos de intercambio iónico, captura por afinidad, interacción hidrófoba y de modo mixto.

13. El proceso según la reivindicación 12, en el que

- el método de cromatografía es un método de intercambio catiónico, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo carboxilato, sulfonato o fosfonato;
- el método de cromatografía es un método de intercambio aniónico, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo amino cuaternario o dietilamina;

- el método de cromatografía es un método de cromatografía de captura por afinidad, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con una proteína, Proteína A, Proteína G, Proteína L, péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, colorante, histidina, grupo que contiene un catión metálico, o ligando mimético o sintético que imita la acción de un ligando de proteína;
- 5 - el método de cromatografía es un método de cromatografía de interacción hidrófoba, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo propilo, butilo, fenilo u octilo; o
- el método de cromatografía es un método de cromatografía de modo mixto, y el reactivo funcionaliza el medio de cromatografía con un grupo MEP, octilamina, N-bencilmetiletanolamina o N-benzoil-homocisteína.
- 10 14. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo funcionaliza un grupo hidroxilo, amino o ácido carboxílico en el medio de cromatografía.
- 15 15. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto comprimido y calentado se trata para desproteger o activar cualquier grupo funcional sobre el polímero antes de la etapa de poner en contacto con un reactivo.
16. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que (A):
- 20 - entre cinco y veinticinco de dichas hojas se apilan las unas encima de las otras en la etapa (I), comprendiendo cada hoja 1, 2 o 3 nanofibras de polímero, y teniendo cada hoja un espesor de 5 a 40 μm , y/o
- en la etapa (II) se aplican una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero y una presión de 0,01 a 5 MPa durante 1 a 120 minutos para obtener un producto comprimido y calentado que tiene una densidad promedio de 250 a 750 kg/m^3 y un espesor de 0,05 a 10 mm;
- 25 o (B):
- entre cinco y veinte de dichas hojas se apilan las unas encima de las otras en la etapa (I), consistiendo cada hoja en una única nanofibra de polímero, y teniendo cada hoja un espesor de 5 a 120 μm y una densidad del área de 1 a 40 g/m^2 , y/o
- 30 - en la etapa (II) se aplican una temperatura por debajo del punto de fusión del polímero y una presión de 1 a 500 kPa durante 1 a 30 minutos para obtener un producto comprimido y calentado que tiene una densidad promedio de 200 a 1000 kg/m^3 y un espesor de 0,05 a 10 mm.
17. Un medio de cromatografía funcionalizado obtenible por el proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 35 18. Un proceso para preparar un cartucho de cromatografía, proceso que comprende llevar a cabo el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 e incorporar el producto así obtenido en un cartucho.
19. Un cartucho de cromatografía que (a) es obtenible por el proceso de la reivindicación 18, o (b) que comprende uno o más medios de cromatografía funcionalizados según la reivindicación 17.
- 40 20. Uso de un medio de cromatografía funcionalizado según la reivindicación 17 o un cartucho de cromatografía según la reivindicación 19 en cromatografía.
- 45 21. Un proceso para aislar una o más moléculas biológicas de una fase móvil, proceso que comprende poner en contacto una o más moléculas biológicas en una fase móvil con un medio de cromatografía funcionalizado según la reivindicación 17 o un cartucho de cromatografía según la reivindicación 19.
- 50 22. El proceso según la reivindicación 21 que es un proceso de cromatografía de intercambio iónico, captura por afinidad o interacción hidrófoba.
23. El proceso según la reivindicación 21, en el que la una o más moléculas biológicas son una o más proteínas, polipéptidos, anticuerpos, aminoácidos, virus, ácidos nucleicos, proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, vacunas virales o ADN de plásmido.
- 55

Figura 1



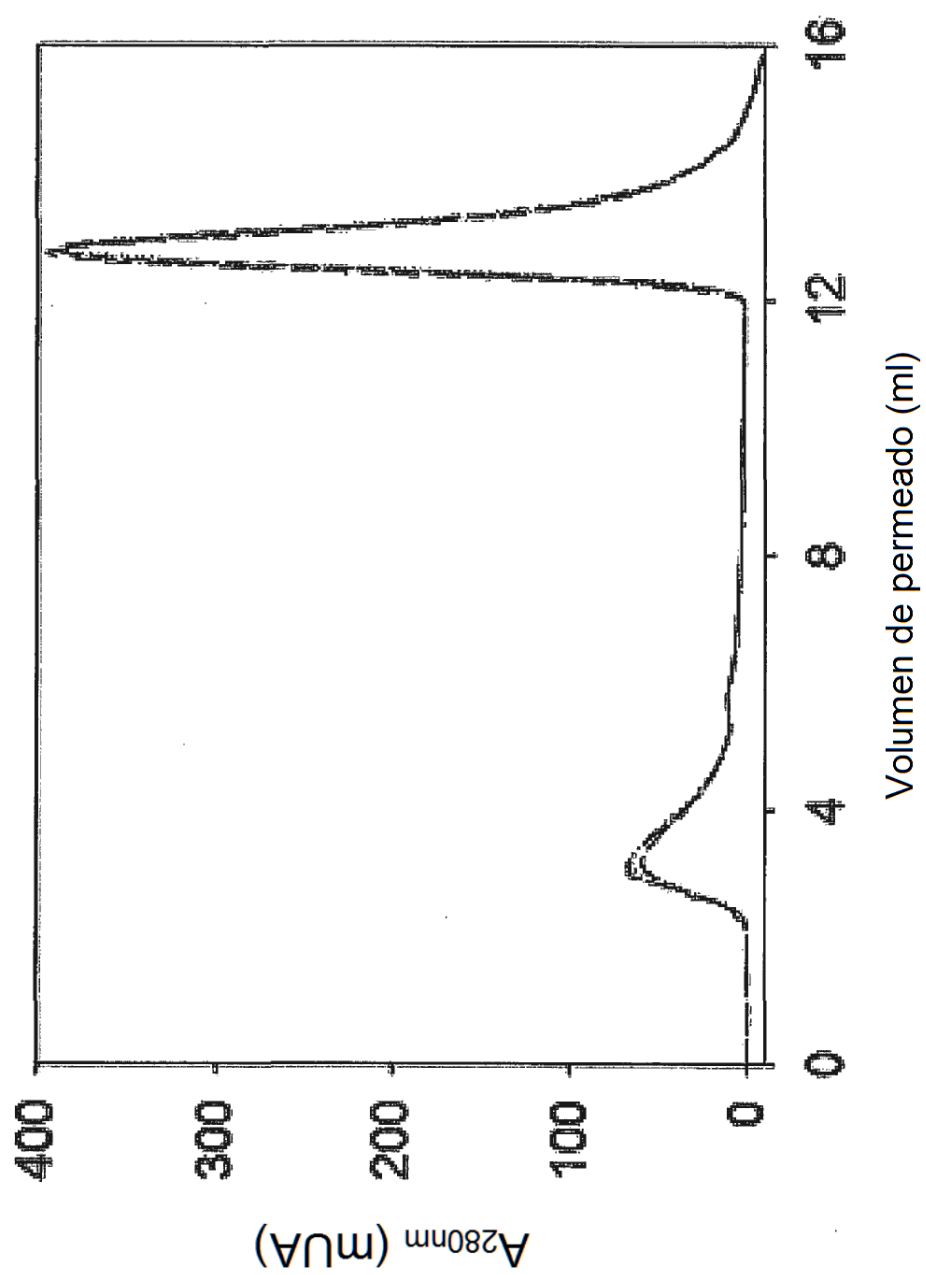


FIGURA 2

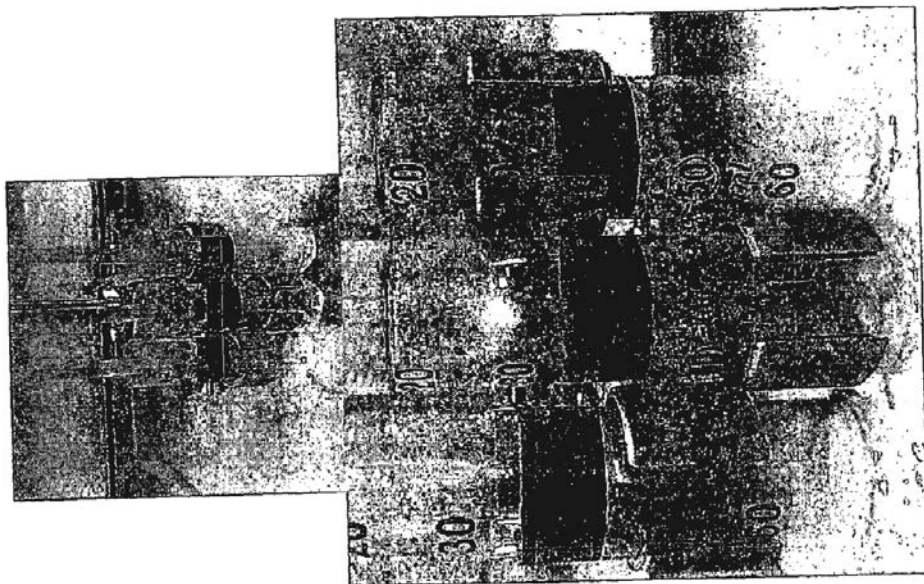
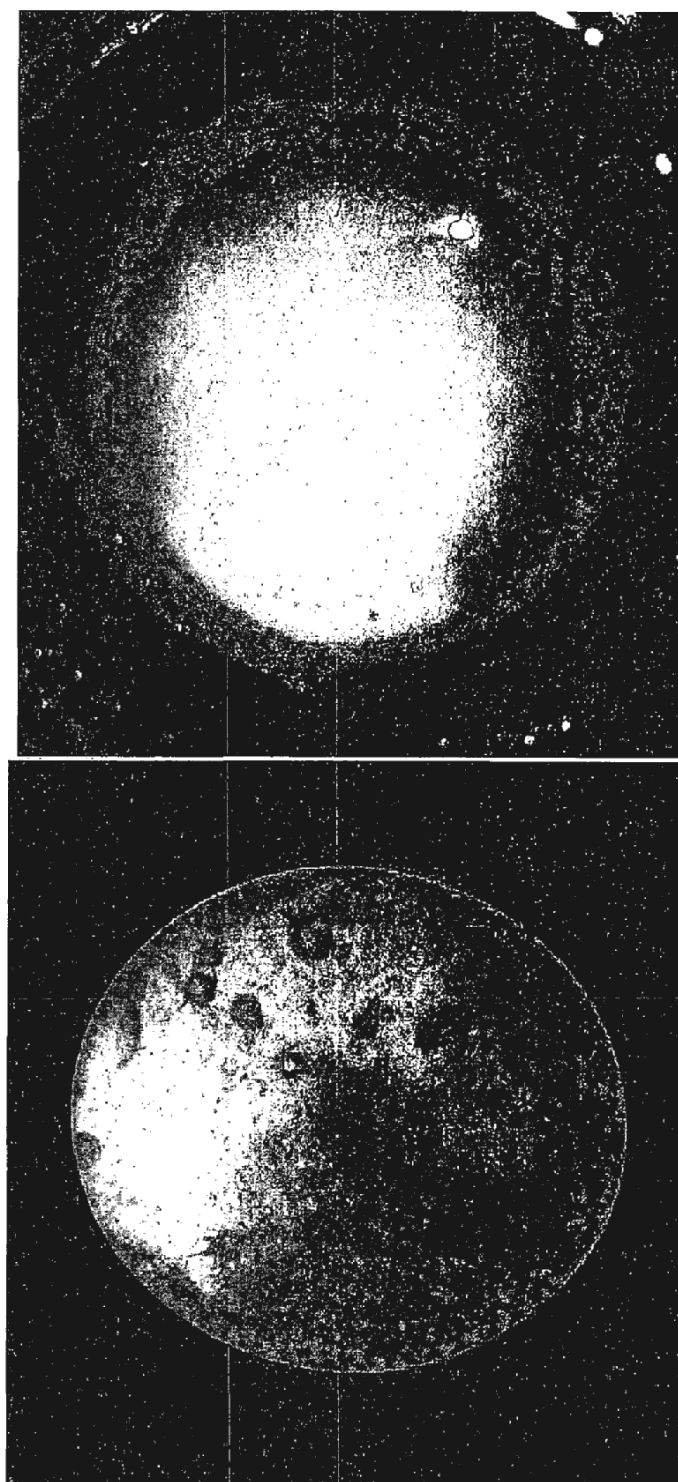


FIGURA 3



Después de 120 horas, "prensa"

Después de 10 minutos, "horno"

FIGURA 4

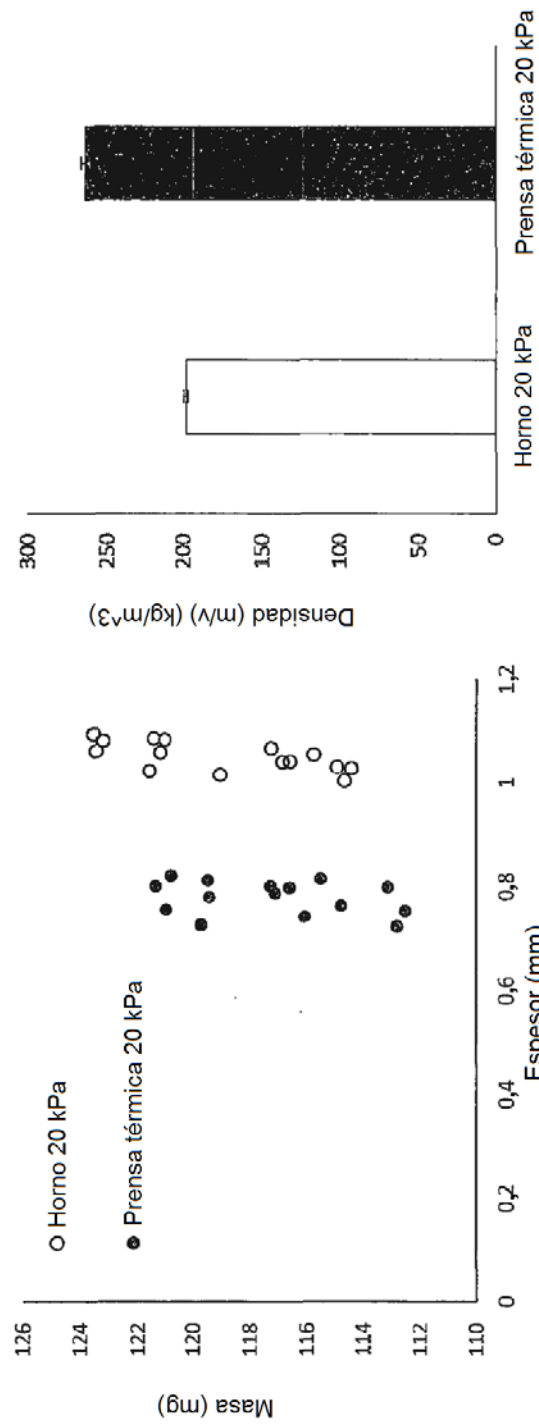


FIGURA 5

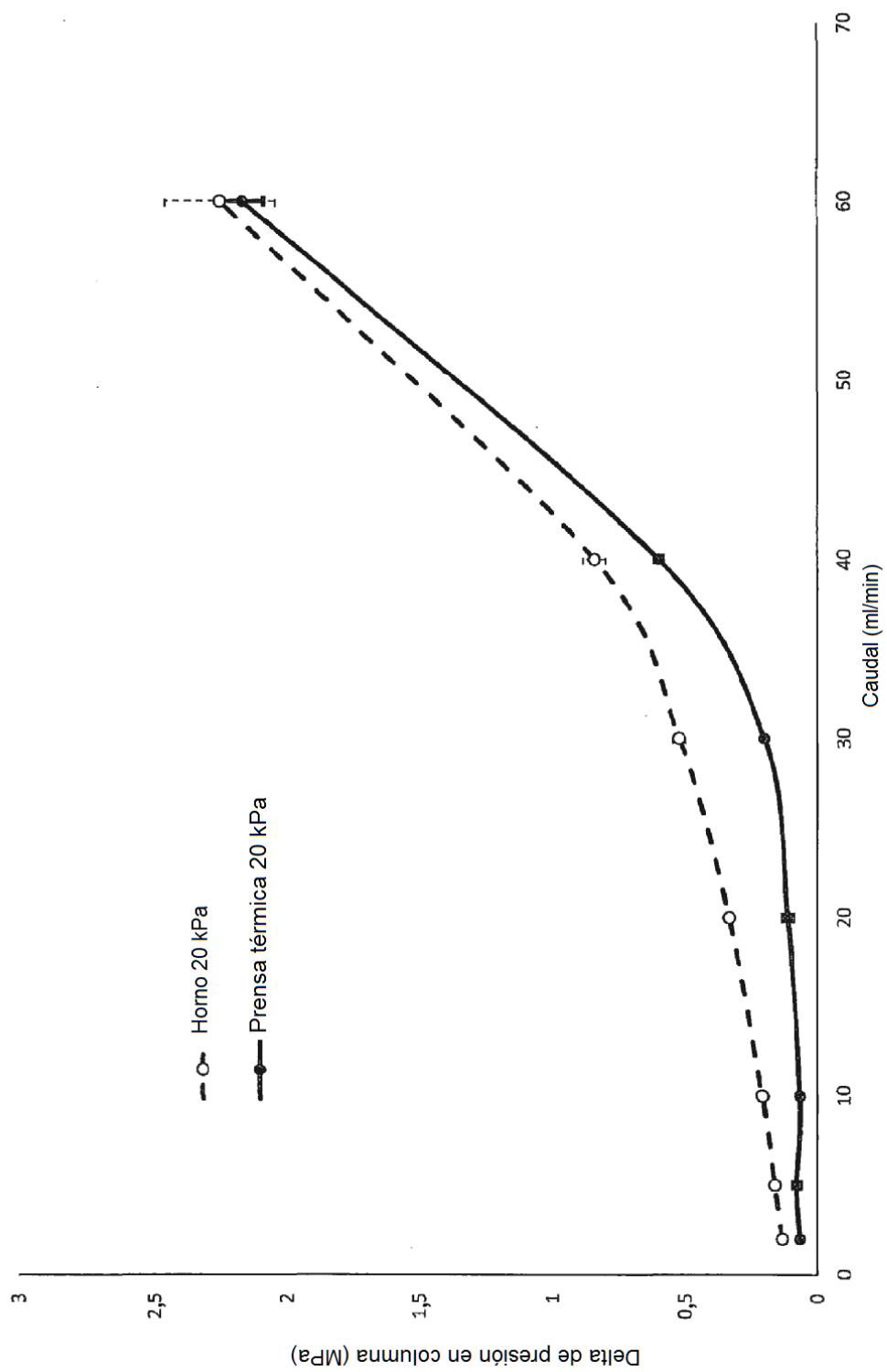


FIGURA 6

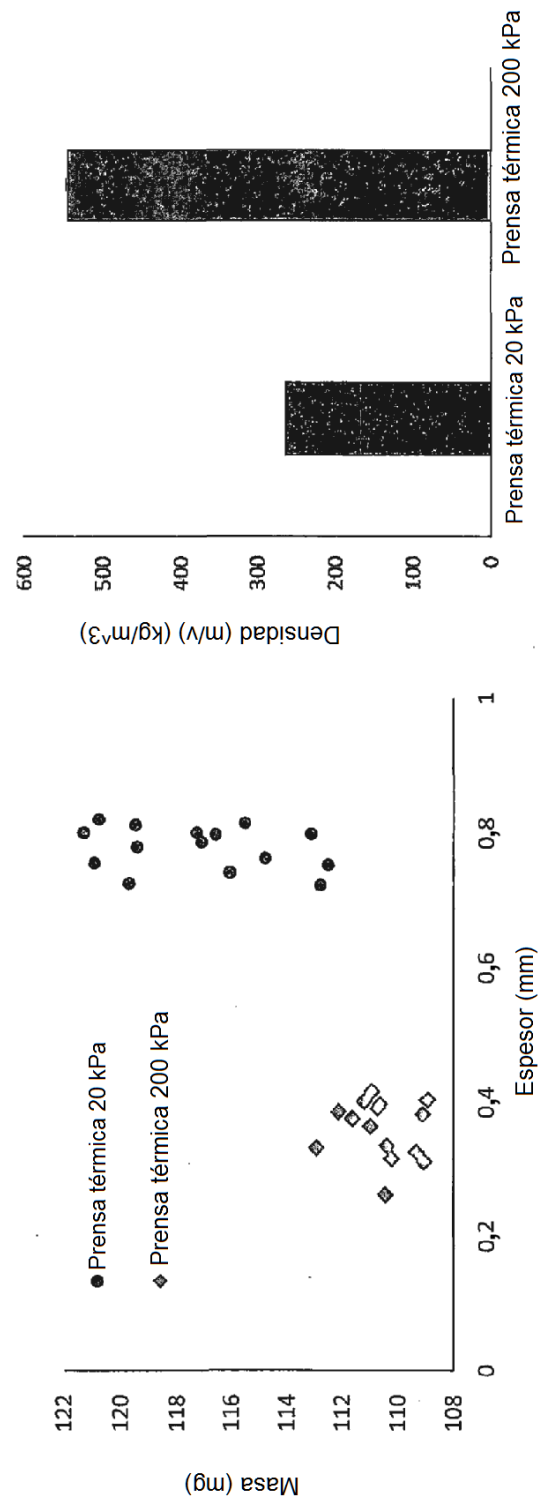


FIGURA 7

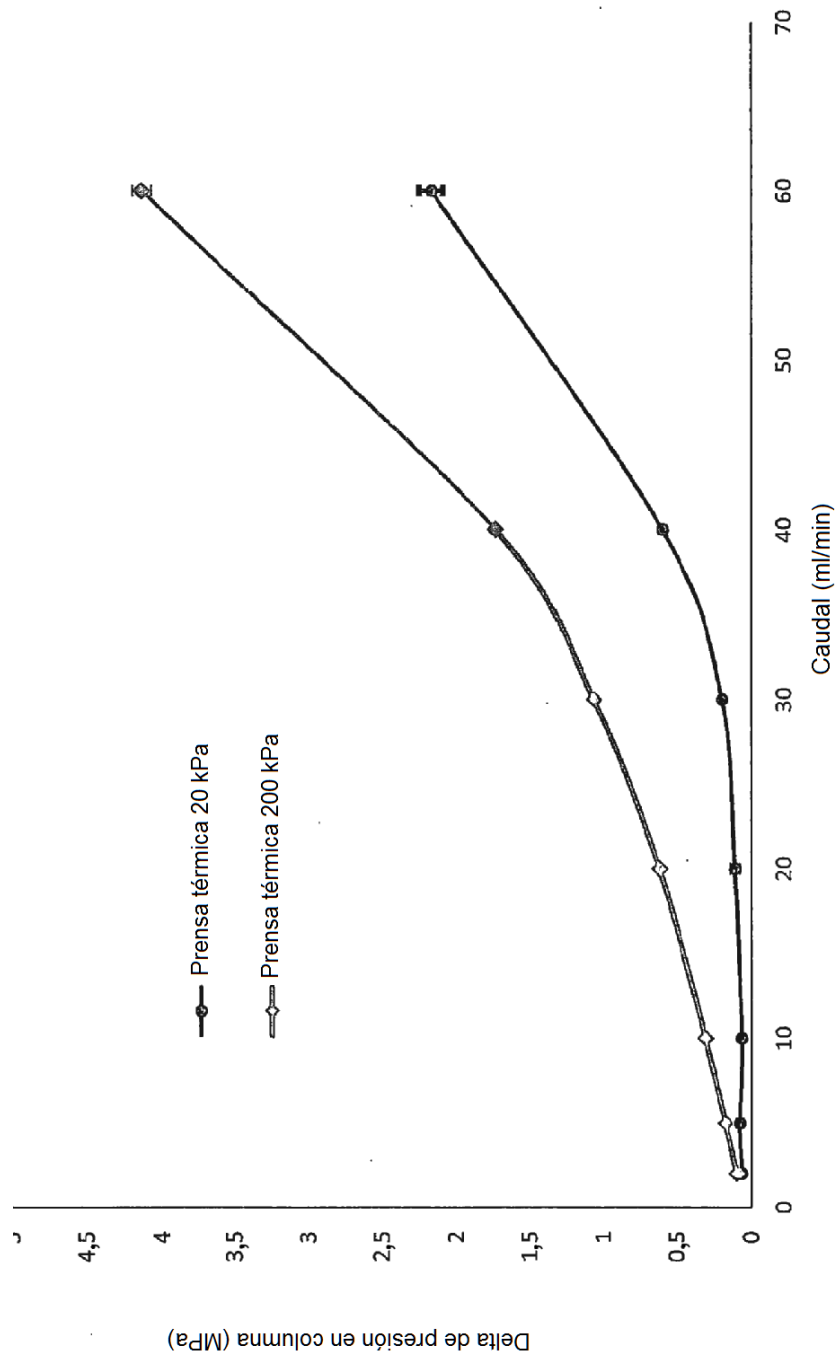


FIGURA 8

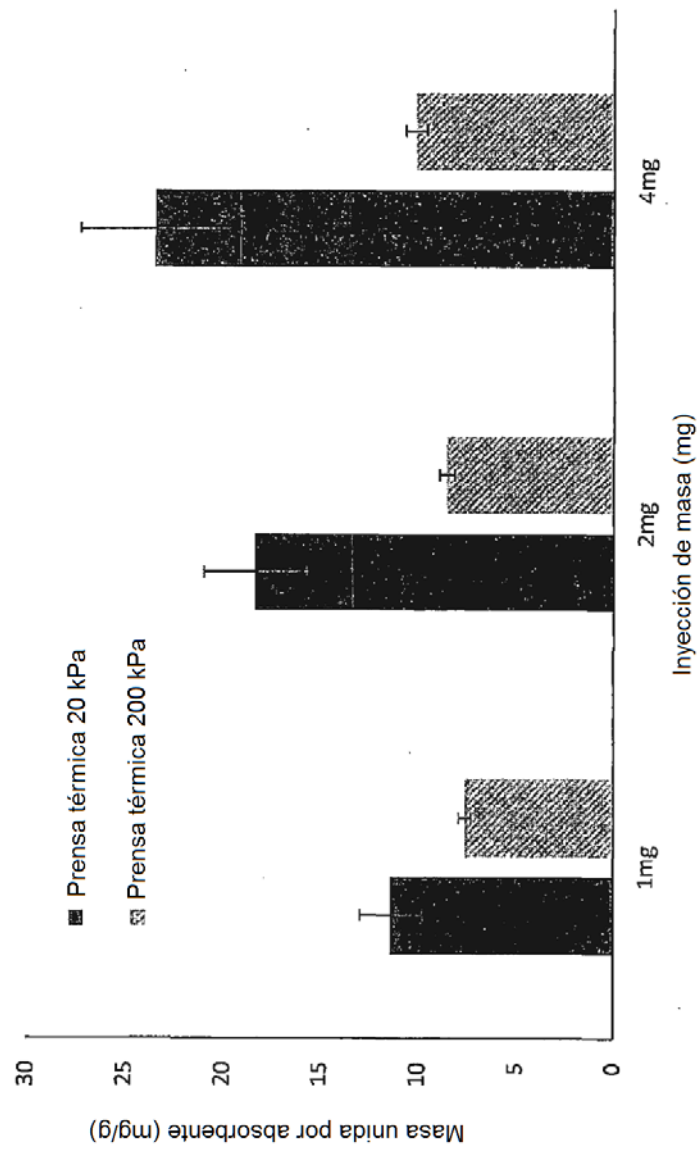


FIGURA 9

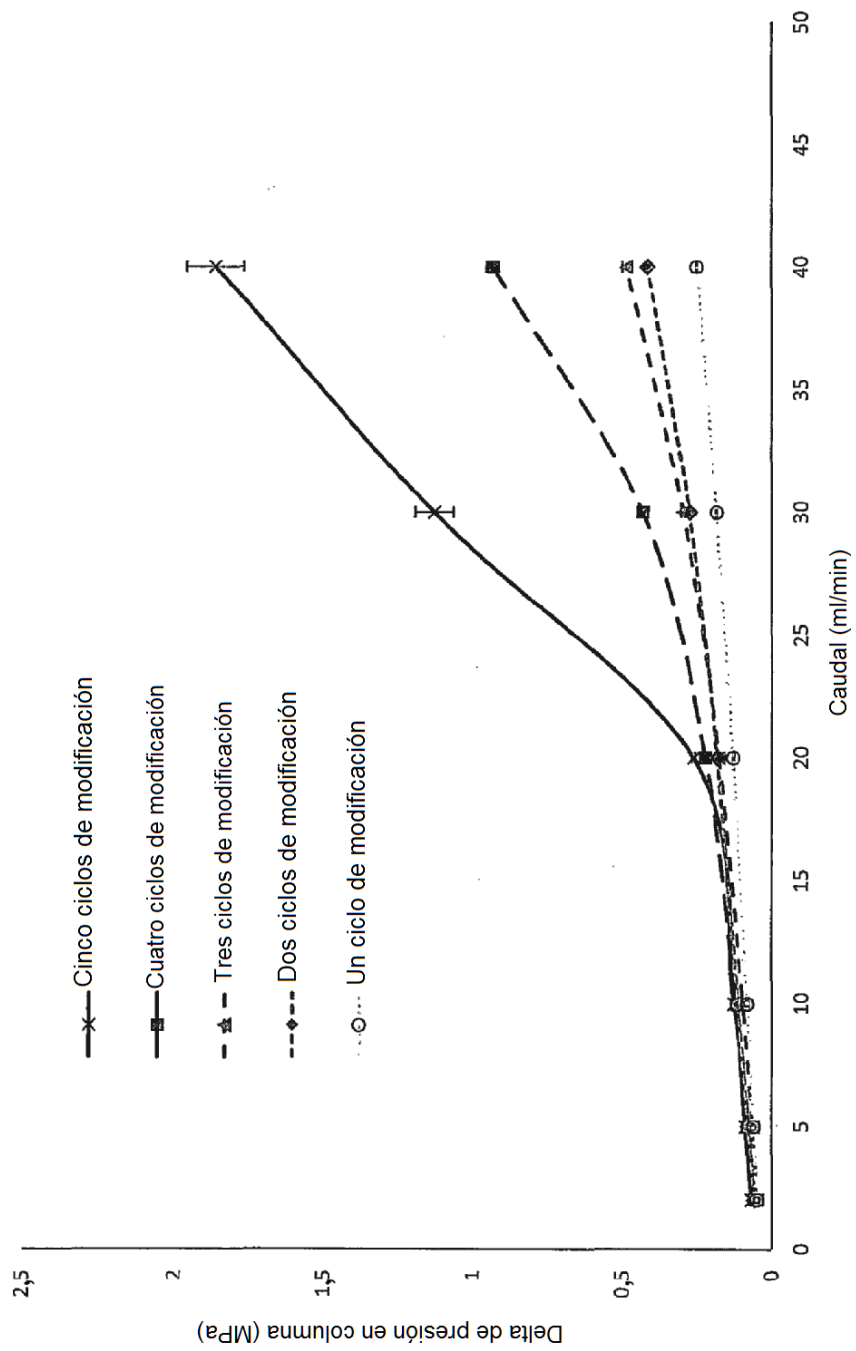


FIGURA 10

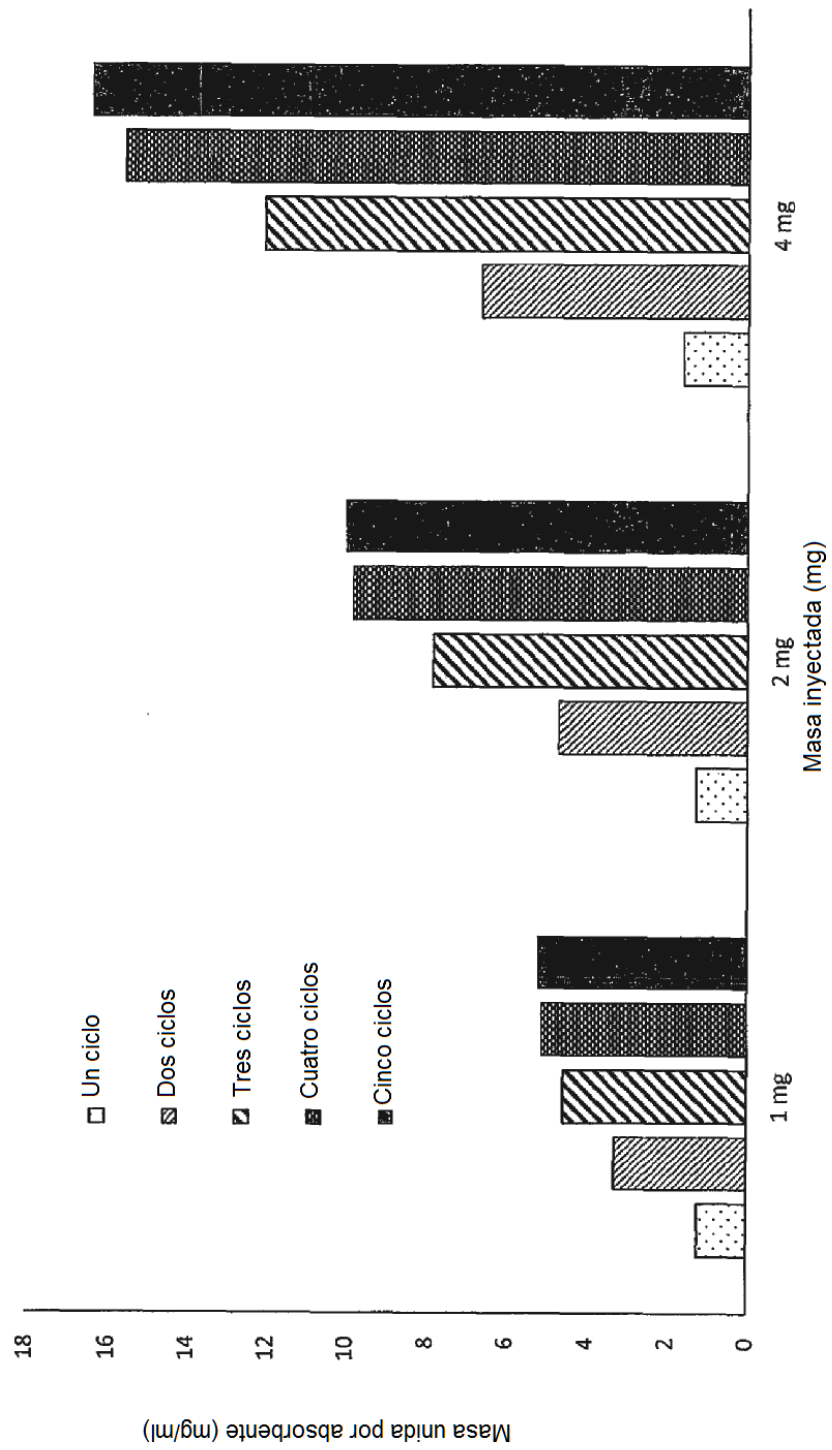


FIGURA 11

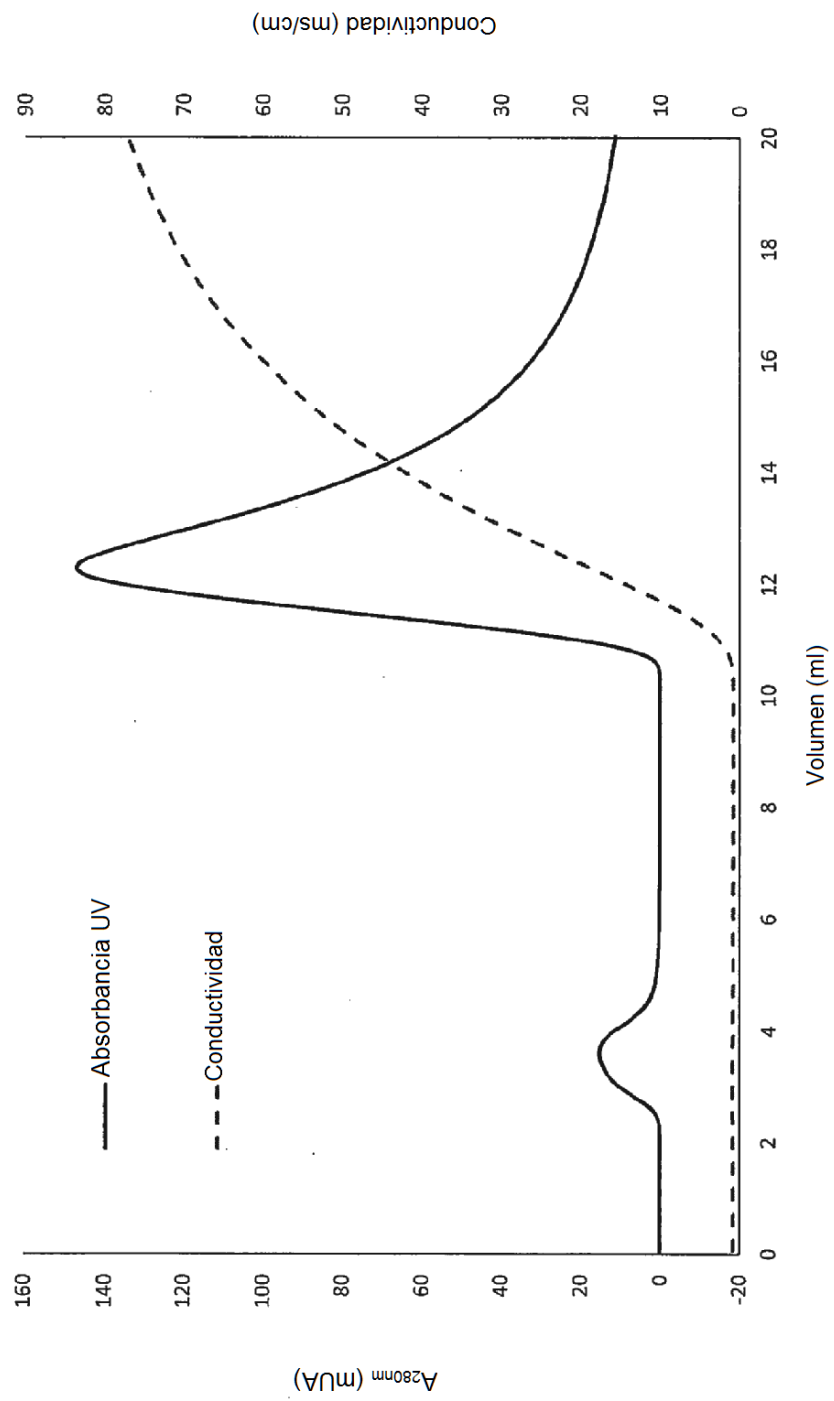


FIGURA 12

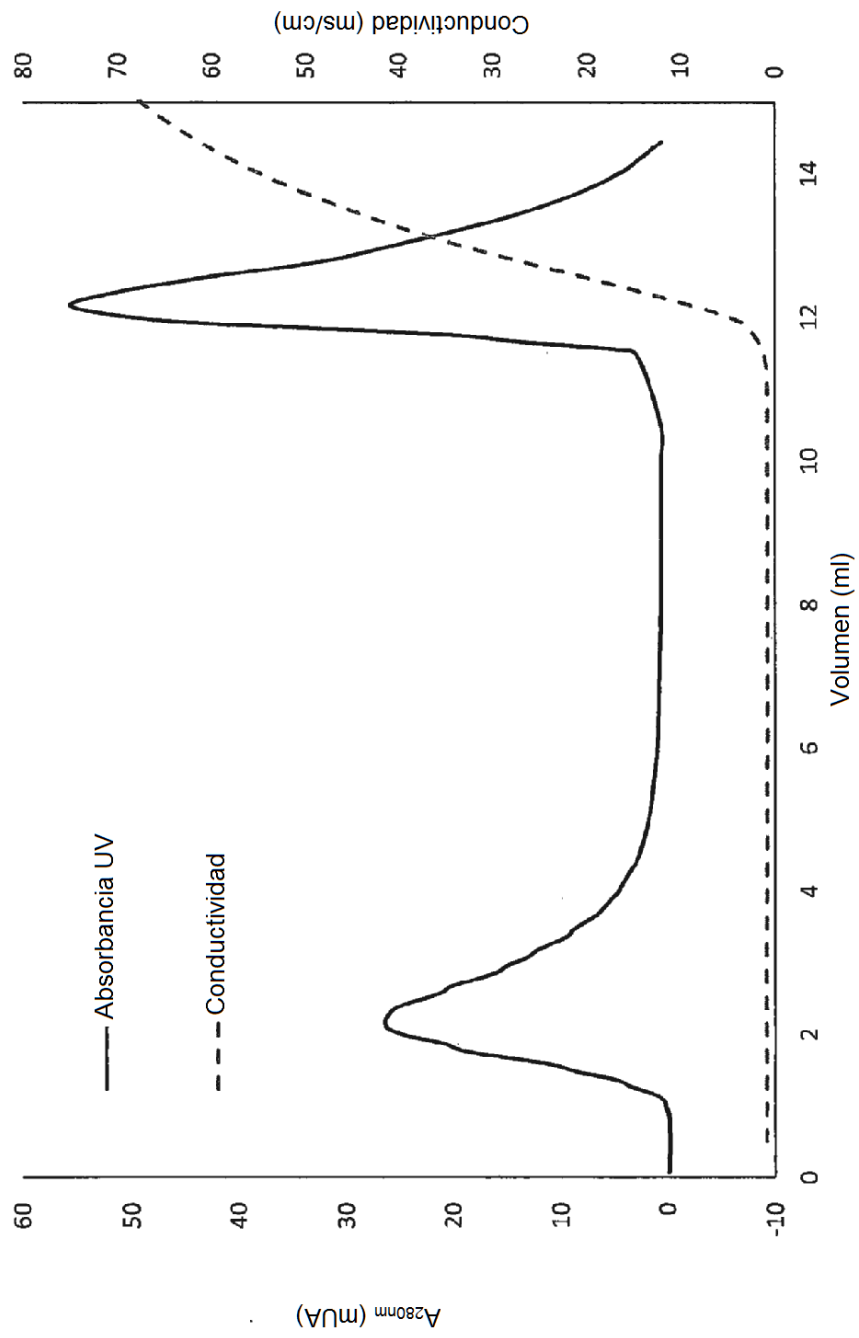


FIGURA 13

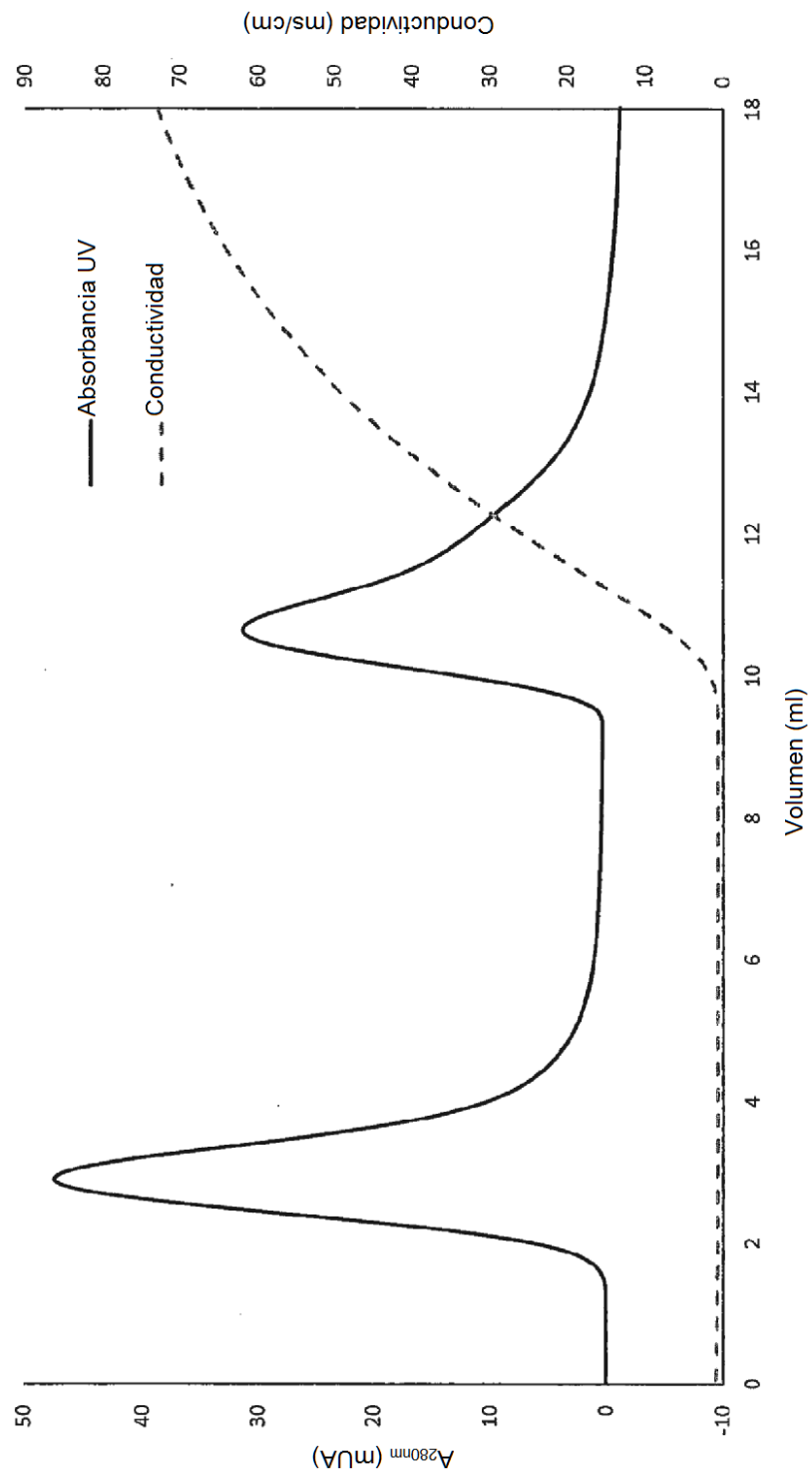


FIGURA 14

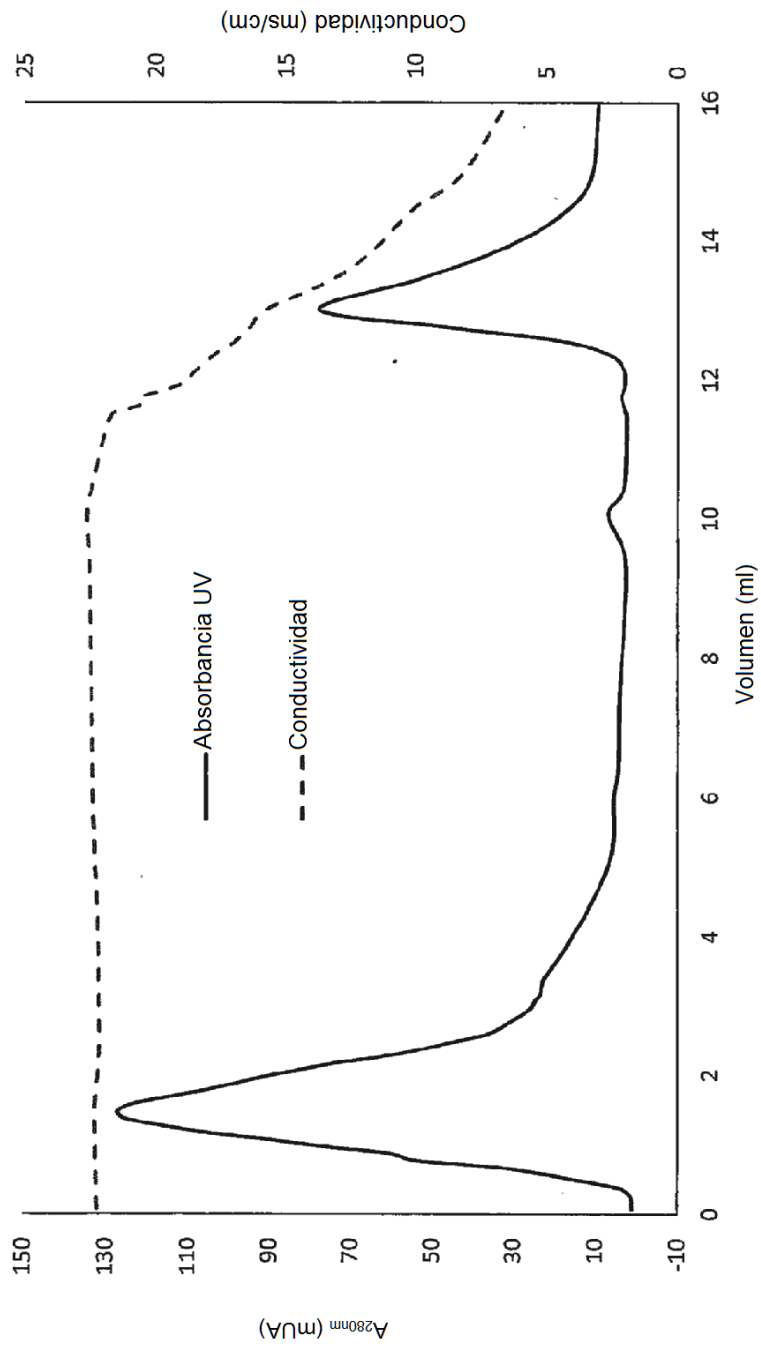


FIGURA 15

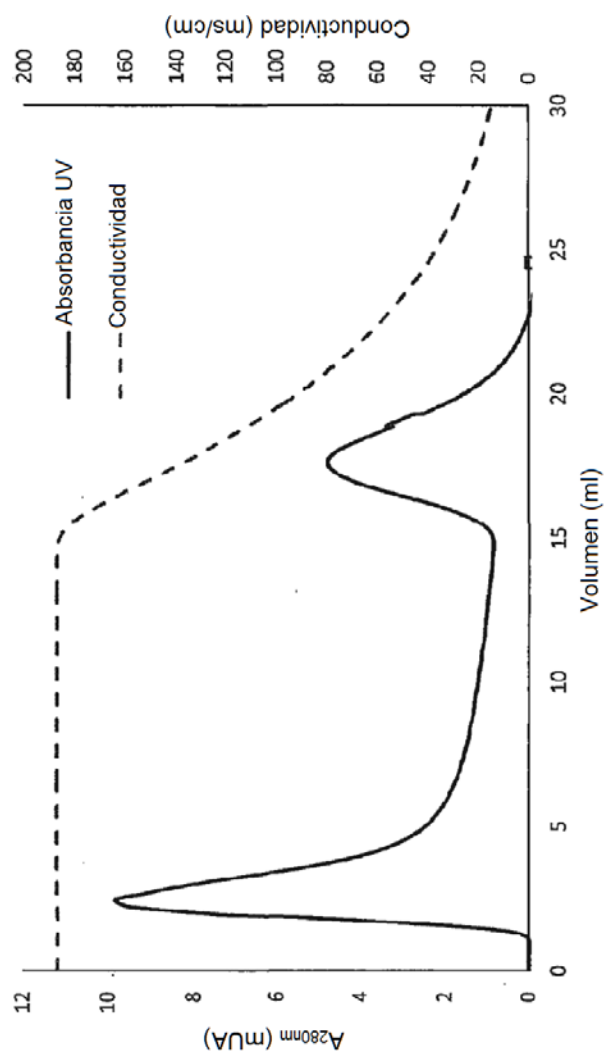


FIGURA 16

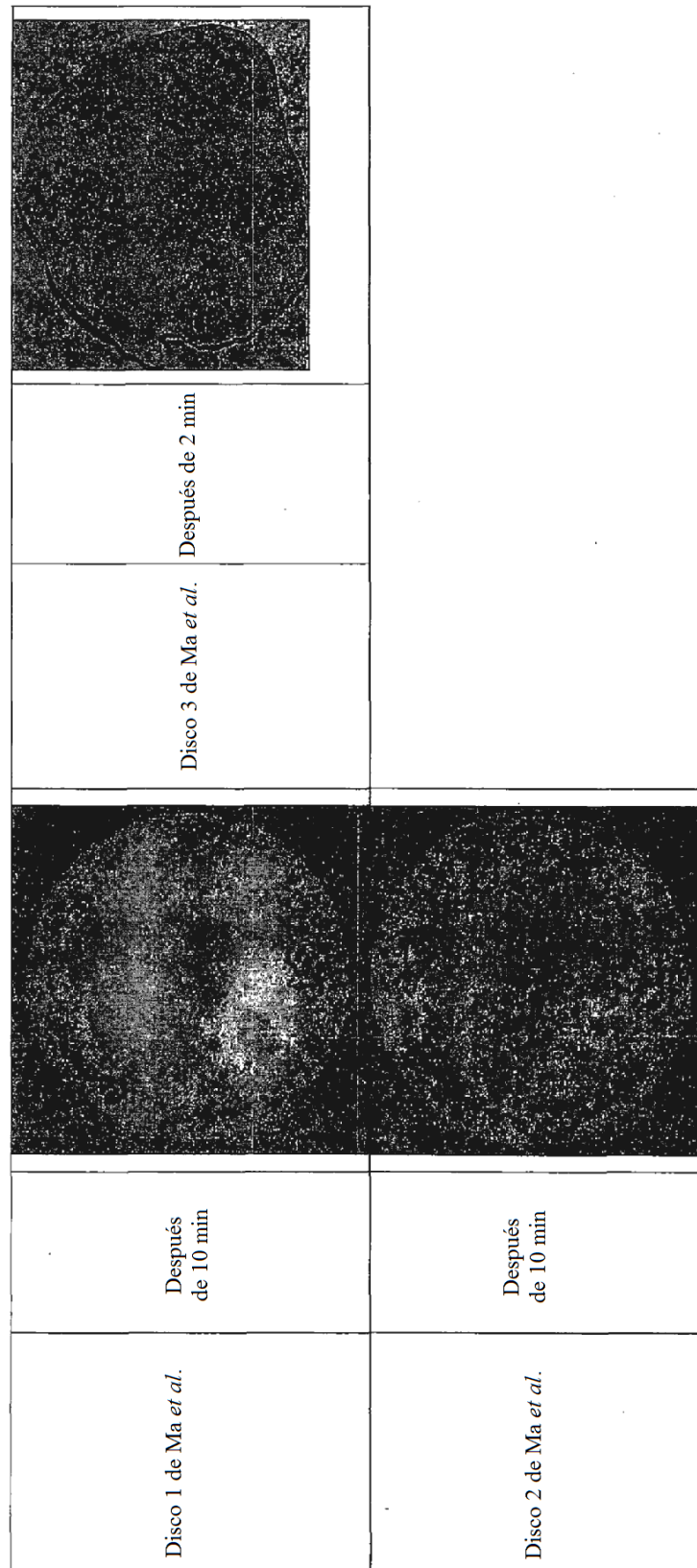


FIGURA 17

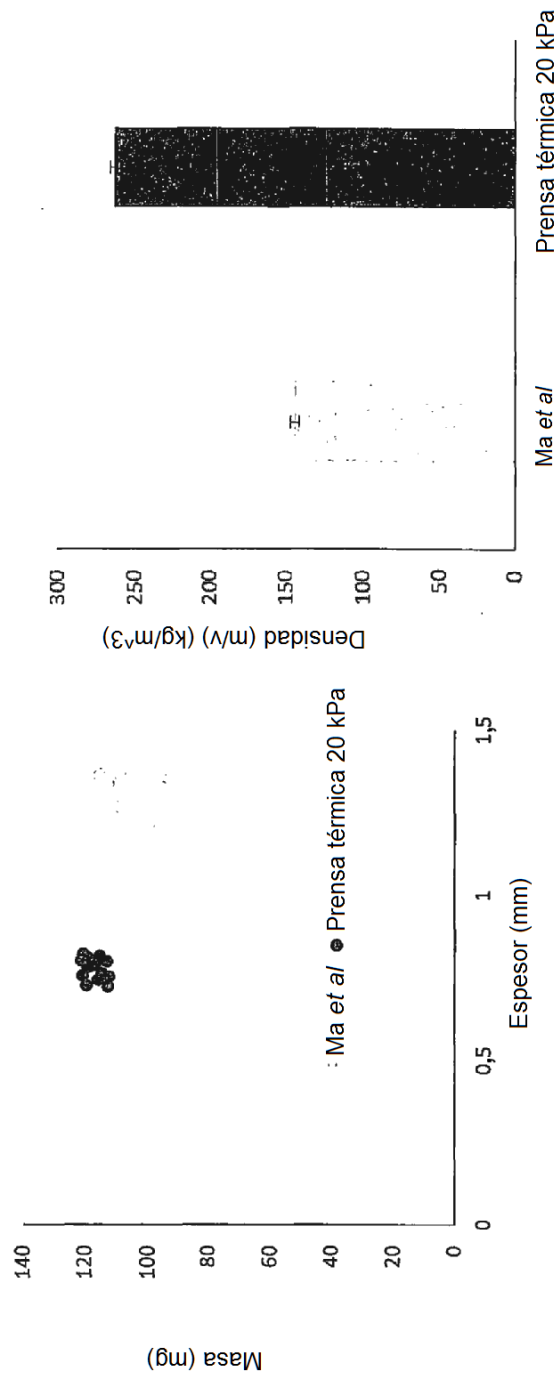


FIGURA 18

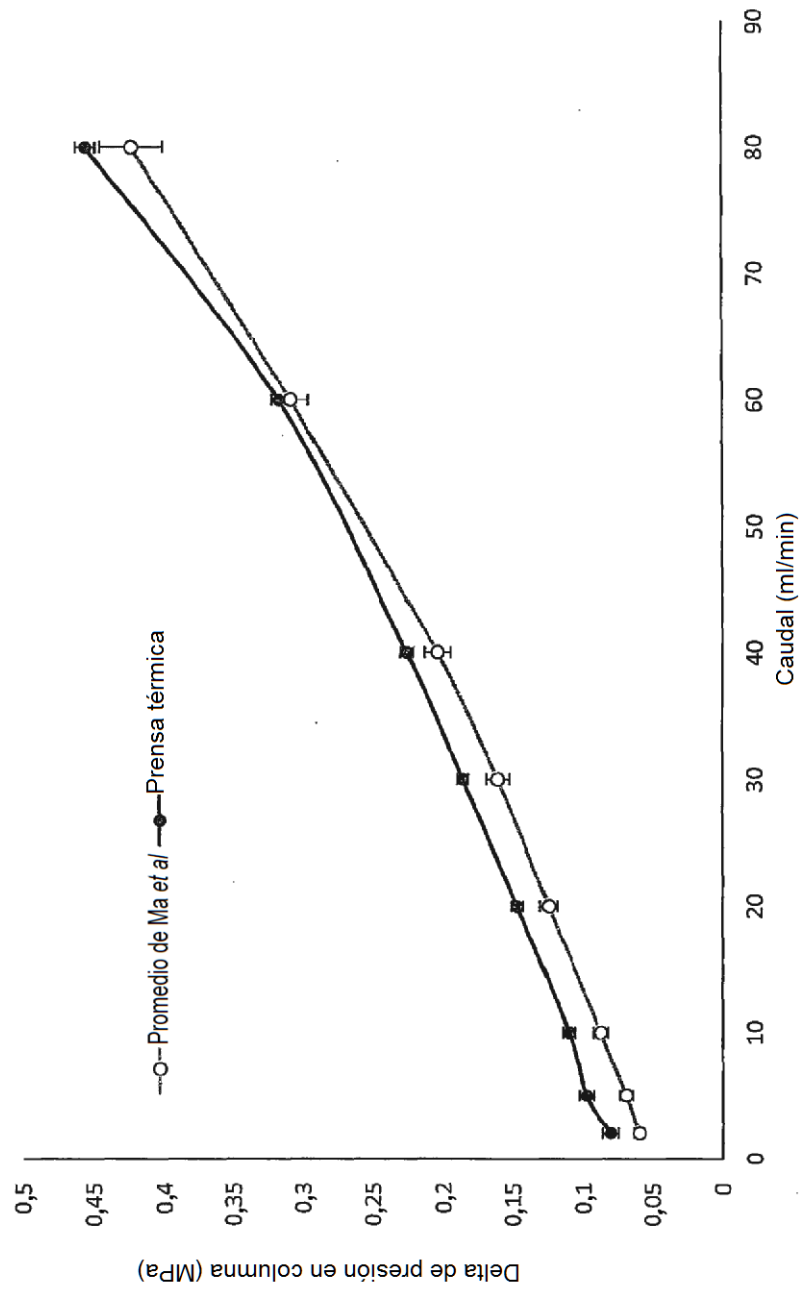


FIGURA 19

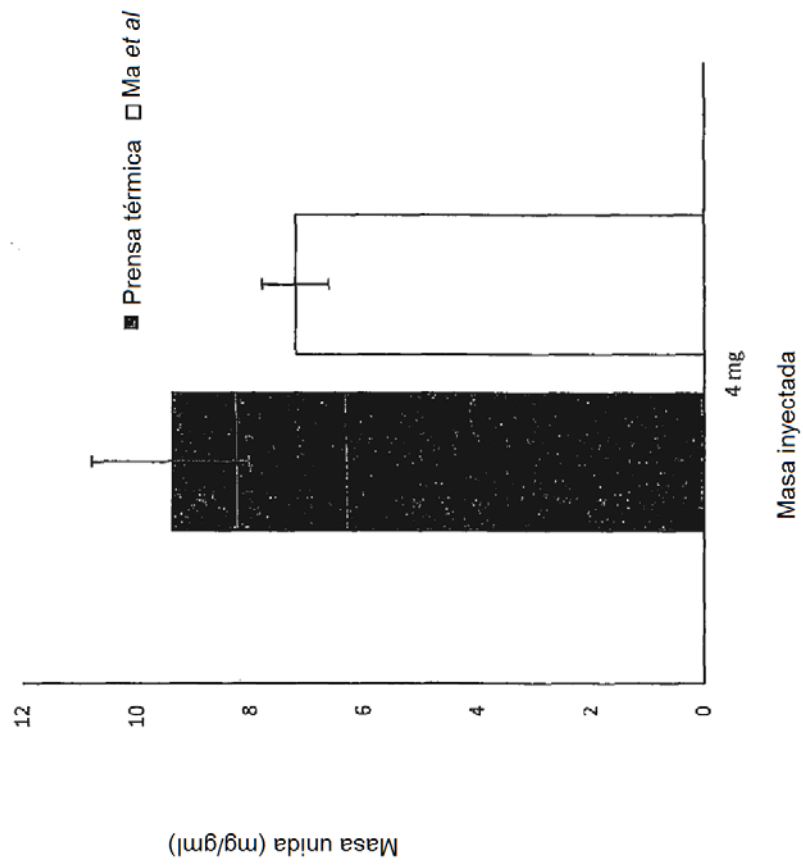


FIGURA 20



FIGURA 21