

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 237**

51 Int. Cl.:

B01D 69/12 (2006.01)

B01D 71/56 (2006.01)

B01D 67/00 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010 PCT/US2010/000578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10098867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10707995 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2401065**

54 Título: **Membrana con grupos sulfónicos para eliminar agregados de proteína**

30 Prioridad:

27.02.2009 US 208784 P

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

28.03.2018

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**KOZLOV, MIKHAIL y
RAUTIO, KEVIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 661 237 T3

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

DESCRIPCIÓN

Membrana con grupos sulfónicos para eliminar agregados de proteína

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona generalmente con medios para eliminar material biológico de soluciones de proteína. Más particularmente, a una membrana de filtración cargada negativamente saturada con una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada, y con métodos de fabricación y uso de la misma.

Antecedentes de la invención

15 La eliminación de agregados de proteína y partículas virales es una tarea de separación frecuentemente encontrada durante el proceso de fabricación de moléculas biológicas terapéuticas a base de proteínas derivadas ya sea de organismos completos o de fuentes de cultivo de células de mamíferos. Por ejemplo, las soluciones de proteínas derivadas de plasma tales como proteínas de inmunoglobulina (IgG) y otras proteínas (naturales o recombinantes) tales como anticuerpos monoclonales (mAb), péptidos, sacáridos y/o ácidos nucleicos típicamente contienen
20 agregados de proteína que comprenden trímeros de proteína o polímeros de proteínas más altos que obstruyen y contaminan filtros de retención viral y similares.

Un problema común en la eliminación de partículas virales de una solución de proteína por filtración es el uso de
25 filtros de ultrafiltración de capacidad relativamente baja que aumentan significativamente el coste y retrasan la operación de filtración. Dado que el tamaño de una partícula viral es solo aproximadamente 3-5 veces mayor que el de una molécula de proteína, es decir, aproximadamente 25 nm frente a aproximadamente 5-10 nm, el tamaño de poro del filtro debe elegirse cuidadosamente para que se encuentre entre los tamaños de estas entidades, por lo general alrededor de 20 nm. Por lo tanto, los agregados de proteínas más grandes que aproximadamente un trímero o polímeros de proteínas más altos, así como las proteínas desnaturalizadas, lípidos, triglicéridos y similares, no
30 podrán pasar a través de un filtro de retención viral típico, causando obstrucción de poros y reduciendo significativamente la capacidad (rendimiento) del filtro. Incluso a bajas concentraciones de 0,01 a 0,1%, estos constituyentes no deseados e indeseables obstruirán rápidamente los filtros de retención de virus.

Sin embargo, la agregación de proteínas sigue siendo un problema creciente en la fabricación de bioprocesos de
35 moléculas biológicas terapéuticas a base de proteínas debido al aumento de los títulos de las soluciones. Los agregados de proteína se forman en diferentes etapas del proceso de purificación, y para mantener el rendimiento adecuado de los filtros de retención de virus, los agregados de proteínas deben eliminarse antes de alcanzar los filtros de retención de virus. Las opciones para eliminar selectivamente agregados de proteína mayores que aproximadamente un trímero o polímeros de proteína superiores a partir de una solución de proteína incluyen la
40 utilización de cromatografía en gel de alto coste o cromatografía de exclusión por tamaño. La forma más conveniente para eliminar selectivamente los agregados de proteína es pasar una solución de proteínas y/u otras biomoléculas a través de un medio de filtración corriente arriba antes de alcanzar el filtro de retención de ultrafiltración de partículas virales localizado corriente abajo, a través del cual los agregados de proteína se retienen selectivamente corriente arriba, permitiendo que monómeros de proteína en la solución de proteína fluyan a través
45 del filtro de retención viral.

Un método para eliminar agregados de proteína y partículas virales de una solución de proteína comprende un
50 proceso de ultrafiltración en dos etapas que usa membranas de ultrafiltración en cada etapa. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6,365,395 a Antoniou, en la que los agregados de proteína se eliminan de una solución de proteína corriente arriba, en una primera etapa de filtración, y las partículas virales se eliminan de la solución de proteína libre de agregados de proteína corriente abajo, en la segunda etapa de filtración.

La patente de los Estados Unidos No. 7,118,675 a Siwak et al. enseña otro proceso de filtración de dos etapas para
55 eliminar agregados de proteína y partículas virales de una corriente de proteína en la que la corriente de proteína se filtra primero a través de una o más capas de filtros de profundidad adsorbentes, membranas porosas cargadas o modificadas superficialmente, o un pequeño lecho de medios cromatográficos para producir una corriente de proteína libre de agregado de proteína. Esto es seguido por una segunda etapa de pasar la solución recuperada a través de una membrana de ultrafiltración para eliminar las partículas virales.

60 El documento de los Estados Unidos US 2009/0029438 A1 se relaciona con geles macroporosos que llenan los poros de un sustrato, que pueden usarse para filtración, adsorción y cromatografía iónica, por ejemplo, el uso para la eliminación de proteínas a través de la ultrafiltración. D1 describe polimerización in situ de 2,50 g (≈10% en peso de solución) de AMPS, 0,372 g (≈15% en peso de AMPS) entrecruzador MBA, fotoiniciador, disuelto en 25 ml de una mezcla de dioxano:H₂O con una proporción de volumen 9:1 en un soporte. La solución se aplica al soporte, que se
65 intercala entre dos hojas y se pasa un rodillo de goma sobre el intercalado para eliminar el exceso de solución. La irradiación UV se usó durante 1 hora a 350 nm.

Un método disponible para el pretratamiento de una corriente de proteína utiliza filtración de profundidad usando medios de celulosa combinados con un coadyuvante de filtración inorgánico. Por ejemplo, Prefiltro Viresolve®, disponible comercialmente de la Corporación Millipore, pretende aumentar el rendimiento de los filtros de parvovirus cuando se usa para pretratar una corriente de proteína antes de la filtración del virus. Sin embargo, este prefiltro ha demostrado una resistencia inadecuada al tratamiento cáustico, así como a los extraíbles orgánicos relativamente altos. Dado que a menudo es deseable limpiar o desinfectar los filtros de virus con una solución cáustica, y cuando un filtro de virus se combina con un prefiltro, el proceso de desinfección se vuelve significativamente más robusto y económico cuando ambos se pueden desinfectar en línea con el mismo tratamiento. Por lo tanto, es deseable proporcionar un medio de pretratamiento para una solución de proteína que pueda resistir la exposición a una solución acuosa cáustica (por ejemplo, NaOH 0,1 N durante 1 hora) sin pérdida de las propiedades de prefiltración.

Además, la filtración de virus se usa típicamente tarde en el proceso de purificación de proteínas donde es deseable minimizar la cantidad de extraíbles orgánicos que entran en la corriente de fluido. Los filtros de profundidad con base en celulosa y adyuvantes de filtración han demostrado niveles significativamente más altos de sustancias extraíbles que las membranas, y por lo tanto pueden presentar un problema potencial para la etapa tardía de purificación de moléculas biológicas y similares.

Por consiguiente, sería deseable proporcionar medios de filtración, y dispositivos y procesos para usar y fabricar los mismos, para eliminar agregados de proteína y otros componentes de obstrucción y contaminación de una solución que contiene proteínas y/o biomoléculas mediante un proceso de prefiltración corriente arriba que evite la obstrucción prematura de los medios de filtración corriente abajo tales como los utilizados junto con la eliminación por ultrafiltración corriente abajo de partículas virales de una solución que contiene proteínas y/o biomoléculas.

RESUMEN DE LA INVENCION

En respuesta a las necesidades anteriores asociadas con la eliminación de agregados de proteína y partículas virales en la fabricación de biomoléculas y moléculas biológicas terapéuticas con base en proteínas derivadas ya sea de organismos completos o de fuentes de cultivos de células de mamíferos, la presente invención proporciona un medio de filtración con carga negativa de acuerdo con la reivindicación 1 y un método para fabricar un medio poroso recubierto entrecruzado polimerizado cargado negativamente de acuerdo con la reivindicación 7. En ciertas realizaciones, un medio de filtración microporoso cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga que es estable a medios cáusticos, es decir, resistente a la degradación por soluciones alcalinas y adecuado para su uso en la eliminación selectiva de agregados de proteína de una solución de proteína corriente arriba de la eliminación por ultrafiltración de partículas virales.

Esta especificación enseña, en ciertas realizaciones, la eliminación corriente arriba de agregados de proteína de una corriente de proteína antes de la filtración viral corriente abajo u otras etapas de bioprocesamiento de la corriente de proteína. La eliminación corriente arriba de los agregados de proteína reduce el contaminación y obstrucción que de otro modo ocurriría a los filtros virales corriente abajo, aumentando así su rendimiento y flujo.

En ciertas realizaciones, esta especificación muestra un medio microporoso de carga negativa desechable para eliminar agregados de proteína de una solución de proteína, eliminando así el coste asociado con la limpieza y almacenamiento del medio filtrante entre usos, así como eliminando el coste y el tiempo asociados con la validación de tales procedimientos de limpieza requeridos por las agencias reguladoras gubernamentales.

En ciertas realizaciones, esta especificación proporciona un medio microporoso recubierto cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga, que comprende un sustrato microporoso y una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada in situ en las superficies exterior e interior del sustrato tras la exposición a un haz de electrones y en ausencia de un iniciador de radicales libres de polimerización química. La composición de recubrimiento entrecruzado se forma preferiblemente a partir de un monómero de acrilamidaalquilo polimerizable por radicales libres cargado negativamente y un agente de entrecruzamiento de acrilamida.

En ciertas realizaciones, esta especificación proporciona un medio microporoso recubierto cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga que comprende un sustrato microporoso y una composición de recubrimiento entrecruzada formada a partir de un monómero de acrilamidaalquilo polifuncional polimerizable que tiene grupos colgantes de ácido sulfónico cargados negativamente y sales del mismo, y un agente de entrecruzamiento de acrilamida polifuncional polimerizado in situ en las superficies exterior e interior del sustrato. Aunque la polimerización se inicia preferiblemente exponiendo el sistema monómero/entrecruzador/medios, a radiación ionizante tal como haz de electrones en ausencia de un iniciador de radicales libres de polimerización química, también se puede emplear un iniciador de radicales libres de polimerización química adecuado para iniciar la polimerización.

En una realización adicional, esta especificación enseña un medio microporoso recubierto cargado negativamente que comprende un sustrato microporoso y una composición de recubrimiento entrecruzada formada a partir de una solución reactiva que comprende un monómero polimerizable de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS) y sales del mismo y un entrecruzador N, N'-metilenobisacrilamida (MBA) polimerizado in situ en las superficies

interna y externa del sustrato. La composición resultante de recubrimiento entrecruzada polimerizada comprende únicamente enlaces de entrecruzamiento amida-amida.

5 En aún otra realización adicional, esta especificación enseña una membrana microporosa recubierta cargada negativamente que comprende un sustrato microporoso y una composición de recubrimiento polimerizada entrecruzada de AMPS y sales del mismo, en la que la composición de recubrimiento entrecruzada se polimeriza in situ en las superficies interna y externa del sustrato.

10 En una realización adicional, esta especificación enseña una membrana microporosa que tiene una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada que cubre por completo las superficies internas y externas del sustrato microporoso, que comprende además un monómero suplementario modificador de la propiedad, que preferiblemente está presente en una cantidad menor que cualquiera del monómero del grupo que contiene ácido sulfónico cargado negativamente o el agente de entrecruzamiento.

15 En otras realizaciones, esta especificación proporciona una membrana microporosa recubierta, adecuada para uso en un dispositivo de prefiltración, para eliminar selectivamente agregados de proteína de una solución de proteína en un proceso de filtración de flujo normal (NFF) sin salida. La solución de proteína se filtra previamente a través de un medio de filtración que incluye una o más capas de una membrana microporosa recubierta como se enseña aquí, para recuperar una solución de proteína sustancialmente libre de agregados de proteína.

20 En aún otras realizaciones, esta especificación proporciona métodos para la preparación de un medio microporoso recubierto cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga, en el que un sustrato microporoso se recubre, se pone en contacto o se satura de otra forma con una composición de recubrimiento entrecruzada que comprende un grupo de ácido sulfónico cargado negativamente que contiene un monómero de acrilamidaalquilo polimerizable, un agente de entrecruzamiento de acrilamida y opcionalmente, un iniciador químico de radicales libres, depositado sobre la totalidad de las superficies interiores y exteriores del sustrato microporoso.

25 En aún otras realizaciones, esta especificación proporciona métodos para la preparación de un medio microporoso recubierto negativamente que tiene una alta densidad de carga, en el que un sustrato microporoso se recubre con una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada que comprende monómeros polimerizables de AMPS y sales de los mismos, y un agente de entrecruzamiento de acrilamida, tal como MBAm sobre la totalidad de las superficies externa e interna del sustrato microporoso, de manera que la composición de recubrimiento entrecruzada se polimeriza in situ sobre la totalidad de las superficies interna y externa del sustrato microporoso.

30 En otra realización, esta especificación proporciona un método para la preparación de un sustrato microporoso recubierto con una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada que comprende las etapas de: a) proporcionar un sustrato microporoso; b) lavar opcionalmente el sustrato microporoso con un líquido humectante para humedecer toda la superficie interna y externa del sustrato; c) lavar opcionalmente las superficies húmedas del sustrato microporoso con un segundo líquido humectante para reemplazar el primer líquido humectante, dejando las superficies externa e interna del sustrato humectadas con el segundo líquido; d) poner en contacto el sustrato con una solución reactiva que comprende monómeros de acrilamidaalquilo polimerizables cargados negativamente, un agente de entrecruzamiento de acrilamida tal como MBAm, y opcionalmente un iniciador de polimerización de radicales libres; e) depositar la composición de recubrimiento de monómeros de acrilamidaalquilo entrecruzados cargados negativamente sobre las superficies interna y externa del sustrato; f) eliminar el sustrato recubierto saturado con la composición de recubrimiento entrecruzada de la solución reactiva; g) polimerizar la composición de recubrimiento de acrilamidaalquilo entrecruzado formando una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada sobre la totalidad de las superficies interna y externa del sustrato; h) enjuagar el sustrato microporoso recubierto en agua y/o disolvente orgánico para eliminar cualquier material oligomérico y sin reaccionar; y i) secar el sustrato microporoso recubierto.

35 En aún otra realización, esta especificación proporciona la separación selectiva de agregados de proteína y partículas virales de una solución de proteína mediante un proceso de filtración en dos etapas que comprende primero filtrar, bajo modo de filtración de flujo normal, una solución de proteína a través de un dispositivo de prefiltración que tiene una o más capas de la membrana microporosa recubierta como se enseña aquí, recuperando luego la solución de proteína sustancialmente libre de agregado de proteína. La segunda etapa de filtración comprende filtrar, bajo NFF o modo de filtración de flujo tangencial (TFF), la solución de proteína recuperada a través de una o más membranas de eliminación viral de ultrafiltración para retener las partículas virales y permitir el paso de la solución de proteína libre de partículas virales a través del mismo.

40 En otras realizaciones, esta especificación proporciona una membrana microporosa recubierta cargada negativamente adecuada para uso en un dispositivo de prefiltración que usa un proceso de NFF sin salida para eliminar selectivamente agregados de proteína y otros constituyentes de contaminación y obstrucción de una solución acuosa de proteínas.

En otras realizaciones, esta especificación proporciona un proceso de prefiltración que usa un dispositivo de prefiltración que incluye una o más membranas desechables recubiertas microporosas como se enseña aquí, para eliminar selectivamente agregados de proteínas de una solución biológica mediante el uso del proceso NFF.

5 En aún otra realización, esta especificación proporciona un proceso para eliminar selectivamente agregados de proteína de una solución acuosa que contiene biomoléculas antes de la eliminación de partículas virales, que comprende filtrar la solución acuosa que contiene biomoléculas a través de una o más membranas microporosas rerecubiertas como se enseña aquí, bajo modo de operación NFF y recuperar la solución que contiene biomoléculas sustancialmente libres de agregados de proteína.

10 Es otro objeto de esta especificación proporcionar un proceso para eliminar selectivamente agregados de proteínas, proteínas desnaturalizadas, lípidos, triglicéridos y similares, a partir de una solución acuosa que contiene biomoléculas antes de la eliminación corriente abajo de partículas virales, que comprende filtrar la solución acuosa de biomoléculas a través de uno o más membranas de prefiltración recubiertas microporosas como enseña aquí, bajo un modo de operación NFF, y recuperar la solución acuosa que contiene biomoléculas sustancialmente libre de agregados de proteína, proteínas desnaturalizadas, lípidos, triglicéridos y similares.

15 En otra realización, esta especificación proporciona un proceso para eliminar selectivamente agregados de proteína de una solución de proteína usando una o más membranas microporosas recubiertas cargadas negativamente como se enseña aquí en un modo de operación NFF.

20 En aún otras realizaciones, esta especificación proporciona un proceso para eliminar selectivamente agregados de proteína de una proteína una solución usando una o más membranas microporosas recubiertas cargada negativamente como se enseña aquí, en un modo NFF, seguido de la eliminación de partículas virales por modo NFF o TFF a través de una o más membranas de eliminación viral de ultrafiltración.

25 Esta especificación proporciona además un proceso para tratar un fluido biológico que contiene biomoléculas positivamente cargadas, que comprende poner en contacto el fluido biológico con una membrana microporosa recubierta cargada negativamente tal como se enseña aquí.

30 Esta especificación proporciona además un dispositivo de filtro, un dispositivo de cromatografía y/o un módulo de membrana que comprende uno o más sustratos microporosos recubiertos cargados negativamente que tienen una alta densidad de carga tal como se enseña aquí.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una primera realización del proceso de esta invención;

40 La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra otra realización del proceso de esta invención;

La figura 3 representa gráficamente la medición del desempeño de rendimiento de una combinación de prefiltro/filtro, de acuerdo con otra realización, utilizando una solución de exposición de SeraCare IgG con choque térmico (punto isoeléctrico de aproximadamente 6-9) a una presión operativa de 30 psig en un intervalo de diferentes condiciones de conductividad y pH de la solución;

45 La figura 4 representa un análisis de SDS-PAGE de material proteico enlazado a un prefiltro de membrana, de acuerdo con otra realización, durante pruebas de rendimiento y eluido con solución de NaCl 1M;

50 La figura 5 representa un análisis de SDS-PAGE de material proteico que se enlazó a un prefiltro de membrana de acuerdo con otra realización, durante pruebas de rendimiento y se eluyó con agua desionizada;

55 La figura 6 muestra gráficamente el peso molecular de proteína eluida cuantificada con SEC, en donde no se detectó proteína en las muestras de elución de agua, y se encontró una cantidad significativa de especies de alto peso molecular (HMW) en el material de elución de sal, en el que la cantidad de especies de HMW está por debajo del nivel de detección en la solución de alimentación, mientras que el 23% de las especies de HMW se eluye de una membrana de prefiltro de acuerdo con otra realización, lo que indica enlace preferencial de los agregados;

La figura 7 representa esquemáticamente el modo de la eliminación del virus de prefiltración desacoplado; y

60 La figura 8 representa esquemáticamente el modo de eliminación de virus de prefiltración por siembra en cruz (acoplado).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 Antes de describir la presente invención en más detalle, se definirán varios términos.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan de la manera más precisa posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

5 Tal como se usa aquí, "AMPS" se refiere al ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo.

10 Como se usa aquí, los términos "biomolécula" o "molécula biológica" pretenden significar cualquier molécula orgánica que sea parte de un organismo vivo, o análogos de la misma. Por lo tanto, las biomoléculas incluyen, pero no se limitan a, polímeros de aminoácidos, por ejemplo, péptidos y proteínas (que incluyen anticuerpos y enzimas) y polímeros de nucleótidos tales como moléculas de ADN o ARN y sondas de ADN y ARN. También se incluyen dentro de la definición de biomoléculas los carbohidratos y los lípidos. Se pretende que los análogos sintéticamente producidos de cada uno de los anteriores se incluyan en la definición del término "biomolécula".

15 Como se usa aquí en conexión con los sustratos de membrana y los métodos de la presente invención, el término "membrana limpia" significa una membrana o sustrato de membrana que, cuando se produce, tiene cualquiera de:

a. menos de aproximadamente 50 microgramos de materia extraíble por centímetro cuadrado de membrana, y preferiblemente menos de aproximadamente 25 microgramos de materia extraíble por centímetro cuadrado, como se determina mediante la prueba de extracción de NVR descrita aquí; o

b. menos de aproximadamente 25 microgramos de materia extraíble por centímetro cuadrado de membrana como se determina mediante la prueba de TOC extraíbles descrito aquí.

25 Como se usa aquí, el término "resistente cáustico" o "cáustico estable" aplicado a las membranas microporosas recubiertas de la invención significa una membrana que no tiene cambio medible de características de permeabilidad o adsorción después de la exposición a 0,1 NaOH durante dos horas a temperatura ambiente.

30 Como se usa aquí, el término "polímero entrecruzado" significa un polímero hecho a partir de dos o más monómeros que tiene dos o más sitios reactivos que pueden tomar parte en una reacción de polimerización, o puede entrecruzar cadenas de polímero separadas.

Como se usa aquí, "MBAm" se refiere a N, N'-metilenobisacrilamida.

35 Como se usa aquí, "NFF" se refiere a la filtración de flujo normal.

El término "polímero" como se usa aquí pretende incluir composiciones poliméricas formadas a partir de uno o más monómeros polimerizables.

40 Como se usa aquí, el término "monómero polifuncional" significa monómeros que tienen más de un grupo funcional insaturado.

45 Como se usa aquí, el término "solución reactiva" significa una solución que comprende al menos un monómero polimerizable polifuncional que tiene uno o más grupos que contienen ácido sulfónico cargado negativamente y sales del mismo, y un agente de entrecruzamiento de acrilamida polifuncional. Un ejemplo de una realización preferida de la solución reactiva es una solución acuosa que comprende monómeros polimerizables de AMPS y sales de los mismos, y un agente de entrecruzamiento MBAm.

50 Como se usa aquí, el término "superficie" como se aplica a los recubrimientos superficiales de las membranas y métodos de la invención significará toda el área superficial de un medio o membrana microporosa, incluyendo superficies externas o exteriores y superficies internas o interiores de los medios o membrana microporosa. Los términos "superficie externa" o "superficie exterior" significan una superficie que está expuesta a la vista, por ejemplo, cualquiera de las superficies planas o microporosas de una membrana. El término "superficie interna" o "superficie interior" pretende indicar la superficie interna de una red microporosa, es decir, el área intersticial, de un medio o membrana microporosa.

55 Como se usa aquí, "TFF" se refiere a la filtración de flujo tangencial.

Sustratos microporosos

60 Con respecto a la presente invención, definiremos sustratos de ultrafiltración en comparación con sustratos de membranas con base en las definiciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), "Terminology for membranes and membrane processes", publicada en Pure Appl. Chem., 1996, 68, 1479, como sigue:

65

microfiltración: proceso de separación a base de membrana impulsado por presión en el que se rechazan partículas y macromoléculas disueltas de más de 0,1 μm ; y

5 ultrafiltración: proceso de separación a base de membrana impulsado por presión en el que se rechazan partículas y macromoléculas disueltas menores de 0,1 μm y mayores que aproximadamente 2 nm.

Como se usa aquí, los términos "microfiltración" o "microporoso" cuando se usan en conexión con una membrana, sustrato, filtro o medio pueden estar en cualquiera de varias formas, que incluyen, pero no se limitan a láminas, tubos y fibras huecas.

10 Como se usa aquí, el término "ultrafiltración" cuando se usa en conexión con una membrana, sustrato, filtro o medio puede estar en cualquiera de varias formas, que incluyen, pero no se limitan a láminas, tubos y fibras huecas.

15 Las membranas porosas útiles en la práctica de la presente invención se clasifican como simétricas o asimétricas, refiriéndose a la uniformidad de los tamaños de poro a través del espesor de la membrana, o, para una fibra hueca, a través de la pared microporosa de la fibra. Como se usa aquí, el término "membrana simétrica" significa una membrana que tiene un tamaño de poro sustancialmente uniforme a través de la sección transversal de la membrana. El término "membrana asimétrica" significa una membrana en la que el tamaño medio de poro no es constante a través de la sección transversal de la membrana.

20 Por ejemplo, en membranas asimétricas, los tamaños de poro pueden variar suavemente o discontinuamente en función de la ubicación a través de la sección transversal de la membrana. Como se apreciará, dentro de la definición de "membranas asimétricas" se incluyen membranas que tienen una proporción de tamaños de poro en una superficie externa a aquellas en la superficie externa opuesta que son sustancialmente mayores que uno.

25 Membranas representativas para uso en la presente invención enseñadas aquí incluyen aquellas formadas a partir de membranas microporosas o sustratos que están cargados negativamente, y que pueden tener una química superficial (tal como hidrofiliidad o hidrofobicidad), tal como se enseña en las patentes de los Estados Unidos números 5,629,084 a Moya y 4,618,533 a Steuck. Una amplia variedad de sustratos microporosos hechos de una amplia variedad de materiales son útiles en la práctica de la presente invención. Los ejemplos de tales sustratos microporosos incluyen polisacáridos, tela no tejida, cerámica, metal, algodón, celulosa que incluyen mezclas de celulosa/sílice así como derivados de celulosa tales como acetato de celulosa, fibra de vidrio, a base de polímeros y combinaciones de los mismos.

35 En una realización preferida como se enseña aquí, el sustrato microporoso para recibir la composición de recubrimiento entrecruzado es una membrana microporosa a base de polímero.

40 Los polímeros representativos que pueden usarse para fabricar el sustrato microporoso y las membranas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, poli(acrilamidas sustituidas o no sustituidas, poliestirenos, polimetacrilamidas, poliimidas, poli(acrilatos, policarbonatos, polimetacrilatos, polímeros hidrófilos de polivinilo, poliestirenos, polisulfonas, polietersulfonas, copolímeros o estireno y divinilbenceno, polisulfonas aromáticas, politetrafluoroetilenos (PTFE), polímeros termoplásticos perfluorados, poliolefinas, poliamidas aromáticas, poliamidas alifáticas, polietilenos de peso molecular ultra alto, difluoruro de polivinilideno (PVDF), polieteretercetonas (PEEK), poliésteres y combinaciones de los mismos.

45 Los sustratos microporosos útiles en la presente invención también se pueden preparar a partir de medios de cromatografía que incluyen medios de exclusión por tamaño, medios de intercambio iónico y medios hidrofóbicos o hidrofílicos. En una realización particularmente preferida, el sustrato de membrana microporosa es una membrana de polietersulfona. Las personas experimentadas en la técnica podrán identificar fácilmente otros polímeros útiles en la formación de sustratos microporosos adecuados para la presente invención. En realizaciones en las que el sustrato de membrana microporosa es hidrófilo, los materiales preferidos para el sustrato incluyen poliamidas, acetato de celulosa y celulosa.

55 La composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada

60 La composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada descrita aquí se forma a partir de una solución reactiva que comprende al menos un monómero de acrilamidaalquilo polifuncional polimerizable que tiene uno o más grupos que contienen ácido sulfónico colgante cargado negativamente y/o sales del mismo, y un agente de entrecruzamiento de acrilamida polifuncional. La solución reactiva es una solución acuosa que comprende monómeros polimerizables de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS) y sales de los mismos, y un agente de entrecruzamiento de acrilamida polifuncional tal como N, N'-metilenobisacrilamida (MBAm), en el que la composición de recubrimiento resultante polimerizada entrecruzada comprende únicamente enlaces de entrecruzamiento amida-amida.

65 La solución reactiva comprende preferiblemente una solución acuosa de monómeros polimerizables de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS) y sales de los mismos, y entrecruzadores de N, N'-metilenobisacrilamida

(MBAm). El monómero AMPS está presente en la solución reactiva a una concentración entre 1% en peso y 20% en peso, preferiblemente entre 3% en peso y 6% en peso con base en el peso de la solución reactiva. El agente de entrecruzamiento de MBAm está presente en la solución reactiva en una concentración entre 5% en peso y 100% en peso con base en el peso del monómero de AMPS.

La composición de recubrimiento entrecruzada se polimeriza in situ sobre la superficie del sustrato microporoso, así como las paredes internas del poro, en ausencia de cualquier iniciador de radicales libres de polimerización química, tras la exposición a la radiación del haz de electrones. Preferiblemente, la composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada cubre la totalidad de las superficies externa e interna del sustrato microporoso.

La composición de recubrimiento entrecruzada puede comprender además un monómero complementario modificador de la propiedad, que está presente preferiblemente en una cantidad que es menor que cualquiera del monómero de acrilamidaalquilo polifuncional que tiene un grupo que contiene ácido sulfónico colgante cargado negativamente, o el agente de entrecruzamiento de acrilamida polifuncional.

Proceso de fabricación del sustrato poroso recubierto cargado negativamente

La solución reactiva se aplica sobre las superficies externa e interna del sustrato microporoso, de manera que el sustrato se satura con la solución reactiva a través de la totalidad de sus superficies externas e internas. La deposición deseada de la solución reactiva sobre las superficies interna y externa del sustrato microporoso se efectúa como un recubrimiento directo, y no requiere ni utiliza un componente químico de enlace intermedio o unidad estructural tal como un aminoácido o similar.

Se prefiere usar un sustrato microporoso que humedezca fácilmente con solución de polimerización. Esto minimiza el tiempo y los costes relacionados con la prehumectación de sustratos no humectables con solvente orgánico y realizar intercambio de disolventes.

Sin embargo, cuando se utiliza un sustrato microporoso no humectable, con el fin de saturar sustancialmente la totalidad de las superficies interna y externa con la composición de polímero entrecruzado/injertado polimerizado, la primera etapa en la formación del sustrato microporoso recubierto preferiblemente comprende lavar el sustrato con una composición de disolvente tal como una mezcla de agua y un disolvente orgánico que no expande o disuelve el sustrato microporoso, y que humedece las superficies exteriores del sustrato microporoso así como las paredes interiores de los poros.

Las composiciones de disolvente orgánico y agua adecuadas para este fin incluyen metanol/agua, etanol/agua, acetona/agua, tetrahidrofurano/agua o similares. El propósito de esta etapa de humectación es asegurar que el monómero AMPS polimerizable y sales del mismo y el entrecruzante MBAm, contactado posteriormente con el sustrato microporoso, humedezcan la totalidad de las superficies internas y externas del sustrato microporoso. Este paso de humectación preliminar puede eliminarse cuando el baño de reactivo, descrito a continuación, funciona por sí mismo para humedecer la totalidad de la superficie del sustrato microporoso. Esto puede efectuarse cuando el baño de reactivo contiene una alta concentración de reactivos orgánicos, por ejemplo 15% en peso o más.

Después de humedecer el sustrato microporoso, se pone en contacto un baño reactivo que comprende el monómero AMPS polimerizable por radicales libres y sales del mismo, y un entrecruzador MBAm en un disolvente, con el sustrato microporoso, saturando así las superficies interna y externa del sustrato. El disolvente particular empleado para el baño de reactivo dependerá del polímero o material particular utilizado para formar el sustrato microporoso. Todo lo que se necesita es que el monómero AMPS y el entrecruzador MBAm se disuelvan en el disolvente, que el disolvente no ataque el sustrato microporoso, y que el disolvente no afecte negativamente la reacción de polimerización. Los disolventes adecuados representativos incluyen agua o disolventes orgánicos tales como alcoholes, ésteres, acetona o mezclas acuosas compatibles de los mismos.

Después de que el sustrato microporoso se sumerge en la solución reactiva, de modo que las superficies interna y externa se saturen completamente con la solución reactiva, el sustrato microporoso se elimina de la solución para efectuar la reacción de polimerización fuera de la solución de manera que el monómero AMPS polimerizable no es desperdiciado. Por lo tanto, la reacción puede realizarse por lotes o de manera continua. Cuando se opera como un proceso continuo, una lámina de sustrato microporoso se satura con la solución reactiva y luego se transfiere a una zona de reacción donde se expone a la energía del haz de electrones para efectuar la reacción de polimerización.

La polimerización puede iniciarse empleando radiación ionizante en ausencia de un iniciador de radicales libres de polimerización química, o no de acuerdo con la invención, se puede usar un iniciador químico de radicales libres en lugar de la radiación ionizante.

Cuando se usa un iniciador de radicales libres, se agrega a la solución de polimerización antes de humedecer el sustrato microporoso, típicamente en la cantidad para 0,01 a 1%. Dependiendo de la naturaleza química del iniciador de radicales libres, la polimerización puede iniciarse mediante calor o radiación UV. Un ejemplo de iniciador activado

por UV (es decir, fotoiniciador) es 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona (disponible de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, bajo el nombre comercial Irgacure® 2959).

5 Cuando no se utiliza un iniciador químico de polimerización por radicales libres para polimerizar la solución reactiva, la polimerización, que ocurre in situ, depende de exponer la solución reactiva saturando las superficies interna y externa del sustrato a radiación de haz de electrones, a una dosis de al menos aproximadamente 0,1 Mrads a aproximadamente 6 Mrads, con el fin de efectuar la polimerización de los monómeros de AMPS, dando como resultado un sustrato microporoso recubierto sobre la totalidad de sus superficies interior y exterior con una composición de recubrimiento entrecruzada polimerizada. Se ha encontrado que el recubrimiento completo del sustrato microporoso con el polímero entrecruzado puede efectuarse sin la necesidad de un iniciador químico de polimerización por radicales libres.

15 Después de que la dosis deseada de radiación ha sido administrada por el haz de electrones, el sustrato microporoso recubierto se enjuaga en agua y/o metanol para eliminar los materiales sin reaccionar y oligoméricos. El sustrato recubierto se seca entonces y se prueba para la rehumectación, el flujo y otras propiedades.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no están destinados a limitar la misma.

20 En los siguientes ejemplos, se aplica lo siguiente:

El rendimiento de la membrana, expresado en volumen por unidad de área de membrana, es el volumen de solución que puede filtrarse a través de la membrana antes de que el flujo disminuya (para el modo de presión constante) o aumente la presión (para el modo de flujo constante) más allá de un umbral práctico. En los siguientes ejemplos, el número V_{75} es el rendimiento de la combinación del prefiltro y el filtro de retención de virus cuando el flujo inicial se redujo en un 75%, cuando el experimento se realizó a una presión constante de 2,07 bar (30 psi).

Tiempo de flujo

30 El tiempo de flujo es una medida del efecto del espesor del recubrimiento sobre el tamaño de poro del sustrato. Si el recubrimiento es muy delgado, entonces el cambio en el tamaño de poro del sustrato es pequeño y el cambio en el tiempo de flujo será pequeño. Si el espesor del recubrimiento es grande, entonces el cambio en el tamaño del poro del sustrato y en el tiempo de flujo será grande. El tiempo de flujo del sustrato se mide antes y después de la modificación para determinar el grado de restricción de poro que ha ocurrido. Se calcula el porcentaje del flujo original retenido por el sustrato modificado. En general, cuanto mayor es la retención del flujo original, más deseable es el sustrato.

35 El tiempo de flujo se mide bajo condiciones específicas y reproducibles. El método estándar para determinar el tiempo de flujo utilizado aquí es medir el tiempo en segundos requerido para que 500 ml de agua fluyan a través de un disco de 47 mm de sustrato en un soporte de vidrio para filtro a 69,85 cm (27,5 pulgadas) de vacío de mercurio.

40 La solución de proteínas que contiene agregados se generó de acuerdo con el procedimiento descrito en G.R. Bolton et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2006) 43, 55-63. Una solución de 0,1 g/l de IgG humana (HS-475; SeraCare Life Sciences, Oceanside, CA, Estados Unidos) en regulador de acetato 50 mM (pH 5,0, NaCl 100 mM) se calentó a 60 °C durante 1 hora para desnaturalizar la proteína y producir agregados. Esta solución se sembró de nuevo en la IgG no desnaturalizada a 9% vol. Esta solución se utilizó en todos los ejemplos para medir el rendimiento de la membrana.

45 La capacidad de un sustrato recubierto de humectarse espontáneamente con agua es una propiedad importante de un sustrato recubierto. El tiempo de rehumectación se determina dejando caer el sustrato recubierto en el agua y midiendo el tiempo en segundos para que el sustrato recubierto se humecte por completo. Esto se observa visualmente cuando el sustrato recubierto que se vuelve más oscuro a medida que se humecta.

Procedimiento general para recubrir el sustrato

55 El siguiente procedimiento describe un método general para el tratamiento del sustrato microporoso recubierto mediante radiación de haz de electrones para producir un sustrato microporoso recubierto cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga. El sustrato se humecta en metanol, se enjuaga en agua y se empapa en una solución reactiva entrecruzable de monomérica AMPS/MBA_m polimerizable acuosa durante varios minutos para asegurar el intercambio completo. Si la solución de reacción entrecruzable monomérica AMPS/MBA_m polimerizable acuosa es capaz de humectar el sustrato directamente, no son necesarias las etapas de intercambio prehumectación.

60 La tecnología de haz de electrones utilizada para iniciar la polimerización de monómeros de AMPS en las superficies del sustrato incluye, por ejemplo, los métodos descritos en la patente de los Estados Unidos No. 4,944,879 a Steuck. Steuck, por ejemplo, enseña una muestra de red o individual que pasa a través de una cortina de electrones generada por un procesador de haz de electrones. El procesador administra la dosis deseada desde

aproximadamente 100 kV a aproximadamente 200 kV. La red móvil o muestra se transporta a una velocidad adecuada para dar el tiempo de exposición deseado bajo la cortina. El tiempo de exposición, combinado con la dosis, determina la rata de dosis. Los tiempos de exposición típicos son desde aproximadamente 0,5 segundos a aproximadamente 10 segundos. Las ratas de dosis son desde 0,01 kGy (kiloGray) a 6 kGy, es decir, 0,1-6 Mrads.

Después de que la dosis deseada de radiación ha sido administrada por el haz de electrones, el sustrato microporoso tratado se enjuaga en agua y/o metanol para eliminar los materiales sin reaccionar y oligoméricos. El sustrato luego se seca y se prueba para la rehumectación, el flujo y otras propiedades.

El siguiente procedimiento describe un método general para el tratamiento del sustrato microporoso recubierto utilizando un fotoiniciador para producir un sustrato microporoso recubierto cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga. El sustrato se humecta en metanol, se enjuaga en agua y se empapa en una solución reactiva polimerizable de monómeros AMPS /entrecruzadores MBAm que contiene un fotoiniciador de radicales libres durante varios minutos para asegurar el intercambio completo. Si la solución reactiva polimerizable de monómeros AMPS/entrecruzadores MBAm es capaz de humectar el sustrato directamente, no son necesarias las etapas de intercambio prehumectación.

Los fotoiniciadores utilizados para iniciar la polimerización de monómeros de AMPS sobre las superficies del sustrato incluyen, por ejemplo, los descritos en J.-P.Fouassier, Photoinitiation, Photopolymerization, and Photocuring: Carl Hanser Verlag, Munich, Alemania, 1995, pp. 20-93, y en la Tabla 3-1, p. 21.

La polimerización de AMPS se efectúa exponiendo el sustrato poroso saturado con solución AMPS/entrecruzador/fotoiniciador a radiación ultravioleta, visible o infrarroja, a la dosis suficiente para efectuar la descomposición del fotoiniciador y la generación de radicales libres. Una fuente adecuada de radiación ultravioleta puede incluir un transportador UV con dos fuentes de luz ultravioleta, una en la parte superior y otra en la parte inferior, tal como la fabrica Fusion UV Systems, Inc. (Gaithersburg, MD).

Después de que la dosis deseada de radiación ha sido administrada por fuente de luz, el sustrato microporoso tratado se enjuaga en agua y/o metanol para eliminar los materiales sin reaccionar y oligoméricos. El sustrato luego se seca y se prueba para la rehumectación, el flujo y otras propiedades.

Uso del sustrato recubierto poroso cargado negativamente

En una realización, esta especificación proporciona un proceso para eliminar selectivamente agregados de proteína que incluyen, pero no se limitan a, trímeros de proteínas y polímeros de proteínas superiores, así como otros constituyentes indeseados de obstrucción y contaminación de una solución que contiene proteínas y/o biomoléculas.

En otra realización de esta especificación, una solución de proteína se filtra en primer lugar con un medio retentivo para retener selectivamente los agregados de proteína que comprenden trímeros de proteína y polímeros de proteínas superiores, al tiempo que permite el paso de monómeros de proteínas a través de los mismos. Esta etapa de filtración se efectúa usando un dispositivo de una o más capas de una membrana adsorbente. Cuando se utilizan estos materiales, se efectúa la eliminación de agregados de proteína sustancialmente completa mientras permite la recuperación de más de aproximadamente 85% de monómero de proteína, preferiblemente más de aproximadamente 90% de monómero de proteína, más preferiblemente más de 98% de monómero de proteína.

La figura 1 representa una de las realizaciones preferidas del proceso de esta invención 10 que utiliza un modo de filtración de presión constante. Una solución 12 de proteína es retenida por el depósito 14 presurizado y es bombeada a la unidad 16 de medios de filtración por la presión en el tanque a través del conducto 18. La solución está sujeta a un modo de flujo de filtración normal siendo los agregados retenidos por los medios y la solución libre de agregado descargada como el filtrado de la primera etapa 10. El filtrado se pasa a través del conducto 20 para un posterior procesamiento corriente abajo tal como la segunda etapa de filtración 22 (explicado en detalle a continuación), y luego a un conducto 24 de salida. Al operar de esta manera, los agregados de proteínas son retenidos por la unidad 16 de medios mientras que monómeros de proteínas pasan a través de los medios 16.

Alternativamente, se podría usar una bomba para crear la presión constante del sistema, aunque no se prefiere, ya que la salida de la bomba debería controlarse cuidadosamente a una presión constante a través de válvulas o velocidad de la bomba y requeriría un sistema de retroalimentación para garantizar que la presión se mantiene constante.

Otra realización de esta especificación se muestra en la figura 2 en la que se usa un modo de operación de flujo constante. En este sistema, se usa una bomba 26 situada entre el depósito 28 (típicamente no presurizado, en comparación con el depósito 14 presurizado de la realización de la figura 1) y la primera etapa 30 de filtración para mantener un flujo constante. Se bombea una solución 31 de proteína a través del conducto 32 a la entrada 34 de bomba, y luego se bombea a través del conducto 36 a la primera etapa 30 de filtración. La solución de proteína 31 se somete a un modo de flujo de filtración normal con los agregados siendo retenidos por el filtro de la primera etapa 30, en la que la solución libre de agregado se descarga como filtrado de la primera etapa 30. El filtrado se pasa a

través del conducto 38 para un posterior procesamiento corriente abajo tal como el segundo paso de filtración 40 (explicado en detalle a continuación), y luego a un conducto 42 de salida.

Si se desea, se puede agregar un bucle de recirculación (no mostrado) en la salida (no mostrada) de la primera etapa 30 de filtración y recircular el filtrado a través de la etapa 30 de filtración una o más veces adicionales, para reducir adicionalmente el nivel de agregado en el filtrado. El uso de una válvula (no se muestra) es la manera más simple para controlar el flujo entre el bucle de recirculación y el conducto corriente abajo. Sin embargo, los pases de recirculación adicionales son generalmente innecesarios y aumentan el tiempo y los costes de fabricación innecesariamente. Se ha encontrado que un pase de recirculación es típicamente suficiente.

En la segunda etapa de filtración (22 o 40), se lleva a cabo una filtración de eliminación viral después de la eliminación del agregado. Los virus se eliminan de la solución libre de agregado mediante un filtro de flujo normal (NFF) o un filtro de filtración de flujo tangencial (TFF) tal como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6,365,395, presentada el 3 de noviembre de 2000.

Una solución de proteína se prefiltra en primer lugar a través de un prefiltro de medio microporoso recubierto cargado negativamente que tiene una alta densidad de carga como se enseña aquí, para la eliminación de agregados de proteína. La prefiltración se efectúa preferiblemente usando un modo NFF sin salida. La filtración sin salida se refiere a la filtración en la que toda la corriente de fluido que se filtra pasa a través del filtro sin reciclar ni retener el flujo. Cualquier material que no pase a través del filtro permanece en la superficie superior del filtro o permanece dentro del filtro.

Cuando se filtra una solución de proteína corriente arriba, en una primera etapa, usando el prefiltro de medio microporoso recubierto para eliminar agregados de proteína como se enseña aquí, los filtros de retención de partículas virales se pueden utilizar corriente abajo en una segunda etapa. En una realización, el filtro de eliminación de agregados de proteína puede eliminarse después del uso.

Cuando se utiliza una segunda etapa de filtración, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6,365,395 a Antoniou, para retener selectivamente partículas virales, la filtración puede efectuarse con una o más membranas de ultrafiltración ya sea por TFF o por NFF sin salida, en la que la solución de proteína producida por este proceso de filtración en dos etapas es proteína libre de aglomerados y libre de virus. La una o más membranas de ultrafiltración retienen partículas virales mientras que permiten el paso de monómeros de proteínas a través de las mismas.

Después de la etapa de filtración viral TFF, la membrana de ultrafiltración se puede enjuagar opcionalmente con agua o una solución reguladora acuosa para recuperar cualquier proteína retenida por la membrana.

Cuando una solución de proteína que comprende trímeros de proteína y polímeros superiores de proteína se prefiltra en primer lugar con la membrana recubierta microporosa cargada negativamente que tiene una alta densidad de carga como se enseña aquí, los agregados de proteína se retienen selectivamente mientras permiten el paso de monómeros de proteína a través de los mismos. Esta etapa de prefiltración se efectúa utilizando un prefiltro que tiene una o más capas de membranas microporosas recubiertas cargadas negativamente, en el que la eliminación sustancialmente completa de agregados de proteína de la solución de proteína se efectúa permitiendo la recuperación de más de aproximadamente 85% de monómeros de proteína, preferiblemente más de aproximadamente 90 % de monómeros de proteína, y más preferiblemente mayor que 98%.

El uso de las membranas microporosas recubiertas cargadas negativamente usadas en la etapa de prefiltración para eliminar los componentes de obstrucción de una solución de biomoléculas proporciona ventajas sustanciales sobre los procesos convencionales de separación de proteínas y partículas virales convencionales. Como el dispositivo de filtración de la primera etapa (eliminación de los componentes de obstrucción) se opera en el modo NFF, puede ser desechable y no hay un proceso de limpieza que esté sujeto a procedimientos de validación y similares. Además, el modo de operación de flujo normal es menos costoso de comprar y operar, ya que se necesita gastar menos capital para establecer dicho sistema en comparación con un sistema de tipo de ultrafiltración TFF. Además, dado que la membrana utilizada en la segunda etapa de filtración para eliminar partículas virales no se contamina o se obstruye con agregados de proteína, se extiende su vida útil.

Otra ventaja proporcionada por la invención como se enseña aquí incluye que la membrana microporosa recubierta utilizada en la primera etapa de prefiltración no tiene que ser una membrana de ultrafiltración.

En general, se puede ver la mejora en el rendimiento y el flujo obtenido con el paso de eliminación de agregado NFF. La V_{max} fue al menos un 900% mayor que la V_{max} obtenida sin el paso de eliminación de agregado NFF.

La presente invención proporciona un medio simple para la eliminación corriente arriba de agregados de proteína de una corriente y/o solución de proteína antes de que se produzca la filtración viral corriente abajo u otras etapas del proceso. Este paso de prefiltración reduce la contaminación y la obstrucción que de otro modo ocurriría corriente abajo a los filtros de retención viral y similares, aumentando dramáticamente el rendimiento. Además, esto se hace

sin la necesidad de TFF que es más costoso de comprar y ejecutar y que debe limpiarse entre usos. La presente invención permite eliminar el filtro de agregado permitiendo eliminar el coste de limpieza y almacenamiento de la membrana entre los usos y el coste y el tiempo de validación de los procedimientos propios a las agencias reguladoras tales como la FDA.

5 Cuando se eliminan partículas virales de una solución de proteína sustancialmente libre de agregados de proteína, el filtrado de la etapa de eliminación de agregado de proteína se dirige a una segunda etapa de filtración. La segunda etapa de filtración utiliza una o más membranas de filtración de retención viral (típicamente de ultrafiltración) que pueden realizarse en el modo TFF o el modo NFF.

10 En cualquier modo, la filtración se realiza bajo condiciones para retener las partículas virales, generalmente con un diámetro de 20 a 100 nanómetros (nm), en la superficie de la membrana mientras permite el paso de monómero de proteína y una porción de dímero de proteína a través de la membrana.

15 Las membranas de retención viral de ultrafiltración adecuadas representativas usadas en la etapa de eliminación de partículas virales de la segunda etapa incluyen las formadas a partir de celulosa regenerada, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polisulfonas, poliiimidias, poliamidas, fluoruro de polivinilideno (PVDF) o similares, e incluyen membranas VIREOLVE® NFP, VIREOLVE® Pro, y RETROPORE® disponibles de Millipore Corporation of Billerica, MA, Estados Unidos. Estas se pueden suministrar en forma de cartucho NFF, como los filtros virales VIREOLVE® NFP, o como casetes para TFF, como casetes PELLICON®, también disponibles en Millipore Corporation of Billerica, MA, Estados Unidos.

20 Los filtros virales utilizados en el proceso de esta invención se caracterizan por un valor de retención logarítmica (LRV; el logaritmo negativo del coeficiente de cribado) para partículas virales y otras partículas que aumentan monotónicamente con el diámetro de la partícula; en el intervalo de tamaño de interés para partículas virales de 20 a 100 nm de diámetro. Empíricamente, el LRV aumenta continuamente con el tamaño del área proyectada de la partícula (el cuadrado del diámetro de la partícula).

25 Cuando se eliminan partículas virales de pequeño tamaño de una solución de proteína, se obtiene un LRV satisfactorio de al menos aproximadamente 3. Sin embargo, el límite de peso molecular se reduce, reduciendo así la recuperación de proteínas. Por lo tanto, es preferible una membrana que proporcione LRV y recuperación de proteína satisfactorias. Las membranas utilizadas en el proceso de esta invención son capaces de producir un LRV para partículas virales de 3 y pueden extenderse hasta tan alto como aproximadamente 8 o más donde el tamaño de partícula viral está entre 10 y 100 nm de diámetro.

30 La corriente de proteína libre de agregados de proteína puede entonces filtrarse a través de una o más membranas de ultrafiltración para retener partículas virales a un nivel de retención de al menos 3 LRV, y permitir el paso a través de una solución de proteína libre de partículas virales y agregados libres de proteína.

35 Esta especificación proporciona además un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de filtro, dispositivo de cromatografía, dispositivo de transferencia macromolecular, disposición de distribución de flujo, y/o un módulo de membrana que comprende uno o más sustratos recubiertos microporosos cargados negativamente como se enseña aquí. El dispositivo puede estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, el dispositivo puede incluir un elemento de filtro que comprende el sustrato recubierto microporoso cargado negativamente tal como se enseña aquí en una forma sustancialmente plana o plisada. En otra realización, el elemento de filtro puede tener una forma hueca generalmente cilíndrica.

40 Si se desea, el dispositivo puede incluir las membranas recubiertas microporosas de prefiltro como se enseña aquí en combinación con capas de drenaje o soporte corriente arriba y/o corriente abajo. El dispositivo puede incluir una pluralidad de membranas, por ejemplo, para proporcionar un elemento de filtro multicapa, o apilado para proporcionar un módulo de membrana, tal como un módulo de membrana para uso en cromatografía de membrana. Los cartuchos de filtro pueden construirse incluyendo una carcasa y tapas terminales para proporcionar un sellado de fluido, así como al menos una entrada y al menos una salida. Los dispositivos pueden construirse para operar en modo de flujo cruzado o de flujo tangencial (TFF), así como en modo sin salida (NFF). Por lo tanto, la solución o corriente que contiene proteína a tratar puede pasarse, por ejemplo, tangencialmente a una superficie de membrana, o pasarse perpendicularmente a una superficie de membrana.

45 En otra realización, las membranas recubiertas microporosas tal como se enseñan aquí pueden usarse individualmente o en grupos, de manera que la solución que contiene proteína se pone en contacto con uno o más elementos de prefiltro en flujo paralelo o en serie. Por ejemplo, las membranas microporosas recubiertas tal como se enseñan aquí pueden usarse en grupos, por ejemplo capas múltiples apiladas (generalmente de 3 a 8) selladas en el mismo armazón. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 2,788,901 a Boeddinghaus et al. y la patente de los Estados Unidos No. 5,085,784 a Ostreicher.

65

Una realización mostrada en la figura 1, representa una primera etapa 10 de proceso, en la que se utiliza un modo de filtración de presión constante. Una solución 12 de proteína es retenida por el depósito 14 presurizado y es bombeada a la unidad 16 de medios de filtración por la presión en el tanque a través del conducto 18. La solución 12 de proteína es sometida a un modo de flujo de filtración normal con los agregados de proteína siendo retenidos por un prefiltro de medios recubierto microporoso cargado negativamente como se enseña aquí, contenido dentro de la unidad 16 de medios de filtración, y la solución libre de agregados de proteína se descarga como filtrado de la primera etapa 10. El filtrado se pasa luego a través de un conducto 20 para un posterior procesamiento corriente abajo, tal como una segunda etapa 22 de proceso de filtración (como se explica más abajo) y en el que el filtrado sale de la etapa 22 del proceso a través de un conducto 24 de salida. Operando de esta manera, una solución libre de agregado de proteína resulta de agregados de proteína retenidos por la unidad 16 de medios que tiene el prefiltro de medio recubierto microporoso cargado negativamente enseñado aquí, mientras que los monómeros de proteínas y similares pasan a través de la unidad 16 de medios.

Alternativamente, se puede usar una bomba para crear la presión constante del sistema, aunque no se prefiere ya que la salida de la bomba debería controlarse cuidadosamente a una presión constante a través de válvulas o velocidad de la bomba y requeriría un sistema de retroalimentación para asegurar que la presión se mantiene constante.

Otra realización se muestra en la figura 2, representa una primera etapa 30 de proceso, en la que se usa un modo de funcionamiento de flujo constante. En este sistema, una bomba 26 está situada entre el depósito 28 (típicamente un depósito no presurizado, en comparación con el recipiente 14 de depósito presurizado de la realización mostrada en la figura 1) y la unidad 35 de medios de filtración para mantener un flujo constante. La solución 31 de proteína se bombea a través del conducto 32 a la entrada 34 de la bomba y se bombea a través del conducto 36 a la unidad 35 de medios de filtración. De nuevo, el prefiltro usado en la primera etapa 30 es el medio recubierto microporoso cargado negativamente como se enseña aquí, y también usado en la figura 1. La solución 31 de proteína se somete a un modo de flujo normal de filtración en el que los agregados de proteína son retenidos por el prefiltro en la unidad 35 de medios de filtración, y una solución libre de agregados de proteína se descarga como filtrado y se pasa a través del conducto 38 para un posterior procesamiento corriente abajo, tal como una segunda etapa 40 de proceso de filtración (como se explica abajo), y luego a un conducto 42 de salida. Operando de esta manera, una solución libre de agregado de proteína resulta de los agregados de proteína retenidos por la unidad 35 de medios que tiene el prefiltro de medios recubierto microporoso cargado negativamente enseñado aquí, mientras que los monómeros de proteínas y similares pasan a través de la unidad 35 de medios.

Un bucle de recirculación (no mostrado) puede ubicarse en una salida (no mostrada) de la primera etapa de filtración (10, 30) y recircular el filtrado a través de la primera etapa de filtración una o más veces adicionales para reducir aún más el nivel de agregado de proteína en el filtrado si es necesario. El uso de una válvula (no se muestra) es el medio más simple para controlar el flujo entre el bucle de recirculación y el conducto corriente abajo. Se ha encontrado que un pase de recirculación es suficiente. Los pasos de recirculación adicionales son generalmente innecesarios y aumentan el tiempo y los costes de fabricación innecesariamente.

Se plantea la hipótesis de que el prefiltro de membrana de la presente invención opera predominantemente mediante enlace iónico de agregados de proteína cargados positivamente en su superficie cargada negativamente. Con base en esta comprensión de cómo se cree que funciona el mecanismo del prefiltro, se puede determinar de manera adecuada las condiciones de operación, la elección de estrategias de validación y el abordaje de la resolución de posibles problemas.

El mecanismo de la operación del prefiltro puede investigarse mediante el análisis del rendimiento del prefiltro en una variedad de condiciones de solución. Por ejemplo, se variaron la conductividad y el pH de una solución de exposición y se midió el rendimiento de la combinación de prefiltro/filtro. Se utilizó SeraCare IgG con choque de calor (punto isoeléctrico o "pI" de aproximadamente 6-9) (SeraCare Life Sciences, Inc., Milford, MA, Estados Unidos) en la solución de exposición a una presión operacional de 30 psig. Como se representa en la figura 3, el prefiltro es más efectivo en un intervalo de pH por debajo del pI de agregados y un intervalo de conductividad de alrededor de 2-16 mS/cm. La carga positiva neta en los agregados se reduce a medida que el pH se aproxima al pI, y las interacciones de carga global se debilitan a medida que aumenta la conductividad. El rendimiento relativamente pobre del prefiltro a pH alto y alta conductividad parece confirmar que las interacciones iónicas son principalmente responsables de la eliminación del agregado de la corriente de anticuerpo.

El material proteico enlazado al prefiltro de membrana durante las pruebas de rendimiento se eliminó (eluyó) y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se estudiaron dos condiciones de elución: elución con solución de NaCl 1 M (mostrada en la figura 4) y con agua desionizada (mostrada en la figura 5). A partir de los datos de SDS-PAGE, no se observó elución de proteína en agua desionizada en la figura 5, mientras que estaban presentes fuertes bandas de anticuerpo y agregado en el eluido de sal 1 M figura 4. El peso molecular de la proteína eluida se cuantificó con SEC como se muestra en la figura 6. Aunque no se detectó proteína en las muestras de elución de agua, se encontró una cantidad significativa de especies de alto peso molecular (HMW) en el material de elución de sal, mostrado en la figura 6. La cantidad de especies de HMW está por debajo del nivel de detección en la solución de alimentación,

pero una cantidad significativa (23%) se eluye de la membrana de prefiltro, lo que indica un enlace preferencial de los agregados, también mostrada en la figura 6. Esto refuerza aún más la suposición de que el enlace iónico de los agregados a la superficie de la membrana es el mecanismo principal de la operación del prefiltro.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se preparó una solución acuosa que contenía 4,5% en peso de sal de sodio de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS-Na) y 0,9% de N, N'-metilenobisacrilamida. Se cortó una membrana de polietersulfona hidrófila con un tamaño de poro de 0,22 μm (comercialmente disponible como Millipore Express® SHF) en piezas cuadradas de 14 cm por 14 cm y se sumergió en esta solución durante 30 segundos para asegurar una humectación completa. El exceso de solución se eliminó, y la membrana se expuso a 2 MRads de radiación de haz de electrones bajo atmósfera inerte. La membrana se enjuagó posteriormente con agua desionizada y se secó al aire. Tres capas de esta membrana se sellaron en un dispositivo de polipropileno ventilado, con un área de filtración de membrana de 3,1 cm^2 . El soporte se conectó en línea a un dispositivo similar que contiene dos capas de membrana de eliminación de parvovirus Viresolve® Pro. Esta combinación de dispositivo se probó primero con respecto a la permeabilidad con solución reguladora de acetato y luego para el rendimiento con una solución de anticuerpos policlonales que contiene agregados preparada como se describió anteriormente. La Tabla 1 muestra el rendimiento combinado de esta combinación de filtros.

Ejemplo 2

Se siguió el procedimiento delineado en el Ejemplo 1, pero se reemplazó AMPS-Na con 4,0% en peso de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS).

Ejemplo 3

Se preparó una solución acuosa que contenía 4,5% en peso de sal de sodio de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS-Na) y 0,9% de N, N'-metilenobisacrilamida. Se cortó una membrana de polietersulfona hidrófoba con un tamaño de poro de 0,22 μm (precursor no hidrofílico de Millipore Express® SHF) en piezas cuadradas de 14 por 14 cm y se sumergió en isopropanol durante 1 minuto, se transfirió a agua desionizada durante 5 minutos y luego se sumergió en la solución de monómero durante 3 minutos. El exceso de solución se eliminó, y la membrana se expuso a 2 MRads de radiación de haz de electrones bajo atmósfera inerte. La membrana se enjuagó posteriormente con agua desionizada y se secó al aire. Se siguió el procedimiento de prueba descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se siguió con una membrana de polietersulfona hidrófila que tiene un tamaño de poro de 0,8 μm , disponible comercialmente bajo el nombre comercial Micropes de Polypore Inc de la unidad Membrana GMBH, Wuppertal, Alemania.

Ejemplo 5, no de acuerdo con la invención

Se preparó una solución acuosa que contenía 4,5% en peso de sal de sodio de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS-Na), 0,9% de N, N'-metilenobisacrilamida y 0,2% de iniciador UV 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona (disponible de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, bajo el nombre comercial Irgacure® 2959). Una membrana hidrofóbica de polivinilideno difluoruro con un tamaño de poro de 0,65 μm se cortó en piezas cuadradas de 14 cm por 14 cm y se sumergió en isopropanol durante 1 minuto, se transfirió a agua desionizada durante 5 minutos y luego se sumergió en la solución de monómero durante 3 minutos. El exceso de solución se eliminó, y la membrana se expuso a radiación ultravioleta bajo atmósfera inerte. La membrana se enjuagó posteriormente con agua desionizada y se secó al aire. Se siguió el procedimiento de prueba descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 6 no de acuerdo con la invención

Se preparó una solución acuosa que contenía 4,5% en peso de sal de sodio de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (AMPS-Na), 0,9% de N, N'-metilenobisacrilamida y 0,2% de iniciador UV 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona (disponible de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, bajo el nombre comercial Irgacure® 2959). Se cortó una membrana de polietileno hidrófilo de peso molecular ultra alto con un tamaño de poro de 0,65 μm en piezas cuadradas de 14 por 14 cm y se sumergió en esta solución durante 30 segundos para asegurar una humectación completa. El exceso de solución se eliminó, y la membrana se expuso a radiación ultravioleta bajo atmósfera inerte. La membrana se enjuagó posteriormente con agua desionizada y se secó al aire. Se siguió el procedimiento de prueba descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 7

Se preparó una membrana modificada como se describe en el Ejemplo 1. Se fabricaron dispositivos de polipropileno moldeado que contenían 1, 2, 3 y 6 capas de esta membrana, y se probaron como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 8

Se siguió el procedimiento en el Ejemplo 1, la concentración de AMPS-Na se varió de 2 a 6%.

Ejemplo 9

La membrana preparada en el Ejemplo 1 se expuso dos veces a irradiación gamma de 30 kGy cada una, para una dosificación total de 60 kGy, es decir, 3 Mrads cada una, para una dosificación total de 6 Mrads. La eficacia de eliminación del agregado se probó antes y después de la exposición como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 10

La membrana preparada en el Ejemplo 1 se lavó con una solución 0,5 N de hidróxido de sodio durante 1 hora a presión constante de 1,72 bar (25 psi), luego se lavó con agua desionizada durante 60 min a 2,07 bar (30 psi) y se probó la eficiencia de eliminación del agregado como es delineado en el Ejemplo 1.

Ejemplo comparativo 1

La prueba de rendimiento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se utilizó ninguna etapa de prefiltración. Dos capas de la membrana de eliminación de parvovirus Viresolve®Pro de Millipore Corporation se sellaron en un dispositivo ventilado de polipropileno. Este dispositivo se probó primero para la permeabilidad con solución reguladora de acetato, y luego para el rendimiento con una solución que contiene agregados de anticuerpos policlonales preparada como se describió anteriormente. La Tabla 1 muestra el rendimiento combinado de esta combinación de filtros.

Ejemplo Comparativo 2

Se utilizó un Prefiltro Viresolve® de Millipore Corporation para eliminar agregados de proteína de una corriente de proteína. Un dispositivo comercialmente disponible con un área de filtración de 5 cm² se conectó en línea a un dispositivo que contenía Viresolve® Pro y se probó como se describió anteriormente.

La Tabla 1 (ejemplo 5,6 no están de acuerdo con la invención)

Membrana	Permeabilidad, L/(m ² h-psi)	Rendimiento V ₇₅ de solución que contiene agregados de anticuerpos policlonales, L/m ²
	≈ permeabilidad * 14,50 para obtener L/(m ² hbar)	
Ejemplo 1	15,5	3.549
Ejemplo 2	14,8	2.894
Ejemplo 3	14,1	2.782
Ejemplo 4	14,9	825
Ejemplo 5	1,64	850
Ejemplo 6	14,6	1.602
Ejemplo 7		
1 capa	15,5	708
2 capas	14,6	1.725
3 capas	14,1	3.549
6 capas	13,7	11.548
Ejemplo 8	15,5	3.879

Membrana	Permeabilidad, L/(m ² h-psi)	Rendimiento V ₇₅ de solución que contiene agregados de anticuerpos policlonales, L/m ²
	≈ permeabilidad * 14,50 para obtener L/(m ² hbar)	
Ejemplo 9	15,5	3.743
Ejemplo Comparativo 1	17	75
Ejemplo Comparativo 2	12,8	14.765

5 Un aspecto en el desarrollo de una etapa de filtración de virus para una aplicación de anticuerpo monoclonal es determinar la estrategia para la verificación de que la eliminación del virus lograda mediante este paso de filtración se realiza solo por exclusión de tamaño (SEC). Las estrategias y recomendaciones de validación de virus se desarrollan mediante la comprensión del enlace del virus a un prefiltro.

10 Se ha demostrado que el Prefiltro Viresolve® (fibras de celulosa con Diatomita) elimina virus de mamíferos mediante adsorción en modo mixto. Dado que es un requisito reglamentario demostrar la eliminación del virus solamente mediante exclusión de tamaño (SEC) durante la validación de la etapa de filtración del virus, el prefiltro Viresolve® debe desacoplarse del filtro de virus, como se representa en la figura 7. El material de alimentación se filtra primero a través del Prefiltro Viresolve®, y luego se siembra con virus, seguido por filtración de virus. En muchos casos, desacoplar el prefiltro Viresolve® del filtro de virus puede conducir a reducir la capacidad incluso en ausencia de siembra de virus. La figura 7 representa esquemáticamente un modo de prefiltración desacoplado de eliminación de virus. Mientras que la figura 8 representa esquemáticamente un modo de prefiltración por siembra en cruz (acoplado) de eliminación de virus.

20 Un beneficio potencial de un prefiltro cargado negativamente, a base de membrana de acuerdo con esta invención en una aplicación de eliminación viral, puede ser la capacidad de sembrar virus a través del prefiltro durante la validación del virus para maximizar las capacidades y mejorar la facilidad de uso.

25 Si se observa una eliminación mínima del virus a través del paso de prefiltración, puede ser posible sembrar en cruz el prefiltro eliminando cualquier posible efecto de desacoplamiento, así como también proporcionando una purificación adicional de los contaminantes por la siembra de virus.

30 Se realizó una evaluación del enlace de bacteriófagos y de virus de mamífero a este prefiltro cargado negativamente. Esto se completó en dos fases: la primera fase fue evaluar los bacteriófagos como modelos para el virus de mamífero. Dado que el mecanismo primario de eliminación a través del prefiltro es el enlace a base de carga, se eligieron bacteriófagos que tienen puntos isoeléctricos similares a los virus de mamífero relevantes.

Tabla 2: Resumen de virus probados

Fase del Proyecto	Virus	Tamaño estimado (nm)	pl estimado
Bacteriófago	ΦX-174	25	6,6
Bacteriófago	PP7	25-35	4
Mamífero	MMV	18-26	4
Mamífero	XMuLV	80-110	6

35 Las muestras de alimentación recolectadas de dispositivos acoplados dieron como resultado una retención mínima (<0,2 registros) de bacteriófagos (Phi-X 174 y PP7) y aproximadamente 0,6-1 registros de MMV a través del prefiltro. En promedio, se conservaron aproximadamente 2 registros de XMuLV. Esto es más probable debido a la

diferencia de tamaño entre este virus y los otros en la prueba. Estos resultados sugieren que una estrategia de validación de virus que involucra el sembrado en cruz del prefiltro, en el modo acoplado, puede ser posible.

5 Una propiedad ventajosa de los medios recubiertos microporosos cargados negativamente enseñados aquí incluye resistencia química para resistir el contacto con soluciones altamente alcalinas en operaciones de limpieza o desinfección sin pérdida de propiedades de filtración, así como otras propiedades de superficie, químicas y mecánicas deseables.

10 Un proceso de prefiltración que utiliza los medios microporosos recubiertos cargados negativamente como se enseña aquí y operado en el modo NFF para eliminar constituyentes de obstrucción y contaminación tales como agregados de proteína de una solución biológica, ofrece varias ventajas sobre los procesos de separación actualmente usados, porque el medio microporoso recubierto es desechable, por lo que no requiere ningún proceso de limpieza que esté sujeto a procedimientos de validación. Además, el modo de operación NFF es menos costoso de operar en comparación con los sistemas de tipo TFF de ultrafiltración.

15 Además, los medios microporosos recubiertos cargados negativamente enseñados aquí y utilizados corriente arriba de la eliminación de partículas virales de una solución de proteína inhiben la contaminación del medio de ultrafiltración de retención de partículas virales utilizado corriente abajo, reteniendo los componentes contaminantes corriente arriba, extendiendo así la vida útil de los medios de ultrafiltración de retención de partículas virales.

20 Las propiedades de los medios microporosos recubiertos con carga negativa de la presente invención los hacen atractivos para el uso en la prefiltración, detección, separación y/o purificación de biomoléculas tales como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y partículas virales. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ARN y ADN sintéticos o naturales modificados o no modificados.

25 Los medios microporosos recubiertos cargados negativamente como se enseñan aquí también encuentran uso en diversas aplicaciones tales como prefiltración y filtración de fluidos que contienen proteínas, átomos, moléculas, biomoléculas y partículas con carga positiva, y transferencia macromolecular de geles de electroforesis tales como la transferencia de ácidos nucleicos y proteínas de geles de electroforesis a una matriz de inmovilización.

30 Los medios microporosos recubiertos cargados negativamente tal como se enseñan aquí también encuentran uso en la separación o purificación de diversos componentes presentes en fluidos biológicos. De este modo, por ejemplo, los medios microporosos recubiertos se pueden usar en la purificación de albúmina humana a partir del suero, en el fraccionamiento terapéutico de la sangre y en la separación de componentes en cultivos de células genéticamente modificadas o caldos de fermentación. Los medios microporosos recubiertos también pueden usarse en la purificación de, por ejemplo, vacunas virales y vectores de terapia génica tales como partículas virales adenoasociadas.

35 La presente invención proporciona un medio de prefiltración simple para la eliminación de agregados de proteína de una corriente de proteína corriente arriba o antes de la filtración viral u otras etapas de procesamiento corriente abajo. Los medios de prefiltración enseñados aquí reducen la contaminación y la obstrucción que de otro modo ocurrirían a los filtros de retención virales y similares, aumentando de ese modo el rendimiento y el flujo sobre los procesos de filtración tradicionales que no incorporan la membrana microporosa recubierta como se enseña aquí.

40

REIVINDICACIONES

1. Un medio de filtración con carga negativa que comprende:

5 un sustrato poroso recubierto con un recubrimiento de acrilamidaalquilo entrecruzado polimerizado cargado negativamente, polimerizado in situ sobre la superficie del sustrato tras la exposición a un haz de electrones y en ausencia de un iniciador de radicales libres de polimerización química, en el que el recubrimiento comprende solo enlaces de entrecruzamiento amida-amida y se forma a partir de un monómero de acrilamidaalquilo polimerizable que comprende ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo, y un agente de entrecruzamiento de acrilamida que comprende N, N'-metilenobisacrilamida, y adicionalmente en el que el recubrimiento se forma a partir de una solución reactiva acuosa que comprende, en base al peso de la solución reactiva, desde 1 a 20% en peso de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo, y con base en el peso del ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo, desde 5 a 100% en peso de N, N'-metilenobisacrilamida, caracterizado porque el recubrimiento se polimeriza exponiendo el recubrimiento a un haz de electrones que proporciona una dosis de radiación de 0,1 a 6 Mrads durante al menos 0,1 segundos.

2. El medio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato poroso comprende un material seleccionado del grupo que consiste en poliacrilamidas sustituidas o no sustituidas, poliestirenos, polimetacrilamidas, poliimidias, poliacrilatos, policarbonatos, polimetacrilatos, polímeros de polivinilo, polisulfonas, polietersulfonas, copolímeros de estireno y divinilbenceno, polisulfonas aromáticas, politetrafluoroetileno (PTFE), polímeros termoplásticos perfluorados, poliolefinas, poliamidas aromáticas, poliamidas alifáticas, polietilenos de peso molecular ultra alto, difluoruro de polivinilideno (PVDF), polieterecetona (PEEK), polisacáridos, poliésteres, celulosa, derivados de celulosa, fibra de vidrio, algodón, cerámicas, metales, telas no tejidas y combinaciones de los mismos.

3. El medio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato poroso se lava con un líquido humectante para humectar el sustrato antes de recubrir el sustrato con el recubrimiento de acrilamidaalquilo entrecruzado polimerizado cargado negativamente.

4. El medio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato poroso comprende:

- a) una membrana microporosa; o
- b) una o más membranas microporosas plisadas.

5. El medio de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una forma cilíndrica hueca.

6. Una membrana porosa recubierta cargada negativamente que comprende el medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sustrato comprende:

una membrana porosa que tiene superficies internas y externas, y el recubrimiento de acrilamidaalquilo entrecruzado polimerizado cargado negativamente que tiene solamente enlaces de entrecruzamiento amida-amida se polimeriza in situ en las superficies interna y externa de la membrana porosa.

7. Un proceso para fabricar un medio poroso recubierto entrecruzado polimerizado cargado negativamente que comprende los pasos de:

- a) proporcionar un sustrato poroso que tiene superficies internas y externas;
- b) proporcionar una solución reactiva acuosa de monómeros de acrilamidaalquilo polimerizables que comprenden ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo, y el agente de entrecruzamiento de acrilamida que comprende N, N'-metilenobisacrilamida;
- c) poner en contacto el sustrato poroso con la solución reactiva;
- d) formar una composición de recubrimiento entrecruzada cargada negativamente que tiene solamente enlaces de entrecruzamiento amida-amida, a partir de la solución reactiva sobre el sustrato poroso en la que la solución reactiva comprende, en base al peso de la solución reactiva, desde 1 a 20% en peso de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo, y en base al peso del ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico y sales del mismo, desde 5 a 100% en peso de N, N'-metilenobisacrilamida;
- e) polimerizar la composición de recubrimiento entrecruzada cargada negativamente in situ sobre el sustrato poroso en ausencia de un iniciador de radicales libres de polimerización química, caracterizado porque el recubrimiento se polimeriza exponiendo el recubrimiento a un haz de electrones que proporciona una dosis de radiación desde 0,1 a 6 Mrads por lo menos alrededor de 0.1 segundos; y
- f) formar un recubrimiento polimerizado entrecruzado cargado negativamente sobre el sustrato poroso.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además la etapa (a1), entre las etapas (a) y (b), de lavar el sustrato poroso con un líquido humectante para humectar el sustrato.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un paso de lavado adicional entre las etapas (a1) y (b), de lavar el sustrato poroso húmedo con un segundo líquido humectante para reemplazar el primer líquido humectante, humectando el sustrato poroso con el segundo líquido.
- 5 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la etapa (c) comprende sumergir el sustrato poroso en un baño de solución reactiva, saturar las superficies interna y externa del sustrato, retirando el sustrato recubierto del baño de solución reactiva, y eliminar cualquier exceso de solución reactiva del sustrato recubierto.
- 10 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el sustrato poroso comprende un material seleccionado del grupo que consiste en poliacrilamidas sustituidas o no sustituidas, poliestirenos, polimetacrilamidas, poliimidias, poliacrilatos, policarbonatos, polimetacrilatos, polímeros de polivinilo, polisulfonas, polietersulfonas, copolímeros de estireno y divinilbenceno, polisulfonas aromáticas, politetrafluoroetileno (PTFE), polímeros termoplásticos perfluorados, poliolefinas, poliamidas aromáticas, poliamidas alifáticas, polietilenos de peso molecular ultra alto, difluoruro de polivinilideno (PVDF), polieterecetona (PEEK), polisacáridos, poliésteres, celulosa, derivados de celulosa, fibra de vidrio, algodón, cerámica, metales, telas no tejidas y combinaciones de los mismos.
- 15 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el sustrato poroso comprende una membrana microporosa.
- 20 13. Un dispositivo de tratamiento de fluidos que comprende:
- una carcasa que incluye al menos una entrada, al menos una salida y que define un recorrido de flujo de fluido entre la entrada y la salida, interpuesto entre la entrada y la salida y a través del recorrido de flujo de fluido hay una pluralidad de membranas microporosas cargadas negativamente de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 6.
- 25 14. Un proceso para eliminar selectivamente agregados de proteína y partículas virales de una solución de proteína que contiene agregados de proteína y partículas virales que comprende los pasos de:
- 30 a) filtrar una solución de proteína que contiene agregados de proteína y partículas virales a través de un medio microporoso cargado negativamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- b) recuperar una solución de proteína sustancialmente libre de agregados de proteína;
- 35 c) filtrar la solución de proteína recuperada a través de una o más membranas de ultrafiltración;
- d) retener partículas virales en la una o más membranas de ultrafiltración a un nivel de al menos 3 Valor de Retención Logarítmica (LRV); y
- e) recuperar una solución de proteína sustancialmente libre de partículas virales.
- 40 15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además la etapa de lavar la proteína retenida en la una o más membranas de ultrafiltración.
- 45 16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la filtración de la etapa (a) comprende el modo de filtración de flujo normal.
17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la filtración de la etapa (c) comprende el modo de filtración de flujo normal o el modo de filtración de flujo tangencial.

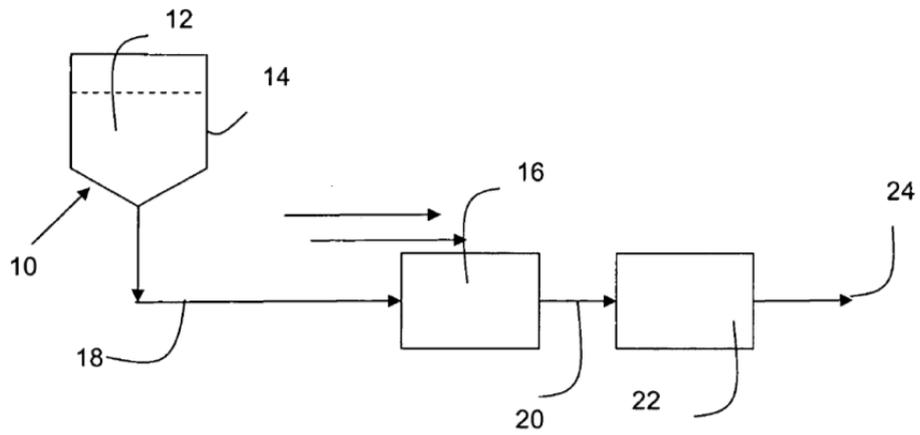


FIG. 1

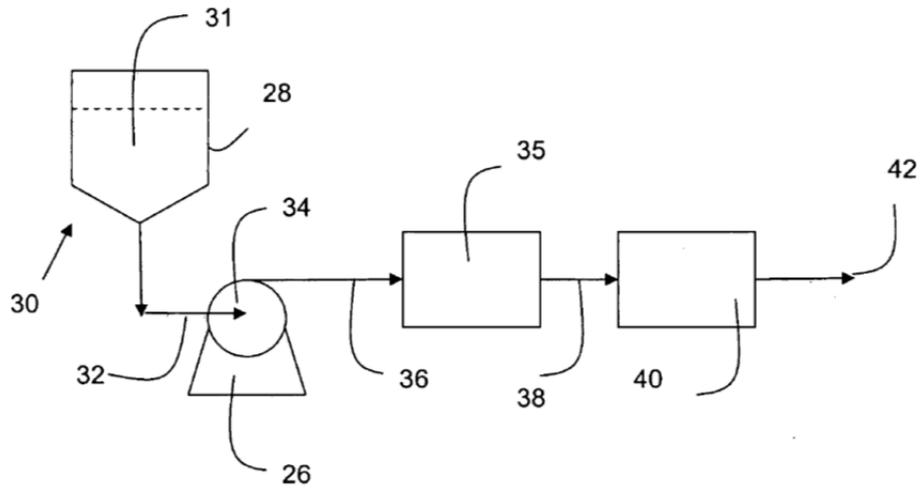


FIG. 2

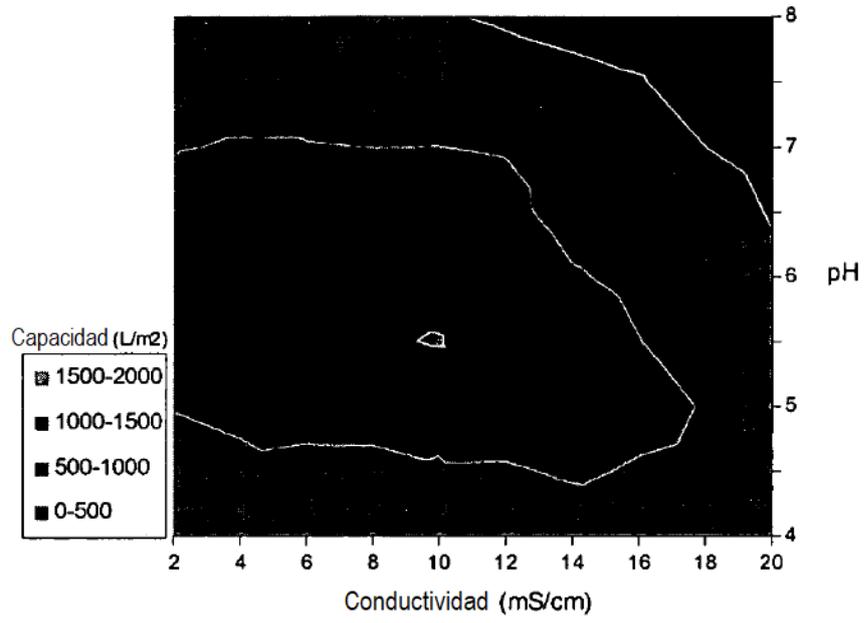


FIG. 3

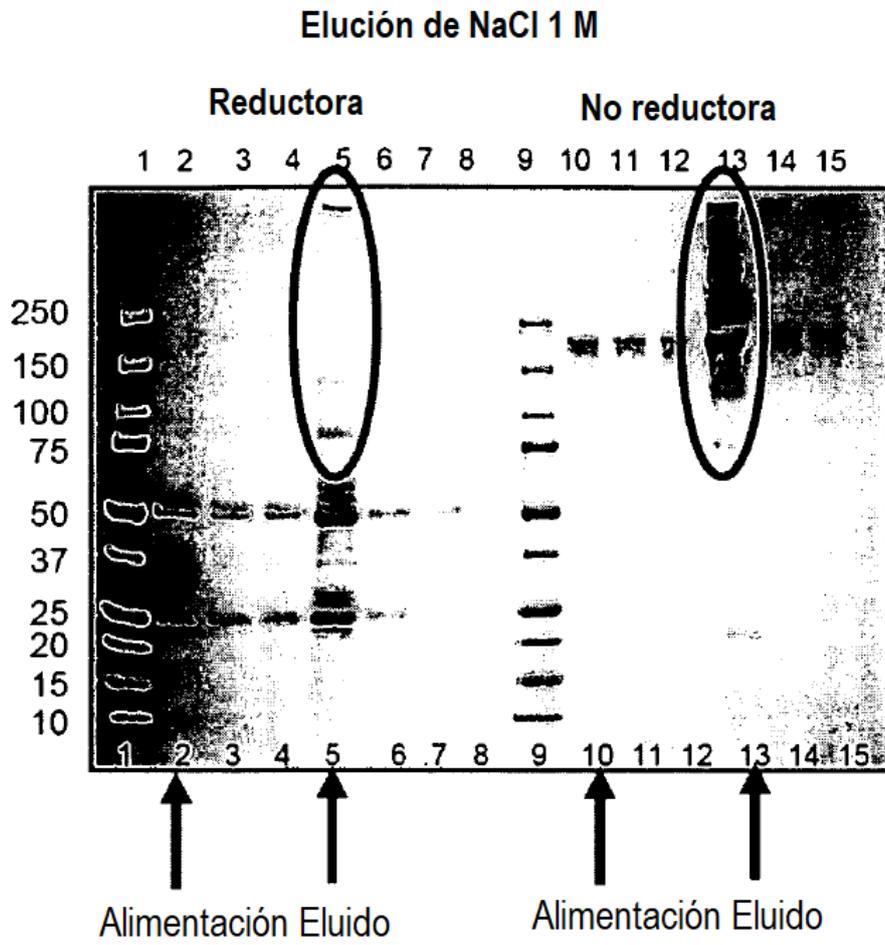


Fig. 4

Elución de agua desionizada

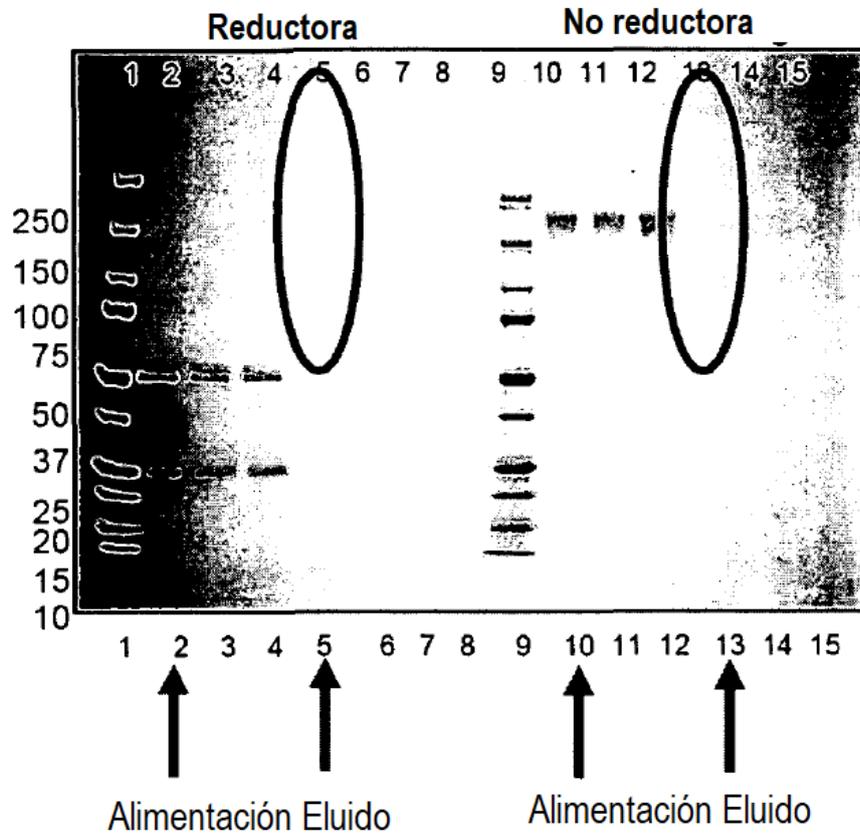


Fig. 5

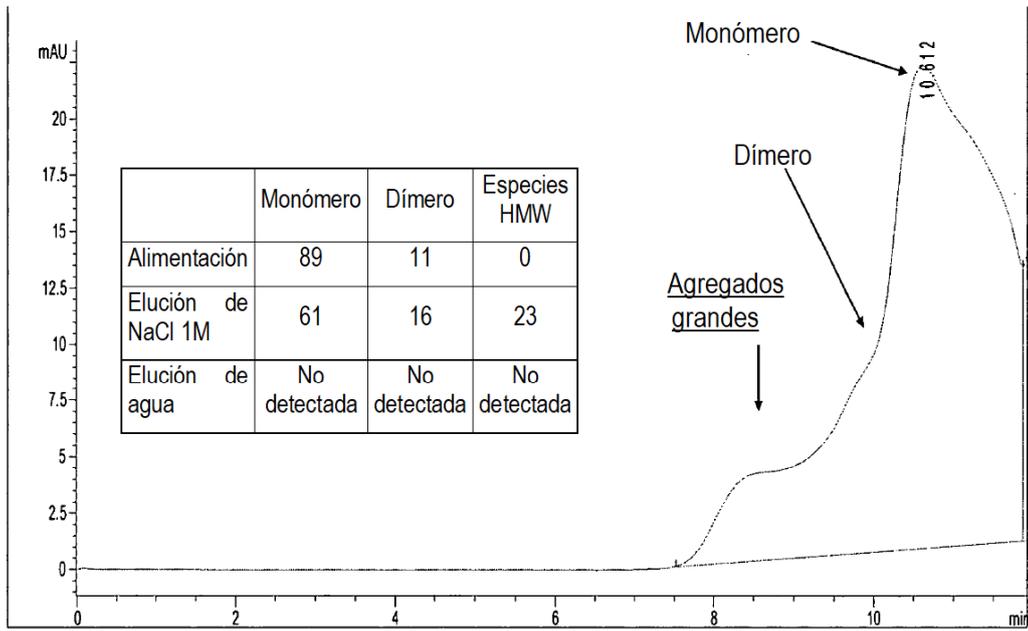


Fig. 6

Modo Desacoplado

Ventajas

- o Utilizado más comunmente en la industria
- o Reivindicación máxima de LRV
- o Configuración menos complicada

Desventajas

- o Tiempo de validación aumentado
- o Potencial para rendimiento reducido después de la adición de la siembra de virus

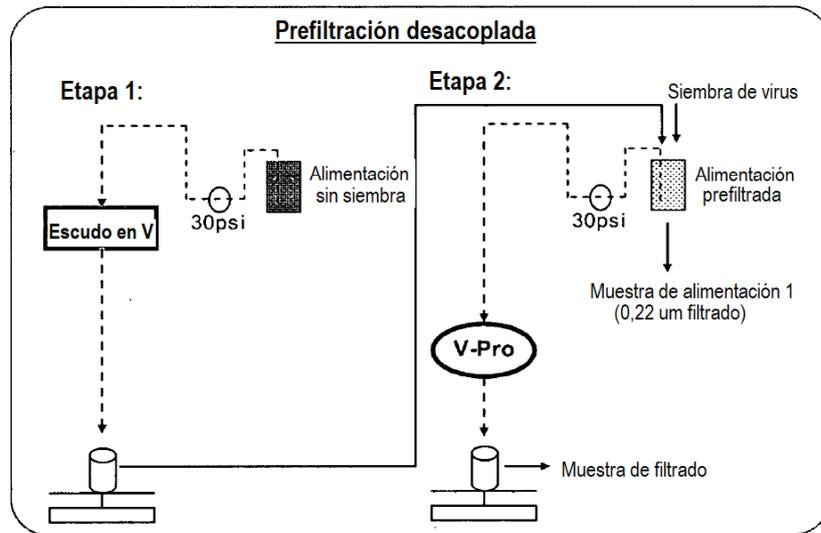


Fig. 7

Modo por siembra en cruz (acoplado)

Ventajas

- Más representativo del proceso a escala
- Tiempo de ejecución mínimo

Desventajas

- Potencial pérdida de virus a lo largo de escudo en V

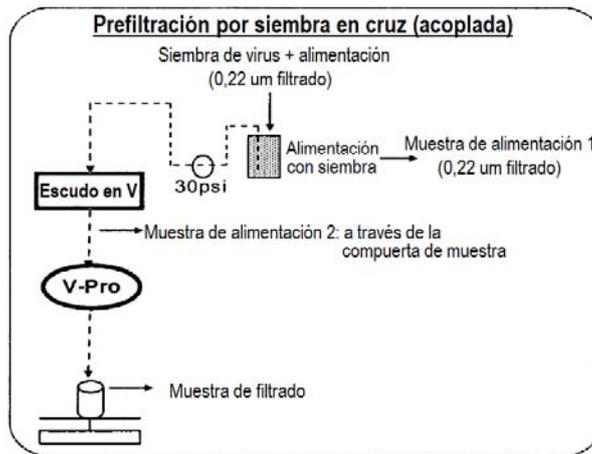


Fig. 8