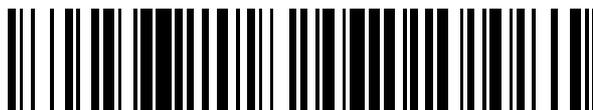


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 199**

51 Int. Cl.:

B01D 61/14	(2006.01)
B01D 65/08	(2006.01)
A61L 2/00	(2006.01)
B01D 67/00	(2006.01)
B01D 71/68	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C07K 1/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015** **E 15275265 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 3037155**

54 Título: **Eliminación de microorganismos de medios de cultivo celular mediante membranas microporosas**

30 Prioridad:
22.12.2014 US 201462095259 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2018

73 Titular/es:
EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US

72 Inventor/es:
PETERS, ANTONI y
GODDARD, PHILIP M

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 666 199 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

Eliminación de microorganismos de medios de cultivo celular mediante membranas microporosas

5 Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a composiciones y métodos para eliminar microorganismos, incluyendo virus, de medios de cultivo celular.

10 Los procedimientos convencionales para la producción de proteínas típicamente implican métodos de cultivo celular, por ejemplo, cultivo de líneas celulares de mamífero o bacterianas modificadas por ingeniería genética en forma recombinante para producir la proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) en un biorreactor utilizando un medio de cultivo celular químicamente definido. La reducción de la contaminación del biorreactor por microorganismos tales como bacterias, hongos, micoplasmas y virus es una consideración importante para la industria biofarmacéutica, especialmente cuando la proteína de interés es para uso terapéutico.

15 Los microorganismos, bacterias, hongos y micoplasmas típicamente se pueden eliminar filtrando el medio de cultivo celular a través de filtros apropiados. Por ejemplo, las membranas de microfiltración con valores nominales de tamaño de poro de 0,2 μm se consideran apropiadas para la eliminación de bacterias del género *Brevundimonas diminuta*. Las membranas con valores de tamaño de poro nominal de 0,1 μm se consideran adecuadas para la eliminación de micoplasmas, principalmente del género *Acholeplasma laidlawii*. Véase, por ejemplo, Folmsbee y Moussorakis, BioProcess International, vol. 10, No. 5, 2012, páginas 60-62 (mayo de 2012). Además, una membrana con un valor nominal de tamaño de poro de 20 nm se considera adecuada para efectuar una reducción mínima de 4 log en parvovirus o partículas similares a parvovirus, que representan el virus más pequeño.

25 Se considera desafiante generar membranas con valores de tamaño de poro para la eliminación de virus, ya que la reducción del valor de tamaño de poro en el grado necesario para retener virus puede dar como resultado la constricción parcial o completa de los poros de la membrana, reduciendo significativamente la permeabilidad de la membrana hasta niveles indeseables. A propósito, actualmente no existen filtros de membrana disponibles comercialmente que estén específicamente diseñados para la eliminación de virus en el proceso inicial y que sean efectivos para hacerlo.

30 Una de las razones por las que los filtros de barrera para virus que se usan típicamente al inicio de la etapa de cultivo celular no son efectivos para la eliminación de virus posteriormente se debe a diferencias notables entre las composiciones inicial y posterior. Por ejemplo, en el caso del proceso inicial, no hay células o proteínas expresadas en el medio de cultivo celular. Sin embargo, existen nutrientes, lípidos, aminoácidos y otros componentes (por ejemplo, Pluronic F68 que proporciona protección celular hidrodinámica), todos los cuales son necesarios para el crecimiento y la viabilidad celular. Por el contrario, en el caso del proceso posterior, el medio de cultivo celular contiene células, restos celulares y proteínas de células huésped, así como también la proteína que se expresa. Por lo tanto, en el caso del proceso posterior, el medio de cultivo celular a menudo se somete a varias etapas de purificación para eliminar las impurezas indeseables del filtro de virus, antes de someterse a una etapa de filtración de virus.

45 En particular, debido a las diferencias en la naturaleza de las composiciones que requieren purificación, por ejemplo, un medio de cultivo celular químicamente definido en el caso de la eliminación de virus inicial frente a un medio de cultivo celular que contiene una proteína recombinante expresada en el caso de eliminación posterior de virus, los filtros de membrana que se usan típicamente posteriormente para la eliminación del virus no tienden a ser tan efectivos para el mismo propósito cuando se usan al comienzo, por ejemplo, Zydney et al., Journal of Membrane Science, 297: 16-50 (2007).

50 Se han realizado intentos para desarrollar filtros de barrera de virus que se pueden usar específicamente al comienzo para filtrar un medio de cultivo celular químicamente definido. Por ejemplo, Biotechnol Prog., 16: 425-434 (2000), analiza los resultados de retención de virus obtenidos con una variedad de filtros. Como se demuestra en este documento, un filtro de celulosa regenerada mostró el mayor flujo de cualquier filtro que se probó y también exhibió una alta retención de virus; sin embargo, dicha membrana no es adecuada para la esterilización mediante vapor en el lugar o por radiación gamma, los métodos de esterilización típicamente empleados en la industria actual.

55 Aunque, este documento también describió un filtro de PES, este filtro se consideró generalmente indeseable para uso como un filtro de barrera de virus para uso al comienzo debido a su bajo flujo.

60 Además, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20130344535 analiza la filtración de un medio de cultivo celular químicamente definido para eliminar contaminantes víricos usando un tiempo de filtración de más de 24 horas y usando un filtro de cierta porosidad. El documento WO 02/087734 divulga una membrana porosa que es "resistente a las biomoléculas" y está provista de un recubrimiento hecho de al menos dos monómeros, siendo uno de dichos monómeros, por ejemplo, diacetona acrilamida. En el documento US 2012/048799, los recubrimientos de acrilamida se usan como alternativa para PEGDA. El documento US 6.083.393 también describe membranas microporosas recubiertas con monómeros de PEGDA que se polimerizan con el efecto, por ejemplo, de baja adsorción de proteínas. El documento US 5.863.650 divulga recubrimientos para aplicaciones de biotecnología

- 5 mediante el uso de acrilamidas entrecruzadas en general. El documento WO 2013/192009 es otra divulgación que trata sobre la eliminación de la contaminación viral del medio de cultivo celular. Las realizaciones de la invención descrita en este documento proporcionan membranas porosas que se modifican superficialmente con nuevas composiciones como se define en la reivindicación 1 para eliminar microorganismos, especialmente virus, de un medio químicamente definido usado para cultivar células que expresan una proteína de interés. Por consiguiente, tales composiciones se pueden usar antes de la etapa de transferir un medio de cultivo celular a un biorreactor para cultivar células, por ejemplo, células de mamífero que expresan una proteína recombinante de interés.
- 10 Las composiciones descritas en este documento se basan en modificaciones superficiales de membranas que dan como resultado membranas que exhiben una obstrucción reducida por uno o más componentes en un medio de cultivo celular químicamente definido, cuando dicho medio se filtra a través de la membrana.
- 15 En diversas realizaciones, el polímero que comprende monómeros entrecruzados y dispuestos al azar de diacetona acrilamida y uno o más monómeros entrecruzables que no son de acrilamida, se recubre directamente sobre la superficie de una membrana porosa usando una fuente de energía. Los ejemplos de fuentes de energía incluyen, entre otras, calor, haz de electrones, luz ultravioleta y radiación gamma.
- 20 De acuerdo con la invención, el monómero entrecruzable que no es de acrilamida es diacrilato de polietilenglicol (PEGDA).
- En algunas realizaciones, la membrana porosa es una membrana asimétrica tal como, por ejemplo, una membrana de polietersulfona (PES).
- 25 También se proporcionan aquí métodos para usar las membranas porosas modificadas descritas para eliminar un microorganismo, tal como un contaminante viral de un medio de cultivo celular químicamente definido, por ejemplo, filtrando un medio de cultivo celular químicamente definido a través de la membrana modificada.
- 30 En algunas realizaciones, se proporciona un método para eliminar uno o más contaminantes virales de un medio de cultivo celular químicamente definido, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo celular químicamente definido; y (b) filtrar el medio de cultivo celular químicamente definido a través de una membrana porosa antes o durante la transferencia del medio a un biorreactor, donde la membrana tiene una superficie modificada con un polímero que comprende monómeros de diacetona acrilamida dispuestos aleatoriamente y entrecruzados y uno o más monómeros entrecruzables de diacrilato de polietilenglicol (PEGDA) sin acrilamida, en el que el nivel de uno o más contaminantes virales en el medio de cultivo celular químicamente definido dentro del biorreactor es menor que el nivel antes de filtrar el medio a través de la membrana modificada.
- 35 En algunas realizaciones, las membranas modificadas descritas en este documento se incorporan en un dispositivo. Los ejemplos de formatos de dispositivo incluyen, pero no se limitan a, un disco, un cartucho plisado, un cartucho enrollado en espiral y una lámina plana de múltiples placas.
- 40 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular químicamente definido es un medio de cultivo celular químicamente definido comercialmente disponible tal como, por ejemplo, Lonza Power CHO, CD Opti CHO, EMD Millipore Cellvento CHO 100 y Cellvento CHO 200.
- 45 El nivel de uno o más contaminantes virales en un medio de cultivo celular químicamente definido se reduce en al menos 1 valor de reducción Log_{10} (LRV) o al menos 4 LRV o al menos 6 LRV, usando las membranas modificadas que se describen en este documento.
- 50 En diversas realizaciones, un medio de cultivo celular químicamente definido se filtra a través de una membrana modificada descrita en este documento durante un período de menos de 24 horas. En algunas realizaciones, la filtración se realiza a un pH que varía de 4 a 8 y/o a una temperatura que varía de 20°C a 25°C.
- 55 También se proporcionan en la presente memoria métodos para reducir la obstrucción de una membrana de retención de virus por uno o más componentes en un medio de cultivo celular químicamente definido, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una membrana de retención de virus; y (b) modificar la membrana con un polímero que comprende monómeros entrecruzados y dispuestos aleatoriamente de diacetona acrilamida y uno o más monómeros entrecruzables que no son de acrilamida, donde la obstrucción de la membrana modificada por uno o más componentes en un medio de cultivo celular químicamente definido se reduce en relación con una membrana no modificada.
- 60 En algunas realizaciones, una membrana retenedora de virus se basa en una membrana de PES, una membrana de PVDF, una membrana celulósica o una membrana de nailon.
- 65 En todas las realizaciones, el monómero entrecruzable que no es de acrilamida es diacrilato de polietilenglicol (PEGDA).

Las diversas realizaciones descritas antes o después, incluidas las reivindicaciones, pueden usarse entre sí a menos que sean técnicamente incompatibles. Todas estas combinaciones técnicamente compatibles de 2, 3, 4 o más realizaciones se contemplan específicamente.

5 La Figura 1 es un gráfico de barras que representa los resultados de desempeño de rendimiento para una membrana de PES modificada con homopolímero de diacetona acrilamida (DACm) con y sin exposición a Pluronic F68 usando un medio de cultivo de células CHO como corriente de alimentación. Los primeros cinco conjuntos de datos representan el desempeño de membrana de las membranas modificadas usando diferentes porcentajes de una solución de DACm (2%, 4%, 6%, 8% y 10%), según lo medido por V75 (L/m^2), V90 (L/m^2) y permeabilidad 10X (L/m^2 h psi); y los siguientes cinco conjuntos de datos representan el desempeño de la membrana de las mismas membranas con exposición a F68, también según lo medido por V75 (L/m^2), V90 (L/m^2) y permeabilidad 10X (L/m^2 h psi).

15 La Figura 2 representa curvas de decaimiento de flujo para dispositivos de membrana que contienen membrana de PES modificada con 4% de DACm-1% de MBAm o membrana de PES modificada con 4% de DACm-1% de PEGDA o una membrana de PES modificada con 1% de HPC (como control), analizadas por duplicado. El eje Y representa el decaimiento de flujo representado como un porcentaje de $(J/J_0)\%$, que es el porcentaje basado en el flujo J_0 determinado para un flujo de alimentación que no se taponan u obstruye (por ejemplo, agua Milli-Q) y el eje X representa el rendimiento o la capacidad de las membranas expresados por litros de filtrado recogido por metro cuadrado de membrana (L/m^2).

25 La Figura 3 representa un gráfico de barras que representa las capacidades y permeabilidades de las membranas de PES modificadas con 4% de DACm-1% de MBAm, 4% de DACm-1% de PEGDA y 1% de HPC (como control). Se usa un medio de cultivo celular químicamente definido de células CHO como la corriente de alimentación. El eje X representa la membrana y el eje Y representa V75 (L/m^2), V90 (L/m^2) y permeabilidad 10X (L/m^2 h psi).

30 La Figura 4 es un gráfico de barras que representa las capacidades y permeabilidades promedio de los diversos dispositivos de membrana probados, como V75, V90 y permeabilidad 10X medidos. Cada dispositivo de membrana está construido para alojar una sola capa (1L-) de cada una de las diversas membranas de superficie modificada. 1% de HPC se refiere a un dispositivo de membrana de una sola capa que tiene un pretratamiento de polímero adsorbido aplicado por inmersión y que comprende una solución acuosa de 1% en peso de hidroxipropil celulosa (HPC) con 10% de hexilenglicol usado como adyuvante de humectación de membrana; 3,75% de LB20 se refiere a un dispositivo de membrana de una sola capa que tiene un monómero de triacrilato altamente etoxilado autoentrecruzado aplicado a una concentración de 3,75% mediante curado por haz de electrones *in situ*; 4,00% de DACm-1% de MBAm se refiere a un dispositivo de membrana de una sola capa que tiene 4% de diacetona acrilamida (DACm), un monómero vinílico monofuncional, y 1% de metileno-bis-acrilamida (MBAm), un entrelazador de diacrilamida que forma un copolímero con DACm; 2,00% de LB20-1% de HEA-0,75% de TEGDA se refiere a un dispositivo de membrana de una sola capa que tiene 2% de LB20, 1% de acrilato de hidroxietilo (HEA) y 0,75% de diacrilato de tetraetilenglicol, un monómero bifuncional o entrelazador; y 4,00% de DACm-1% de PEGDA575 se refiere a un único dispositivo de membrana que tiene un 4% de DACm y un 1% de PEGDA575, que es un diacrilato de polietilenglicol con un peso molecular promedio en número de 575.

45 La Figura 5 describe un gráfico que representa curvas de volumen promedio frente a tiempo para cada uno de los dispositivos de membrana de una sola capa analizados por duplicado. Los dispositivos de membrana probados son: 1% de HPC; 3,75% de LB20; 4,00% de DACm-1% de MBAm; 2,00% de LB20-1% de HEA-0,75% de TEGDA; y 4,00% de DACm-1% de PEGDA575. El eje X representa el volumen (ml) de filtrado recogido después de pasar un medio de cultivo de células CHO a través de los diversos dispositivos de membrana; y el eje Y representa el tiempo (minutos).

50 La Figura 6 describe un gráfico que representa las curvas de decaimiento de flujo obtenidas a partir de cada uno de los dispositivos de membrana de una sola capa probados por duplicado. Los dispositivos de membrana probados son: 1% de HPC; 3,75% de LB20; 4,00% de DACm-1% de MBAm; 2,00% de LB20-1% de HEA-0,75% de TEGDA; y 4,00% de DACm-1% de PEGDA575. El eje X representa la capacidad de la membrana (L/m^2) y el eje Y representa el decaimiento del flujo (J/J_0). Como se representa en la Figura 6, el dispositivo de membrana modificado con copolímero DACm-PEGDA575 tenía una ventaja de desempeño de rendimiento sobre las otras modificaciones probadas, por medio de un decaimiento de flujo más lento.

60 La Figura 7 describe un gráfico de barras que representa las capacidades y permeabilidades de una serie de diversos dispositivos de membrana antes y después del tratamiento térmico, medido por V75 (L/m^2), V90 (L/m^2) y permeabilidad 10X (L/m^2 h psi). Los dispositivos de membrana probados se dividen en tres categorías: membrana modificada sin tratamiento térmico (AM), que son los siguientes: 1L-DP4100 AM (es decir, 4,00% de DACm-1% de PEGDA); 2L-DP4100 AM1; e IL-DP4100 AM2; membrana modificada tratada en autoclave en el dispositivo a 134°C durante 1 hora (ACD), que son las siguientes: 1L-DP4100 ACD; IL-DP4125 ACD (es decir, 4,00% de DACm-1,25% de PEGDA) e IL-DP4 150 ACD (es decir, 4,00% de DACm-1,50% de PEGDA); membrana modificada tratada en autoclave a 134°C durante 1 hora seguido de la configuración del dispositivo (ACM), que son los siguientes: IL-DP4100 ACM; IL-DP4125 ACM e IL-DP4150 ACM. Se usa una membrana de 1% de HPL de una sola capa como

control. El eje X representa los diversos dispositivos de membrana y el eje Y representa las capacidades V75, V90 y permeabilidades 10X, tal como se determinó utilizando 4 g/L de IgG derivada de plasma humano en regulador de acetato a pH 4 y conductividad de 2 mS/cm.

5 La Figura 8 es un gráfico de barras que representa las capacidades y permeabilidades de las membranas antes (AM) y después del tratamiento térmico en seco (DH), medido por V75 (L/m^2), V90 (L/m^2) y permeabilidad 10X (L/m^2 h psi). Las membranas ensayadas se moldearon a partir de polímeros de PES de dos fuentes diferentes, denominadas P1 y P2 en este documento. Los dispositivos de membrana probados son: 1% de HPC P1 y 1% de HPC P2 como controles; membranas modificadas sin tratamiento térmico (AM), que son las siguientes: DP4100 AM P1; DP4200 AM P1 (es decir, 4,00% de DACm-2,00% de PEGDA); DP4100 AM P2 y DP4200 AM P2; membranas modificadas tratadas con calor seco (DH), que son las siguientes: DP4100 DH P1, DP4100 DH P2 y DP4200 DH P2. El eje X representa los diversos dispositivos de membrana y el eje Y representa las capacidades V75, V90 y las permeabilidades 10X, tal como se determinó utilizando 4 g/L de IgG derivada de plasma humano en regulador de acetato a pH 4 y conductividad de 2 mS/cm.

15 Las Figuras 9a y 9b son gráficos de barras que representan el logaritmo del valor de retención (LRV) Phi-X174 de varias membranas antes y después del tratamiento de vapor en el lugar (SIP), medido al inicio del experimento (LRV inicial, mostrado en 9a) y al final del experimento (LRV final, mostrado en 9b). Las membranas ensayadas se moldean a partir de polímeros de PES de dos fuentes diferentes, denominadas P1 y P2 y se prueban por duplicado (denominadas A y B). Los dispositivos de membrana probados son: 1% de HPC P1 como control sin tratamiento térmico (AM), usado por duplicado (denominado como 1% de HPC P1 AM A y B); membranas modificadas (es decir, 4,00% de DACm-1,00% de PEGDA) sin tratamiento térmico (AM), que son las siguientes: DP4100P1 AM A; DP4100 P2 AM A; DP100 P2 AM A; D4 100 P1 AM B; y D4100P2 AM B; y membranas modificadas (es decir, 4,00% de DACm-1,00% de PEGDA) con tratamiento de vapor en el lugar (SIP), que son las siguientes: DP4100P1 SIP A; DP4100P2 SIP A; DP4100 P1 SIP B; y DP4100 P2 SIP B. El eje X representa los diversos dispositivos de membrana y el eje Y representa el LRV.

20 La Figura 10 es un gráfico de barras que representa la capacidad promedio y los resultados de permeabilidad (V75, V90 y permeabilidad 10X) obtenidos con membranas de PES modificadas con PEGDA-575 que varían de 2 a 5% usando un medio de cultivo de células CHO químicamente definido. Se usa 1% de membrana HPC como control.

25 La Figura 11 es un gráfico de barras que representa la capacidad de las membranas de PES modificadas con PEGDA-575 que varían de 2 a 5% y el área mínima requerida para filtrar 1.000 litros de medio en 4 horas. 1% de HPC se utiliza como membrana de control. El eje y izquierdo representa el volumen del filtrado Opti-CHO y la capacidad de la membrana en 150 minutos y el eje Y derecho representa el área mínima para filtrar 1.000 litros en cuatro horas.

30 La Figura 12 es un gráfico de barras que representa las capacidades de varias membranas usando 3 medios químicamente definidos diferentes (es decir, Cellvento CHO-200, CD Opti-CHO y DMEM enriquecido con 2g/L de Pluronic F68). Las membranas probadas son: PES modificada con 1% de HPC (utilizada como control); la membrana de PES modificada con 4% de DACm-1% de PEGDA; la membrana de PES modificada con 0% de DACm-1% de PEGDA; la membrana de PES modificada con 1% de DACm-1% de PEGDA; y la membrana de PES modificada con 4% de DACm-1% de PEGDA. El eje X representa el tipo de membrana y el eje Y representa Amin, que es el área mínima requerida para filtrar 1.000 litros de medio en 4 horas.

35 Las realizaciones descritas en este documento se refieren a composiciones y métodos para eliminar un microorganismo, por ejemplo, un contaminante de virus, de un medio de cultivo celular químicamente definido, donde las composiciones exhiben una obstrucción reducida por componentes de medios de cultivo celular químicamente definidos.

40 En particular, las realizaciones descritas en este documento proporcionan composiciones y métodos que emplean una membrana porosa que tiene una superficie modificada con un polímero que comprende monómeros entrecruzados y dispuestos aleatoriamente de diacetona acrilamida y uno o más monómeros entrecruzables que no son de acrilamida, en donde el monómero entrecruzable es diacrilatos de polietilenglicol.

45 También se proporcionan en la presente invención métodos para fabricar membranas de barrera para virus resistentes a la obstrucción por uno o más componentes de medios de cultivo celular químicamente definidos mediante la modificación de la superficie de tales membranas con un polímero que comprende monómeros de diacetona acrilamida dispuestos aleatoriamente y entrecruzados y uno o más monómeros entrecruzables que no son de acrilamida (por ejemplo, PEGDA).

50 Para que las realizaciones divulgadas en este documento puedan entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

55

I. Definiciones

El término "medio de cultivo celular químicamente definido" se refiere a un medio de cultivo adecuado para el cultivo celular de células de mamífero (por ejemplo, células humanas o animales), en el que se conocen todos los componentes químicos. Los ejemplos de medios de cultivo celular definidos químicamente disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a, Lonza Power CHO, CD Opti CHO, EMD Millipore Cellvento CHO 100 y Cellvento CHO 200.

Se ha demostrado que los compuestos anfífilos protectores de las células hidrodinámicas, en particular Pluronic F68 (BASF) y/o Poloxámero 188 (ICI) son los principales componentes de los medios responsables de la obstrucción del filtro de membrana en diversos cultivos celulares químicamente definidos comercialmente disponibles. Debido a que se ha observado que uno o más de estos componentes causan obstrucción de la membrana, estos reducen significativamente la efectividad de los filtros de membrana para eliminar los contaminantes del virus.

Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a composiciones de membrana que son eficaces para eliminar contaminantes virales incluso en presencia de componentes de medios que se sabe que obstruyen las membranas, por ejemplo, Pluronic F68.

Los términos "contaminante", "impureza" y "residuos", como se usan de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a un microorganismo indeseable u objetable que puede estar presente en un medio de cultivo celular químicamente definido. En una realización particular, dicho microorganismo es un virus o una partícula de virus. En diversas realizaciones, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pretenden eliminar eficazmente dichos contaminantes virales de un medio de cultivo celular químicamente definido filtrando el medio de cultivo celular químicamente definido a través de un filtro de membrana que se modifica para reducir o eliminar la obstrucción por ciertos componentes que están típicamente presente en medios de cultivo celular químicamente definidos comercialmente disponibles. De acuerdo con esto, las realizaciones descritas en este documento proporcionan composiciones que conservan su capacidad de retención de virus y rendimiento de la membrana incluso cuando se exponen a componentes que típicamente obstruyen la mayoría de las membranas de retención de virus.

Los contaminantes virales o contaminantes virales potenciales que pueden eliminarse usando las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen un miembro de las familias de Orthomyxoviridae, Arenaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Arteriviridae, RetParvoviridae, Bunyaviridae, Calciviridae, Retroviridae, Reoviridae, Circoviridae, Adenoviridae, Poxviridae, Herpesviridae, Iridoviridae o Reoviridae. Más específicamente, el contaminante viral puede ser cualquiera de los siguientes: Parvoviridae canino (CPV), virus diminuto de ratones (MVM), virus Cache Valley, virus Bunyamwera, virus de la encefalitis de Northway, virus de la influenza NB, virus Junín, virus de Parainfluenza 1/2/3, Virus de simio 5, virus de las paperas, virus sincitial respiratorio bovino, virus Sendai, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la neumonía de ratones, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, coronavirus bovino, virus de la hepatitis murina, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis de San Luis, Vesivirus 2117, virus de la encefalomiocarditis, virus B-3 de Coxsackie, virus de la encefalitis de ratón de Theiler, virus de la fiebre aftosa, enterovirus bovino, enterovirus porcino, virus del bosque Semliki, virus Sindbis, virus de la rubéola, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis equina oriental, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus espumoso, reovirus 1/2/3, reovirus aviar, rotavirus, circovirus porcino 1, adenovirus, virus de pseudorrabia, herpes gamma de murino 68, virus del herpes simple 1, virus 3 de rana, virus diminuto de ratones cortadores (MVMc), virus de la lengua azul (BTV), virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), parvovirus porcino (PPV), virus de la encefalomiocarditis (EMCV), Reovirus 3 y virus de la leucemia murina (MuLV), Hepatitis A, polio o Parvoviridae B19.

El término "valor de reducción logarítmica" (LRV), como se usa en el presente documento, se refiere a una medida de la eficacia de una membrana para retener una partícula, por ejemplo, un contaminante de virus, definido como el logaritmo (base 10) de la relación del conteo de partículas en una corriente de alimentación (por ejemplo, un medio de cultivo celular químicamente definido) al recuento de partículas en el permeado de la membrana del filtro de virus. En diversas realizaciones descritas en este documento, los filtros de membrana alcanzan al menos un valor de reducción 1 Log_{10} (LRV) para un contaminante viral, o al menos un 2 LRV para un contaminante viral, o al menos un 3 LRV para un contaminante viral, o al menos un 4 LRV para un contaminante viral, o al menos un 5 LRV para un contaminante viral, o al menos un 6 LRV para contaminante viral, o al menos un 7 LRV para contaminante viral, o al menos un 8 LRV para contaminante viral, preferiblemente al menos un 4 LRV para un contaminante viral.

El término "obstrucción" se refiere a un proceso en el que soluto o partículas se depositan sobre la superficie de la membrana o en los poros de la membrana de una manera que degrada el rendimiento de la membrana, tal como disminución del flujo y/o rendimiento de la membrana. En diversas formas de realización descritas en la presente memoria, se proporcionan filtros de membrana para virus que son resistentes o presentan una obstrucción reducida por uno o más componentes presentes en un medio de cultivo celular químicamente definido. Además, los métodos

proporcionados en la presente memoria se pueden usar para preparar composiciones que son resistentes o muestran una obstrucción reducida por uno o más componentes de un medio de cultivo celular químicamente definido.

5 El término "flujo" o "flujo de membrana" (J), como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad instantánea de flujo del permeado, que es generalmente de naturaleza variable (expresado como el volumen o peso de una solución de permeado que pasa a través de la membrana de filtración de virus por unidad de área de filtración efectiva (EFA) por unidad de tiempo, por ejemplo $L/(m^2 \times h)$, o $g/(m^2 \times h)$, o $Kg/(m^2 \times h)$).

10 El término "flujo inicial" o "flujo inicial de membrana" (J_0), como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad de flujo del permeado, que normalmente es de naturaleza constante, cuando la corriente del permeado consiste en un fluido sin obstrucción (es decir, agua o una solución que no contiene componentes que obstruyen la membrana).

15 El término "decaimiento de flujo" o "decaimiento de flujo de membrana" (J/J_0), como se usa en el presente documento, se refiere a la relación del flujo de membrana instantáneo en una corriente de permeado obstructiva con respecto al flujo inicial o al flujo determinado por el paso de una corriente de permeado no obstructiva a través del filtro o la membrana. A menudo se representa como un porcentaje, es decir, $(J/J_0)\%$.

20 El término "curva de decaimiento de flujo" se refiere a la curva generada cuando el decaimiento del flujo (J/J_0) se grafica frente al tiempo (t), o frente al volumen (v) o frente a la masa (m) del filtrado recogido, o preferiblemente, frente al volumen (v) o frente a la masa (m) de filtrado recogido por unidad de área de filtración efectiva (es decir, $(J/J_0)\%$ frente a L/m^2 , o $(J/J_0)\%$ frente a Kg/m^2).

25 El término "desempeño del rendimiento" se refiere en la presente memoria a la cantidad de filtrado que se puede recuperar por unidad de área del área de filtración efectiva antes de que el flujo caiga al 25%, o al 10%, del flujo inicial (flujo determinado para una corriente no obstructiva).

30 El término "filtración discontinua" se refiere en la presente memoria a un proceso de filtración en el que una cantidad o volumen específico de un medio químicamente definido se filtra a través de un filtro de membrana en un lote para completar el proceso de filtración, antes de transferir el medio filtrado o usarlo en la siguiente etapa en un proceso.

35 El término "filtración continua" o "filtración en línea" se refiere a un proceso de filtración, en el que la cantidad o volumen específico de un medio de cultivo celular químicamente definido se filtra a través de un filtro de membrana en forma continua en el que el medio filtrado se transfiere o puede usarse en la siguiente etapa en el proceso mientras se filtra.

Todas las realizaciones descritas en este documento se pueden realizar usando filtración discontinua o continua.

40 El término "soporte sólido", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a cualquier material que se modifique con un polímero que comprende monómeros entrecruzados y dispuestos aleatoriamente de diacetona acrilamida y uno o más monómeros entrecruzables que no son de acrilamida. Un ejemplo de monómero entrecruzable sin acrilamida es diacrilato de polietilenglicol (PEGDA).

45 Los ejemplos de formatos de soporte sólido usados en los métodos y composiciones descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, membranas y monolitos. En una realización particular, el soporte sólido es una membrana porosa cuya superficie se modifica como se describe en este documento. Las membranas a modo de ejemplo incluyen membranas asimétricas porosas, por ejemplo, una membrana de polietersulfona (PES), tales como membranas preparadas usando el proceso descrito en la publicación de la patente estadounidense No. 20120076934.

50 Como se usa en el presente documento, el término "superficie" se refiere al área superficial completa de un medio o membrana porosa, que incluye superficies externas y la superficie interna del medio o membrana porosa. El término "superficie externa" significa una superficie que está expuesta a la vista. El término "superficie interna" pretende indicar la superficie interna de una red porosa, es decir, el área intersticial, de un medio o membrana porosa.

55 Como se usa en el presente documento, el término "polímero" se refiere a un polímero preparado a partir de al menos dos monómeros entrecruzados que tienen sitios reactivos, en el que los monómeros están dispuestos aleatoriamente y pueden participar en una reacción de polimerización y el que al menos un monómero es diacetona acrilamida. En algunas realizaciones, un polímero comprende diacetona y al menos uno o más monómeros entrecruzables sin acrilamida tales como, por ejemplo, diacrilato de polietilenglicol (PEGDA).

60 Un monómero monofuncional es uno que tiene un solo grupo funcional insaturado. Los monómeros polifuncionales son moléculas que tienen más de un grupo funcional insaturado.

65 El término "filtro de virus" o "filtro de retención de virus" o "filtro de retención viral" o "filtro de barrera de virus" se refiere a una membrana o medio que retiene virus o partículas similares a virus para permitir la remoción de virus o

5 eliminación de virus durante el uso inicial (es decir, filtración de un medio de cultivo celular antes del contacto con las células) o el uso posterior (es decir, filtración de un medio de cultivo celular que contiene una proteína expresada de manera recombinante). Los ejemplos de filtros de retención de virus disponibles comercialmente incluyen Viresolve® Pro, Viresolve® NFP y Viresolve® NFR, que funcionan principalmente a través de un mecanismo de exclusión de tamaño. Las realizaciones descritas en este documento se refieren a filtros de barrera de virus que están destinados para ser usados al comienzo y están situados al inicio de un biorreactor utilizado para cultivar células que expresan una proteína de interés. Dichos filtros de barrera para virus se modifican de modo que sean resistentes o muestren una obstrucción reducida por uno o más componentes de un medio de cultivo celular definida químicamente.

10 El término "alimentación" o "corriente de alimentación", como se usa intercambiamente en la presente memoria, se refiere a una solución o mezcla que se someterá a un proceso de filtración, por ejemplo, un medio de cultivo celular definido químicamente.

15 El término "filtrado" o "permeado", como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, se refiere a la solución que cruza un filtro o membrana, así como a la solución que ha cruzado un filtro o membrana.

El término "fracción retenida", como se usa en el presente documento, se refiere al componente de la solución que es retenido y no atraviesa un filtro o membrana, así como aquel que no ha cruzado un filtro o membrana.

20 El término "biorreactor", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier dispositivo o sistema fabricado o diseñado que soporta un entorno biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso de cultivo celular que implica organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Tal proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. En algunas realizaciones, un biorreactor varía en tamaño desde litros hasta metros cúbicos, y está hecho de acero inoxidable.

25 En algunas realizaciones, un biorreactor está hecho de un material diferente al acero y es desechable o de un solo uso. Se contempla que el volumen total de un biorreactor puede ser cualquier volumen que oscila entre 100 mL hasta 10.000 litros o más, dependiendo de un proceso particular. En algunas realizaciones de acuerdo con los procedimientos y sistemas descritos en este documento, el biorreactor está conectado a un filtro de virus descrito en la presente memoria, en el que el filtro de virus está presente al comienzo del biorreactor.

30 II. Ejemplos de soportes sólidos

35 Las realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan soportes sólidos modificados con un polímero que comprende monómeros entrecruzados dispuestos aleatoriamente. Los soportes sólidos abarcados por la presente solicitud retienen contaminantes víricos presentes en un medio de cultivo celular químicamente definido, incluso en presencia de componentes de cultivo celular que son conocidos por obstruir rápidamente las membranas de retención de virus usadas en aplicaciones de purificación posterior de virus. Los soportes sólidos abarcados por la presente solicitud son resistentes o presentan una obstrucción reducida por uno o más componentes presentes en un medio de cultivo celular químicamente definido.

40 Sin pretender estar atado a la teoría, se contempla que se puede usar cualquier formato de soporte sólido adecuado. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser poroso o no poroso o puede ser continuo, tal como en forma de un monolito o membrana. Los ejemplos de soportes sólidos porosos continuos incluyen membranas microporosas, es decir, que tienen un tamaño de poro entre aproximadamente 0,05 micrómetros y 10 micrómetros. Las membranas porosas que pueden usarse en las composiciones y métodos de acuerdo con las realizaciones descritas en este documento pueden clasificarse como de naturaleza simétrica o asimétrica, que se refiere 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.

50 Como se usa en este documento, el término "membrana simétrica" se refiere a una membrana que tiene un tamaño de poro sustancialmente uniforme a través de la sección transversal de la membrana. En una realización particular, se usa una membrana asimétrica como un soporte sólido. Como se usa en el presente documento, el término "membrana asimétrica" se refiere a una membrana en la que el tamaño promedio de poro no es constante a través de la sección transversal de la membrana. En algunas realizaciones, en el caso de membranas asimétricas, los tamaños de poro pueden variar de manera uniforme o discontinua en función de la ubicación a lo largo de la sección transversal de la membrana. En algunas realizaciones, las membranas asimétricas pueden tener una relación de tamaños de poro en una superficie externa con respecto a los tamaños de poro en la superficie externa opuesta, cuya relación es sustancialmente mayor que uno. Un ejemplo de una membrana asimétrica que puede modificarse, como se describe en este documento, es una membrana de polietersulfona (PES). La membrana de PES puede obtenerse comercialmente de vendedores como Sumitomo y Solvay.

60 Se puede usar una amplia variedad de membranas preparadas a partir de una amplia variedad de materiales en las composiciones y métodos descritos en este documento. Los polímeros ilustrativos que pueden usarse para fabricar las membranas que se pueden utilizar en las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen, pero sin limitación, poli(acrilamidas, poliestirenos, polimetacrilamidas, poliimididas, poli(acrilatos, policarbonatos, polimetacrilatos, polímeros polivinil hidrofílicos, poliestirenos, polisulfonas, polietersulfonas, copolímeros o estireno y divinilbenceno, polisulfonas aromáticas, politetrafluoroetilenos (PTFE), polímeros termoplásticos perfluorados,

65

poliolefinas, poliamidas aromáticas, poliamidas alifáticas, polietilenos de peso molecular ultra alto, difluoruro de polivinilideno (PVDF), polieteretercetonas (PEEK), poliésteres, sustituidos o no sustituidos y combinaciones de los mismos.

5 Ejemplos de membranas microporosas comercialmente disponibles son Durapore® y Millipore Express® disponibles a través de EMD Millipore Corp. (Billerica, MA); Supor® disponible a través de Pall Corp. (Port Washington, NY); y Sartopore® y Sartobran® disponible a través de Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne Cedex, Francia). Otros ejemplos de soportes sólidos continuos son monolitos, tales como materiales monolíticos CIM® disponible a través de BIA Separations (Villach, Austria).

10 Ejemplos de filtros de retención de virus comercialmente disponibles incluyen Viresolve® Pro, Viresolve® NFP y Virosolve® NFR, que funcionan principalmente a través de un mecanismo de exclusión por tamaño. El sustrato de membrana base usado para la fabricación de estos filtros de retención de virus puede modificarse, como se describe en la presente memoria, para dar como resultado membranas que son resistentes o muestran una obstrucción reducida por uno o más componentes de un medio de cultivo celular químicamente definido.

15 III. Métodos de modificación de soportes sólidos

20 En las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, los soportes sólidos adecuados (por ejemplo, una membrana asimétrica, o específicamente, una membrana de PES asimétrica) se modifican con un polímero que comprende monómeros entrecruzados y dispuestos aleatoriamente de diacetona acrilamida y uno o más monómeros entrecruzables sin acrilamida (por ejemplo, diacrilato de polietilenglicol).

25 Se conocen diversos métodos en la técnica para modificar los soportes sólidos que incluyen los descritos en este documento.

30 En diversas realizaciones, la superficie de un soporte sólido (por ejemplo, una membrana porosa) se modifica usando una fuente de energía. Se puede usar una variedad de fuentes de energía para iniciar la modificación a través de una reacción de polimerización, por ejemplo, rayos gamma, rayos X, electrones libres, UV, luz azul y calor. Los métodos de rayos gamma, rayos X y haz de electrones no requieren un iniciador químico adicional para causar la polimerización ya que son lo suficientemente energéticos para ionizar los monómeros neutros. Sin embargo, tanto la luz UV como la luz visible requieren un fotoiniciador para generar especies radicales que luego pueden activar los monómeros en especies altamente reactivas (radicalizadas) que a su vez pueden reaccionar para formar polímeros aleatorios. Esto también es cierto para la polimerización iniciada térmicamente, en la que el iniciador puede o no ser fotoactivo o activar la luz.

35 En algunas realizaciones descritas en este documento, un soporte sólido (por ejemplo, una membrana porosa asimétrica tal como una membrana de polietersulfona) se modifica usando un haz de electrones, como se describe a continuación.

40 Típicamente, usando un proceso de haz de electrones, se sumerge una membrana en una concentración apropiada de una mezcla de monómeros. En caso de que la tensión superficial de la solución de monómero sea demasiado alta, la muestra de membrana se humedece previamente con un alcohol de bajo peso molecular (tal como metanol o isopropanol) y posteriormente se "intercambia" en un baño de agua antes de sumergirse en la solución de monómero. En algunos casos, la solución de monómero tiene una tensión superficial suficientemente baja para humedecer la superficie de la membrana y en este caso, las etapas de prehumectación y de intercambio son innecesarias. A continuación, la muestra de membrana se retira de las soluciones de monómero y se prensa con rodillo para eliminar cualquier exceso de monómero y para asegurar que la solución de monómero se distribuye uniformemente sobre y a lo largo de toda la muestra de membrana. La muestra de membrana se expone luego a electrones libres pasando la muestra de membrana bajo el haz de electrones bajo una capa inerte de nitrógeno o gas argón. En algunas realizaciones, se usa una velocidad de línea de 3 a 10 m/minuto. El voltaje de aceleración del haz de electrones se establece entre 170 y 200 KV y la corriente del haz en combinación con la velocidad de línea se ajusta para suministrar una dosis de 20 a 30 KGy a la muestra de la membrana. Estas condiciones permiten que la muestra de la membrana se modifique por completo a través de toda la sección transversal de la membrana.

55 IV. Métodos para medir el desempeño del rendimiento de las membranas

60 En algunas realizaciones, los soportes sólidos modificados (por ejemplo, una membrana porosa) descritos en este documento se incorporan en dispositivos, por ejemplo, los dispositivos usados en los Ejemplos descritos en este documento, y los dispositivos se usan posteriormente para medir el desempeño del rendimiento de las membranas o dispositivos de membrana.

65 La presente invención se basa, al menos en parte, en las propiedades superiores de las membranas modificadas descritas en la presente memoria, ya que el desempeño del rendimiento de las membranas no se ve afectado adversamente, incluso en presencia de componentes que obstruyen la membrana encontrados en el medio de cultivo celular químicamente definido. Por consiguiente, los métodos de modificación de soportes sólidos descritos

en la presente memoria se pueden usar para reducir la obstrucción de una membrana porosa mediante uno o más componentes de un medio de cultivo celular químicamente definido, cuando se filtra el medio a través de la membrana.

5 El desempeño del rendimiento puede medirse determinando en primer lugar la permeabilidad (flujo/unidad de presión de accionamiento) del dispositivo de membrana utilizando una corriente de alimentación que no obstruye. La corriente de alimentación que no obstruye está compuesta generalmente de agua pura o un regulador acuoso que contiene sales orgánicas y/o inorgánicas disueltas.

10 La permeabilidad de la membrana o del dispositivo de membrana se define como la cantidad de material (en litros o kilogramos) por unidad de área por unidad de tiempo por unidad de presión, a menudo expresada como $L/(m^2 \text{ h psi})$, o "litros por metro cuadrado por hora por psi". Si el experimento se lleva a cabo a una presión de accionamiento constante, el área de filtración efectiva del dispositivo (EFA) y la presión de accionamiento son constantes. Los únicos observables son la masa de filtrado y el tiempo (o el volumen del filtrado y el tiempo). La masa y el volumen se pueden usar indistintamente cuando la densidad del filtrado está muy cerca de la unidad. Cuando la corriente de alimentación no causa obstrucción, la permeabilidad permanece constante y el flujo "regulador" del dispositivo " J_0 " se determina por la pendiente de la línea recta obtenida graficando la masa o el volumen de filtrado recogido frente al tiempo.

20 Cuando se lleva a cabo el mismo experimento con la corriente de obstrucción (por ejemplo, en este caso, medio de cultivo celular químicamente definido), el flujo decaerá con el tiempo a medida que los poros del dispositivo se ocluyan con cualquier especie que cause obstrucción que contenga la corriente de obstrucción. Este flujo simplemente se conoce como "J". Cuando el decaimiento de flujo relativo, expresado como porcentaje (y representado por $(J/J_0)\%$) alcanza un valor predeterminado, digamos 25%, la capacidad de ese dispositivo se define como la cantidad de filtrado (de la corriente de alimentación de obstrucción) por unidad de área del dispositivo que se puede recuperar en el momento en que el flujo ha decaído hasta el 25% del valor de flujo máximo posible del dispositivo, o ese flujo obtenido usando la corriente de alimentación que no causa obstrucción. La capacidad tal como se define en la descripción anterior es una medida numérica o cuantitativa del desempeño del rendimiento. No es la única forma de medir el desempeño del rendimiento, pero es bastante típico.

30 Dos puntos comúnmente usados en los que se determinan las capacidades del dispositivo son: (a) cuando el flujo decae al 25% del flujo máximo del dispositivo (V_{75} - cuando el flujo ha decaído en un 75%); y, (b) cuando el flujo decae al 10% del flujo máximo del dispositivo (V_{90} - cuando el flujo ha decaído en un 90%). Alternativamente, la capacidad también puede definirse como el área de filtración mínima necesaria para filtrar una cantidad fija de una corriente de alimentación particular o como un intervalo de tiempo en el que se filtra una cantidad particular de una corriente de alimentación particular. Todas o cada una de estas cantidades se pueden considerar como una medida o medidas del desempeño del rendimiento.

40 V. Métodos de uso de las composiciones y dispositivos

En diversas realizaciones, las membranas modificadas que retienen virus descritas en la presente memoria se usan al comienzo de un biorreactor con el fin de retener virus que pueden estar presentes en un medio de cultivo celular químicamente definido antes de la transferencia al biorreactor.

45 Por ejemplo, en algunas realizaciones, dicha membrana que retiene virus se incorpora en un dispositivo que luego se esteriliza. El dispositivo se posiciona al comienzo del biorreactor (en el puerto de entrada) usando conectores estériles, y se usa para filtrar un medio de cultivo celular recién preparado en un modo de filtración normal mientras el medio de cultivo celular se transfiere al biorreactor. En consecuencia, cualquier contaminación por parvovirus puede reducirse hasta $1/10.000$ del nivel existente antes de la filtración (lo que corresponde a un valor mínimo de reducción logarítmica (LRV) de 4).

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Métodos para la modificación de una superficie de membrana con un monómero de diacetona acrilamida.

Se exploran diversos métodos para modificar una superficie de membrana con un monómero de diacetona acrilamida.

60 El primer método implica recubrimiento por inmersión. Se prepara una solución acuosa al 10% en peso de hexilenglicol. Se disuelven 6 g de monómero de diacetona acrilamida (DACm) en 194 g de la solución de hexilenglicol-agua para dar como resultado una solución final que es 3% p/p de diacetona acrilamida. Una membrana de virus de polietersulfona (PES) hidrofóbica no modificada altamente asimétrica de 14 cm x 14 cm se coloca en la solución DACm en una bandeja para hornear rectangular Pyrex, de modo que la cara expuesta de la membrana entra en contacto primero con la solución seguido por inmersión de la membrana en la solución de DACm por varios minutos. La membrana se retira y se coloca sobre una lámina absorbente para eliminar el exceso de solución y luego se deja secar al aire sobre toallas de papel en condiciones de secado al aire. La membrana seca

se pone en contacto con agua Milli-Q y presenta humectación instantánea con agua. La membrana húmeda se enjuaga con agua hasta que no se encuentren evidencias del monómero de DACm o residuos del codisolventes hexilenglicol, después de lo cual la muestra se seca nuevamente al aire. Cuando la membrana nuevamente seca se pone en contacto con agua Milli-Q, la membrana no se humedece. No se pudo demostrar ninguna adsorción de ningún monómero de DACm en el sustrato de la membrana de PES, ya que el agua elimina fácilmente el monómero de DACm después del tratamiento inicial con monómero.

En otro experimento, se prepara una solución acuosa al 2,00% en peso de DACm disolviendo 4 g de DACm en 196 g de agua Milli-Q. La solución aplicada sobre el sustrato de membrana de PES podría demostrarse, ya que el agua elimina fácilmente el monómero de DACm después del tratamiento inicial con monómero.

En otro experimento, se prepara una solución acuosa de DACm al 2,00% en peso disolviendo 4 g de DACm en 196 g de agua Milli-Q. La solución se aplica por inmersión en una membrana de eliminación de virus de PES hidrófoba altamente asimétrica, humedecida previamente con metanol (e intercambiada con agua) que mide 14 cm x 14 cm. El procedimiento se lleva a cabo poniendo en contacto la cara expuesta de la membrana con la solución DACm en una bandeja para hornear Pyrex rectangular seguida de agitación suave para sumergir la membrana en la solución donde se deja reposar durante varios minutos (2-3) después de lo cual se enjuaga la solución de monómero con agua hasta que no se observa actividad tensioactiva (burbujas) en el agua de enjuague. Después del secado y prueba de la humectación con agua, se observa que no permanece DACm en la membrana ya que la membrana permanece hidrófoba después del tratamiento descrito anteriormente. En consecuencia, la adsorción simple del monómero DACm en una membrana de PES no muestra afinidad permanente y esta estrategia de recubrimiento por inmersión no se utiliza.

En un experimento adicional, se investiga la polimerización por haz de electrones de DACm sobre una membrana. En este experimento, se aplica la misma solución acuosa al 2,00% en peso del monómero DACm a otra membrana de PES previamente humectada de eliminación de virus hidrófoba altamente asimétrica idéntica después de lo cual la membrana se introduce entre dos láminas de polipropileno claro de 100 μm de espesor para eliminar el exceso de solución de monómero. La membrana se pasa luego bajo una fuente de haz de electrones (para una exposición de 25 KGy a electrones a 170 KeV) para polimerizar el monómero DACm sobre la membrana. Sorprendentemente, la membrana resultante se humedece lentamente en agua, aunque el propio monómero sea fácilmente soluble en agua. Sin embargo, la membrana resultante se humedece completamente en un baño de agua Milli-Q durante 45 segundos, lo que indica que se forma un homopolímero de DACm en la membrana mediante este tratamiento. También se observa que la membrana tratada es impermeable al autoclave y al calor seco, incluso aunque no se use monómero de entrecruzamiento en combinación con el monómero DACm. Además, no se observa ningún cambio en el comportamiento de humectación con agua o la permeabilidad al agua después de remojar a temperatura ambiente durante 2 horas en NaOH 0,2 M (acuso). Sin embargo, el recubrimiento se lava con metanol.

Pruebas adicionales en NaOH 0,5 M durante un remojo estático de 16 horas demuestran que la membrana de homopolímero resultante es estable a soluciones cáusticas hasta 4 horas, después de lo cual, la modificación de la superficie del homopolímero comienza a deteriorarse. Esto se demuestra modificando una serie de muestras de membrana previamente pesadas idénticas, utilizando la misma solución de monómero y someténdolas al proceso de polimerización iniciado con un haz de electrones idéntico. Las muestras se pesan de nuevo después de la modificación y el secado de la superficie y se determina cualquier peso añadido por el homopolímero de acrilamida de diacetona para cada muestra de membrana. Estas muestras de membrana se sumergen luego en una solución de NaOH 0,5 M y se retiran una a la vez a intervalos de tiempo sucesivos. Se observa que la modificación de la superficie comienza a deteriorarse solo después de 4 horas.

Aunque la polimerización iniciada por haz de electrones de DACm sobre una membrana es exitosa en comparación con los otros métodos descritos anteriormente, debe investigarse el efecto sobre el rendimiento de la membrana.

Ejemplo 2: Desempeño del rendimiento de membranas modificadas con homopolímero DACm usando polimerización iniciada por haz de electrones con y sin exposición a Pluronic F68.

Se prepara una gama de soluciones acuosas de DACm a 2, 4, 6, 8 y 10% en peso. Estas soluciones se usan después para modificar la superficie de una membrana de PES hidrófoba altamente asimétrica que mide 14 cm x 14 cm usando el proceso de haz de electrones descrito anteriormente.

Las membranas se someten luego a pruebas de rendimiento de acuerdo al siguiente procedimiento expuesto. Se cortan muestras circulares de membrana, de 25 mm de diámetro, de cada una de las membranas modificadas preparadas como se describió anteriormente y se ensamblan en dispositivos de filtro de microescala sobremoldeados. Los dispositivos incluyen una carcasa con una entrada de fluido en la parte superior y una salida de fluido en la parte inferior con el elemento filtrante en forma de disco contenido en la parte radial central de la carcasa. Cada entrada de fluido tiene un orificio integrado para permitir que escape el aire y el fluido y purgar el volumen directamente sobre el elemento real del filtro.

Cada dispositivo está conectado a dos colectores de suministro de fluido, construidos con un tubo de polipropileno de 0,25 pulgadas mediante un subcolector ensamblado a partir de un tubo de polipropileno de 0,25 pulgadas, así como accesorios y válvulas Luer compatibles. Un colector suministra agua Milli-Q (corriente que no causa obstrucción) a cada uno de los dispositivos y el otro colector suministra medio de cultivo celular químicamente definido disuelto en agua Milli-Q (corriente que causa obstrucción) a cada uno de los dispositivos. Cada colector está construido para soportar y suministrar 10 de tales dispositivos de filtro. Cada uno de los colectores de suministro de fluido está conectado a un recipiente separado de presión, que actúa como un depósito de fluido de prueba. Cada recipiente a presión es alimentado individualmente mediante un conjunto de suministro de aire presurizado regulado para suministrar fluido a los dispositivos a 30 psi o aproximadamente 2 bar (2×10^5 Pa). Una celda de carga con un contenedor de recolección de fluido se monta debajo de cada dispositivo de filtro para medir la masa del filtrado recolectado en función del tiempo. Cada celda de carga está conectada a una placa de adquisición de datos multicanal que se conecta a una computadora que ejecuta el software de adquisición de datos para registrar la masa de filtrado recolectada (en gramos) frente al tiempo (en unidades ajustables, pero típicamente en minutos).

Además, se investiga el efecto de la exposición a la membrana Pluronic F68 o el pretratamiento. El pretratamiento o exposición a Pluronic F68 implica pasar varios mililitros (~5) de una solución patrón acuosa al 10% (100 g/L) de Pluronic F68 a través de cada montaje de filtro mediante una jeringa seguido por un enjuague extractivo copioso con agua Milli-Q hasta que no se observe espuma o burbujas en el agua de enjuague mientras se realiza el enjuague con agua Milli-Q.

Se observa que las muestras previamente tratadas con Pluronic F68 muestran un desempeño de rendimiento mejorado con respecto a esas muestras sin el pretratamiento con Pluronic F68. Estos resultados indican que las membranas tratadas con DACm pueden ofrecer una resistencia mejorada a la obstrucción para el medio de cultivo celular que contienen Pluronic F68. Los resultados de la prueba de desempeño del rendimiento se resumen a continuación en la Tabla I y también se muestran en la Figura 1.

El desempeño del rendimiento se denomina cuantitativamente como la capacidad de la membrana. Por consiguiente, la capacidad de la membrana depende de la corriente de alimentación. Las capacidades se representan en este experimento mediante dos mediciones, denominadas V75 y V90, que corresponden a litros de filtrado recogidos por metro cuadrado de superficie efectiva de la membrana cuando el flujo se ha reducido al 25% y 10%, respectivamente, del flujo inicial (en unidades de $[L/m^2]$). El flujo inicial se determina a partir de la permeabilidad de la membrana, que a su vez se determina midiendo el volumen de una corriente que no causa obstrucción que pasa a través de una membrana por unidad de tiempo por presión de conducción. La permeabilidad de la membrana en este documento se representa en unidades de litros de filtrado recogidos por unidad de área (m^2) por unidad de tiempo (h) por unidad de presión de accionamiento (psi), o $[L/(m^2 \text{ h psi})]$. La presión de conducción de 30 psi se utiliza para este y los posteriores experimentos de rendimiento.

La Tabla I representa los resultados del desempeño de rendimiento para las membranas modificadas con homopolímero de diacetona acrilamida sin las filas 1-5 y con las segundas 5 filas 6-10 expuestas a Pluronic F68 o tratamiento previo.

Tabla I

Dispositivo con membrana modificada	V75	V90	Perm 10X	Vol@150 min	Volumen final (mL)	Tiempo final (min)
2% de DACm	160	392	341	133	133	147
4% de DACm	87	300	416	125	125	147
6% de DACm	132	430	351	125	134	147
8% de DACm	138	420	293	125	126	151
10% de DACm	210	500	331	155	154	148
2% de DACm F68	280	550	294	155	170	180
4% de DACm F68	140	415	265	118	118	148
6% de DACm F68	207	540	315	149	163	177
8% de DACm F68	235	540	287	145	164	187
10% de DACm F68	290	600	294	162	178	177

En general, se observa que el desempeño de rendimiento de las membranas aumenta con el aumento de los niveles de DACm usados para el tratamiento con membranas, hasta el 10%. Además, se observa una mejora en el desempeño de rendimiento para las membranas modificadas con DACm que están previamente tratadas o expuestas a Pluronic F68 con respecto a las membranas no tratadas previamente con Pluronic F68 o expuestas a él. Por lo tanto, Pluronic F68 no parece tener un efecto obstructivo sobre las membranas modificadas de DACm.

Sin embargo, los ensayos de lixiviación con las membranas anteriores mostraron que, al menos para los niveles más altos de DACm, el homopolímero de DACm se lixivió tras el contacto con metanol, después de lo cual las características de flujo de la membrana y la humectabilidad se vieron afectadas. Las pruebas de lixiviación sugieren que sin el entrecruzamiento del monómero de DACm, no es posible asegurar bajos niveles de extraíbles y lograr un

rendimiento de membrana consistente. Además, la exposición accidental a alcoholes de bajo peso molecular presenta una vulnerabilidad indeseable del material.

Ejemplo 3: selección de entrelazadores para el monómero DACm.

Se prueban varios entrelazadores potenciales para el monómero DACm en este Ejemplo. El diacrilato de tetraetilenglicol (TEDGA) se investiga como un entrelazador potencial para el monómero DACm. Sin embargo, la modificación con DACm y TEGDA no produce una modificación estable de la superficie entrecruzada. Posteriormente, se ensaya como entrelazador en lugar de TEGDA un monómero entrelazador soluble en agua y sin acrilamida, diacrilato de polietilenglicol (PEGDA). Se informa que un diacrilato de PEG de peso molecular promedio de 575 (PEGDA575) posee la mejor solubilidad en agua de los diacrilatos de PEG de peso molecular disponibles. El primer nivel de entrelazador que se prueba es del 1%.

Para seleccionar un nivel de DACm de partida para combinación con el entrelazador, las membranas modificadas con homopolímero DACm del 2 al 10% en peso se inspeccionan nuevamente para determinar la velocidad y la permeabilidad al mojado con agua. Se encontró que la membrana modificada con 4% de DACm se humedece más rápido y de manera más uniforme en agua que las otras membranas modificadas con homopolímero DACm. En consecuencia, se selecciona 4.00% de DACm como el nivel de DACm de partida que se utiliza en una química de modificación de superficie entrecruzada con 1% de PEGDA575. La mezcla de monómeros se aplica por haz de electrones de la misma manera que se ha descrito anteriormente, con la excepción de que la solución de monómero se compone de 4,00% en peso de monómero de DACm en combinación con 1,00% en peso del monómero PEGDA en 95% en peso de agua Milli-Q.

La eficacia del entrelazamiento, caracterizada por la permanencia de este revestimiento, se confirma empapando las muestras de membrana modificadas resultantes en metanol seguido de enjuague con agua y secado, y luego volviendo a analizar la humectación y la permeabilidad. Los resultados de las pruebas de humectación con agua y permeabilidad al agua son esencialmente idénticas a los registrados antes de la etapa de extracción con metanol. Por lo tanto, se considera que la modificación es estable.

Además, en un experimento separado, se investiga el uso de un entrelazador sin acrilamida y se compara con un entrelazador de acrilamida, con respecto al efecto sobre el desempeño del rendimiento de la membrana. Se usa PEGDA575 como el monómero entrecruzable sin acrilamida y la metilen-bis-acrilamida (MBAm) se usa como un monómero entrecruzable de acrilamida. Un prototipo experimental de medio de cultivo de células CHO definido químicamente, MX-201 o Beta-CHO, se utiliza como la corriente de alimentación de obstrucción o taponamiento en este experimento. Cada monómero de entrecruzamiento (PEGDA o MBAm) se usa a un nivel idéntico de tratamiento del 1,00 por ciento en peso (1,00% en peso). Cada uno de estos entrelazadores se combina por separado con 4% de DACm (diacetona acrilamida) para formar la mezcla de polímeros usando agua Milli-Q como disolvente.

La Figura 2 representa curvas de decaimiento de flujo para dispositivos de membrana duplicados de 25 mm de diámetro, cada uno con una de las tres membranas modificadas superficialmente. Estos son: (a) 4% de DACm-1% MBAm; (b) 4% de DACm-1% de PEGDA575; y (c) 1% de HPC.

La Tabla II a continuación resume los resultados de uno de tales experimentos usado para medir el decaimiento del flujo, V70, V90 y permeabilidades 10X, también como se representa en la Figura 3, que representa capacidades y permeabilidades de membranas de PES modificadas con 4% de DACm-1% de MBAm y 4% de DACm -1% de PEGDA con respecto a la membrana de control de 1% de HPC. Se usa un medio de cultivo de células CHO definido químicamente como corriente de alimentación.

Como se observó, la membrana de 4% de DACm-1% de MBAm exhibe un menor desempeño de rendimiento con respecto a la membrana de 1% de HPC. Sin embargo, la membrana de 4% de DACm-1% de PEGDA575 exhibe un mayor desempeño de rendimiento en relación con el 1% de HPC.

Tabla II

ID de la membrana	V75 promedio	V90 promedio	Perm 10X promedio	SD de V75	SD de V90	SD de 10X Perm
1% de HPC	255	588	302	99,7	109,6	3,54
4% de DACm 1% de MBAm	131	555	336	7,1	63,6	4,24
4% de DACm 1% de PEGDA	1730	2475	281	325,3	176,8	4,95

*SD significa desviación estándar

De acuerdo con esto, un monómero entrecruzable no basado en acrilamida (por ejemplo, PEGDA) es una opción mucho mejor para usar con DACm en comparación con un monómero entrecruzable basado en acrilamida (por ejemplo, MBAm).

Ejemplo 4: Prueba de desempeño comparativo de rendimiento del entrecruzamiento

Membranas modificadas con copolímero.

5 Las modificaciones de la superficie se prueban adicionalmente de una manera idéntica a la metodología descrita previamente para el desempeño de rendimiento. Los siguientes resultados se tomaron de las primeras pruebas de capacidad llevadas a cabo con la química del copolímero DACm-PEGDA575.

10 Como se explicó en el ejemplo anterior con homopolímero DACm, todas las cantidades presentadas a continuación en la Tabla III tienen el mismo significado y unidades, excepto que se presentan los valores promedio para muestras duplicadas.

15 La Tabla III muestra las capacidades promedio (V75 y V90 en unidades de [L/m²]) y permeabilidades en unidades de [L/(m² h psi)] para determinaciones de capacidad por duplicado de la primera prueba comparativa utilizando la química de modificación de superficie de la membrana con copolímero DACm-PEGDA575.

Tabla III

Modificación de la superficie	V75 Promedio [L/m ²]	V90 Promedio [L/m ²]	Permeabilidad promedio [L/(m ² h psi)]
1L-1% de HPC	255	588	30,2
1L-3,75% de LB20	532	893	35,6
1L- 4,00% de DACm - 1,00% de MBAm	131	555	33,6
1L-2,00% de LB20 - 1,00% de HEA-0,75% de TEGDA	675	995	27,2
1L-4,00% de DACm - 1,00% de PEGDA575	1730	2475	28,1

20 Todos los dispositivos están contruidos con el mismo material de membrana de partida (membrana de PES de retención de virus hidrófoba no modificada altamente asimétrica con una clasificación de tamaño de poro nominal de 20 nm). Cada dispositivo de filtro está construido para albergar una sola capa (1L-) de cada una de las diversas membranas de superficie modificada. Las composiciones químicas de modificación de superficie aplicadas sobre cada muestra de membrana se describen a continuación.

25 HPC es un tratamiento previo de polímero adsorbido aplicado por inmersión y que comprende una solución acuosa de 1,00% en peso de hidroxipropilcelulosa con 10% de hexilenglicol utilizado como adyuvante de humectación de la membrana. LB20 es un monómero de triacrilato altamente etoxilado de autoentrecruzamiento aplicado mediante curado con haz de electrones in situ. DACm significa diacetona acrilamida, un monómero vinílico monofuncional, y MBAm significa metileno-bis-acrilamida, un entrelazador de diacrilamida que forma un copolímero con DACm. HEA significa acrilato de hidroxietilo, un monómero vinílico monofuncional. TEGDA significa diacrilato de tetraetilenglicol, un monómero bifuncional o de entrelazamiento, como lo es PEGDA575, que es un diacrilato de polietilenglicol de peso molecular promedio en número de 575. DACm-MBAm es una modificación de superficie copolimérica aplicada mediante curado con haz de electrones tal como DACm-PEGDA575. LB20, HEA y TEGDA forman una modificación de superficie terpolimérica, también aplicada sobre la membrana mediante un proceso de curado por haz de electrones.

35 La Figura 4 es un gráfico de barras que representa las capacidades y permeabilidades promedio de los diversos dispositivos de membrana probados, como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 4, se observa una mejora significativa en el desempeño de rendimiento para el dispositivo de membrana modificado con copolímero DACm-PEGDA575 con relación a las otras modificaciones probadas en este Ejemplo.

40 La Figura 5 representa curvas de volumen frente a tiempo para cada uno de los dispositivos probados en este documento. Como se representa en la Figura 5, se recogió una cantidad de filtrado mucho mayor para el dispositivo de membrana modificada con copolímero DACm-PEGDA575 en relación con las otras modificaciones ensayadas en este Ejemplo.

45 En un experimento adicional, se usa un medio de cultivo de células CHO definido químicamente, MX-201 (o Beta-CHO), como la corriente de alimentación. Los dispositivos que contienen membrana V-Pro (membrana de PHHC modificada con 1% de hidroxipropil celulosa) se usan como controles. Los dispositivos marcados como 375LB20 están hechos con una mezcla de monomérica de 3,75% de LB20 (20 moles de triacrilato de trimetilopropano etoxilado) fabricados en Milli-Q y curados sobre la membrana mediante un haz de electrones. Los dispositivos marcados como 200L, 100H y 075T son 2% de LB20, 1% de HEA y 0,75% de TEGDA, respectivamente, todos disueltos en agua Milli-Q. Los dispositivos marcados como 4DACm1PEGDA incluyen 4% de DACm y 1% de PEGDA575 en agua Milli-Q. Todas las composiciones químicas se aplican con una dosis de haz de electrones de 25 KGy.

Se observa un aumento muy significativo en el desempeño de rendimiento del dispositivo de 4DACm1PEGDA con respecto a los otros compuestos químicos candidatos ensayados.

5 En un experimento adicional, PEGDA575 en dispositivos de membrana idénticos como se describió anteriormente, se prueba por sí mismo en concentraciones que varían de 2% a 5% (también preparados por el mismo proceso de haz de electrones tal como se describió anteriormente) y el desempeño de rendimiento es comparable a aquel observado con el dispositivo 4DACm1PEGDA.

10 Posteriormente, se usa el mismo medio de cultivo celular químicamente definido que se describió anteriormente con un dispositivo que contiene 5% de PEGDA575. Se confirma nuevamente una ventaja mejorada del desempeño de rendimiento.

15 En un experimento adicional, las composiciones que contienen monómeros de DACm y PEGDA a diferentes concentraciones se evalúan para determinar el desempeño de rendimiento de las membranas modificadas con estos monómeros. Se preparan y prueban las siguientes composiciones: se preparan composiciones que contienen 4% de DACm con 0,75%, 1,25%, 1,50%, 2,00% y 2,50% de PEGDA. Además, se prepara una composición que contiene un 3% de DACm con un 3% de PEGDA575.

20 La Figura 6 representa curvas de decaimiento de flujo obtenidas de cada uno de los dispositivos de membrana probados. Como se representa en la Figura 6, el dispositivo de membrana modificado con copolímero DACm-PEGDA575 tiene una ventaja de desempeño de rendimiento sobre las otras modificaciones probadas, por medio de un decaimiento de flujo más lento.

25 Ejemplo 5: Evaluación de la estabilidad térmica de las membranas modificadas con copolímero DACm-PEGDA.

Las membranas modificadas con copolímero DACm-PEGDA se evalúan adicionalmente para determinar la estabilidad térmica, ya que la estabilidad térmica es deseable para la esterilización.

30 La estabilidad térmica se aborda sometiendo la membrana modificada en condiciones de autoclave en húmedo (ciclo de 1 hora a 134°C), condiciones de calor seco (ciclo de 1 hora a 135°C) y condiciones de vapor en el lugar (SIP) (media hora de ciclo de vapor vivo en el lugar).

35 El tratamiento en autoclave implica someter un objeto (membrana o dispositivo, en este caso) a un ciclo estático de calentamiento en cámara cerrada con agua en condiciones en las que el agua líquida existe en equilibrio con su vapor por encima de la presión atmosférica durante un intervalo de tiempo superior al necesario para esterilizar el objeto.

40 El tratamiento con calor seco implica, tal como lo sugiere el término, someter un objeto (membrana o dispositivo) a aire seco a una temperatura predeterminada (en este caso) equivalente a la temperatura del autoclave descrita en un horno de convección, para determinar si las condiciones que pueden encontrarse durante la fabricación del dispositivo podrían comprometer el desempeño del objeto.

45 El tratamiento con vapor en el lugar (SIP) implica someter un objeto (membrana o dispositivo) a vapor vivo en condiciones dinámicas en las que el vapor no condensa (a una temperatura y presión específicas por encima del punto de ebullición del agua) y es transportado a través de la membrana o el dispositivo que aloja la membrana o algún elemento similar (filtro) para esterilizar todas las superficies expuestas al vapor.

50 En cada caso, las capacidades de la membrana se prueban fabricando dispositivos a escala micro, como se describió anteriormente, con las membranas tratadas térmicamente, midiendo el desempeño de rendimiento y comparando los resultados de desempeño de rendimiento con los obtenidos en dispositivos no tratados térmicamente como controles.

En el primer conjunto de experimentos, las membranas se exponen a condiciones de autoclave en húmedo.

55 Todos los dispositivos excepto el control IL-1% de HPC se fabrican con mezclas de monómeros que contienen 4,00% de diacetona acrilamida (DACm). Se varía el nivel de PEGDA575 e incluye 1,00% 1,25% y 1,50%. Algunos dispositivos usan un elemento de filtro de 2 capas y se denomina como 2L-.

60 La Tabla IV representa el desempeño de rendimiento de la membrana, medido por V75, V90 y permeabilidad 10X de las diversas membranas, ya sea después del tratamiento no térmico, o después del tratamiento en autoclave de los dispositivos o después del tratamiento en autoclave de las membranas antes de la fabricación del dispositivo.

Tabla IV

ID del dispositivo	V75 [L/m ²]	V90 [L/m ²]	Perm 10X [L/m ² h psi]
1L-4% de DACm-1% de PEGDA575 AM	475	1100	303
2L-4% de DACm-1% de PEGDA575 AM 1	1300	1700	154
1L-4% de DACm-1% de PEGDA575 ACD	675	1500	313
1L-4% de DACm-1,25% de PEGDA575 ACD	500	1400	266
1L-4% de DACm-1,5% de PEGDA575 ACD	1500	2500	273
2L-4% de DACm-1% de PEGDA575 AM 2	2100	3000	199
1L-4% de DACm-1% de PEGDA575 ACM	885	1500	301
1L-4% de DACm-1,25% de PEGDA575 ACM	1250	1800	300
1L-4% de DACm-1,5% de PEGDA575 ACM	1700	2500	280
1L-1% de HPC	185	460	329

AM = como se modificó (sin tratamiento térmico); ACD = dispositivos esterilizados en autoclave; y,
ACM = Membrana esterilizada en autoclave (seguida de la fabricación del dispositivo antes de la prueba)

- Los resultados de uno de tales experimentos representativos se representan en la Figura 7, que representa el desempeño de rendimiento de la membrana de las diversas membranas, como se mide usando V75, V90 y permeabilidad 10X, ya sea sin tratamiento térmico (AM), después de la esterilización en autoclave del dispositivo que contiene la membrana (ACD) o después de esterilización en autoclave de las membranas antes de la fabricación del dispositivo (ACM). Los resultados del desempeño incluyen permeabilidades del dispositivo de membrana (flujo constante de corriente no obstructiva (agua) con dispositivos de escala micro (área de filtración efectiva 3,1 cm² (EFA)) y capacidades determinadas a V75 y V90, determinadas usando 4 g/L de IgG derivada de plasma humano en regulador de acetato a pH 4 y conductividad de 2 mS/cm. En la Figura 7, 1L y 2L representan dispositivos de membrana de una capa y dos capas, respectivamente; DP4100 representa 4,00% de DACm y 1,00% de PEGDA; DP4125 representa 4,00% de DACm y 1,25% de PEGDA, y DP4150 representa 4,00% de DACm y 1,50% de PEGDA.
- Como se observa, para la mayor parte, para todos los dispositivos de membrana que se someten a autoclave, el dispositivo que contiene la membrana se esteriliza en autoclave o la membrana se esteriliza en autoclave antes de la fabricación del dispositivo, el rendimiento de la membrana parece mejorar con un aumento en el nivel de PEGDA, así como también sobre la membrana de control 1L-1% de HPC.
- En otro experimento, una serie similar pero no completamente idéntica de dispositivos de membrana se exponen al ciclo de calor seco (135°C durante 1 hora). En este experimento, todas las membranas se fabrican en dispositivos de una sola capa. Los dispositivos de membrana experimentales se fabrican con membranas modificadas usando una mezcla de monómeros que contiene 4,00% de diacetona acrilamida (DACm) y 1% de PEGDA575 (DP4100), o con una mezcla de monómeros que contiene 4% de DACm y 2% de PEGDA575 (DP4200). Los dispositivos de control (2) se fabrican modificando las membranas de partida con un recubrimiento adsorbente de 1% de hidroxipropilcelulosa (HPC de 1%) que se fabrican en dispositivos idénticos a los dispositivos que alojan las membranas modificadas con DACm y PEGDA. La membrana que se modifica es una membrana de PES de dos fuentes separadas, denominadas P1 y P2.
- La Tabla V presenta los resultados de uno de tales experimentos, como también se representa en la Figura 8. El desempeño de rendimiento de la membrana se mide utilizando los valores de V75, V90 y permeabilidad 10X, como se describió previamente. Como se observó, las capacidades (V75 y V90) de todos los dispositivos experimentales que contienen membranas modificadas son muy similares, independientemente de las diferencias entre las formulaciones de modificación de membrana (DP4100, DP4200), e independientemente de si las membranas están sometidas o no a tratamiento térmico con calor seco; sin embargo, las capacidades de las membranas modificadas en general son más altas que las de las membranas de control (1L-1% de HPC P1 y 1L-1% de HPC P2). Curiosamente, sin embargo, la mejora en el rendimiento obtenida con el aumento del nivel de PEGDA, como se muestra con el tratamiento en autoclave, no se observa con el tratamiento térmico en seco.
- La Tabla V muestra los resultados de capacidad y permeabilidad de un experimento de rendimiento comparativo usando dispositivos fabricados con muestras de membrana modificada (AM) y comparando dispositivos idénticos sometidos a un tratamiento térmico de calor seco adicional (135°C, 1 hora).

Tabla V

ID del dispositivo	V75 [L/m ²]	V90 [L/m ²]	Perm 10X [L/m ² h psi]
1% de HPC P1	65	393	348
DP4100 AM P1	1000	1100	288
DP4100 DH P1	975	1100	333
DP4200 AM P1	1100	1200	225
DP4200 DH P1	1175	1250	261
DP4100 AM P2	1150	1225	280
DP4100 DH P2	1150	1225	291
DP4200 AM P2	975	1000	219
DP4200 DH P22	1175	1250	261
1% de HPC P2	275	700	339

AM = como dispositivos modificados (sin tratamiento térmico); DH = Dispositivos tratados con calor seco. P1 y P2 representan membranas de PES de dos fuentes diferentes. 1% de HPC identifica los dispositivos de membrana de control (utilizados por duplicado).

5 En otro experimento más, los diversos dispositivos de membrana se someten a un proceso de vapor en el lugar (SIP) para determinar cómo el proceso estándar de vapor en el lugar afecta el desempeño del rendimiento (permeabilidad al agua, capacidad del medio, retención).

10 Las composiciones químicas descritas en este documento se aplican a membranas de dos fuentes de membrana de PES diferentes (membranas P1 y P2). La mitad de las muestras de membrana preparadas están sujetas a condiciones SIP. Todas las muestras de membrana se ensamblan en dispositivos a escala micro y se prueban para determinar el desempeño del rendimiento (permeabilidad y capacidad), y también para la retención de partículas similares a virus.

15 La Tabla VI presenta los resultados de un experimento en el que se determinan la permeabilidad, el rendimiento de la alimentación, la capacidad y la retención de un bacteriófago para diversas membranas. La alimentación consiste en un medio de cultivo celular experimental MX-201 (Beta-CHO) en agua Milli-Q enriquecida con 1×10^8 ufp/ μ L del bacteriófago PHI-X₁₇₄. Los resultados se determinan para dispositivos a escala micro con un solo elemento de membrana de 25 mm de diámetro (3,1 cm² EFA). Cada dispositivo contiene una membrana diferente ya sea con la designación como la modificada (AM) que no está sujeta a ningún tratamiento térmico, o con la designación de vapor en el lugar (SIP). Todas las membranas son de composición PES y se fabrican a partir de una de las dos fuentes de polímero diferentes a las que se hace referencia y se identifican como P1 o P2. Cada membrana se procesa por duplicado con duplicados identificados como A o B. Las membranas identificadas como 1% de HPC no están sujetas al tratamiento SIP para esta prueba. Estas se utilizan como controles y sirven para demostrar un nivel de variabilidad en el desempeño del dispositivo. Estos dispositivos de membrana están fabricados a partir del polímero P1 modificado con 1% de HPC. Las membranas identificadas como DP4100 se modifican usando la realización de modificación de la superficie de la invención con 4% de PEGDA - 1% de DACm que se aplica tanto a las membranas de polímero P1 como a las de polímero P2.

Tabla VI

ID de la membrana	Permeabilidad (LMH/psi)	V120 min (mL)	Amin (m ²)	LRV inicial	LRV final
1% de HPCP1AAM	25,57	419,20	1,69	4,8	4,9
1% de HPCP1BAM	27,44	426,12	1,73	5,6	5,6
DP4100 P1 A AM	22,78	641,74	1,13	5,6	5,4
DP4100 P1 A SIP	22,95	597,19	1,17	5,9	5,7
DP4100 P2 A AM	23,48	684,50	1,02	5,3	5,0
DP4100 P2 A SIP	24,25	679,53	1,03	5,3	5,4
DP4100 P1 B AM	24,69	674,16	1,07	5,5	5,2
DP4100 P1 B SIP	24,41	685,41	1,09	5,2	4,9
DP4100 P2 B AM	22,80	659,67	1,04	5,5	5,5
DP4100 P2 B SIP	23,39	667,69	1,08	5,2	4,9

30 La permeabilidad se determina pasando un regulador que no causa obstrucción (agua Milli-Q en este caso) a través del dispositivo durante un intervalo de 10 a 15 minutos y registrando la cantidad de regulador recogido. La corriente de obstrucción que contiene el medio de cultivo celular disuelto en agua Milli-Q se pasa luego a través del dispositivo. El rendimiento del medio (masa o volumen de filtrado recogido) se mide a los 120 minutos desde el inicio del experimento. La capacidad de la membrana se determina como un área mínima, expresada como Amin, en unidades de metros cuadrados (m²). El área mínima se puede definir arbitrariamente como el área de membrana requerida para recoger una cantidad dada de filtrado dentro de un intervalo de tiempo dado. En este caso, el área mínima se define como el área de filtro necesaria para recolectar o filtrar 1.000 litros de alimentación en un tiempo de 4 horas y se calcula a partir de la curva de decaimiento del flujo (volumen experimental bruto frente a datos de tiempo) registrados para cada dispositivo.

La retención se determina añadiendo bacteriófago Phi-X174 (Promega, catálogo número I1041) en la alimentación con un título de $2-5 \times 10^7$ ufp/ μ L (unidades formadoras de placa por microlitro). Se asegura una muestra de alimentación de 1 mL desde el depósito de alimentación antes de comenzar el experimento de rendimiento. Una vez que se inicia el experimento, se asegura una muestra inicial de retención de 1 mL a la salida de cada dispositivo después de aproximadamente un minuto. Antes de finalizar el experimento, se asegura una muestra final de retención de 1 mL en cada dispositivo. Cuando finaliza el experimento, la alimentación se muestrea de nuevo en el depósito de alimentación. Las muestras del depósito de alimentación se usan para medir los títulos y, por lo tanto, la viabilidad del fago al inicio y al final de la prueba. Las muestras de filtrado tomadas en las salidas del dispositivo en los puntos inicial y final durante el ensayo se usan para determinar la diferencia numérica entre el título de bacteriófago viable inicial y el título de bacteriófago viable final. Estas diferencias entre los títulos inicial y final de las salidas del dispositivo en relación con las muestras del depósito de alimentación se utilizan para determinar el valor de reducción logarítmica (LRV) para cada dispositivo. En general, el LRV es una medida de cuán efectiva es la eliminación de virus. El valor log de cada unidad representa una reducción en el título del virus en un orden de magnitud (10X). Por lo tanto, un LRV de 5 significa que la concentración de virus del filtrado es 1/100.000 de la concentración del virus de la alimentación. Los resultados de retención inicial y final se representan en las Figuras 9a y 9b, respectivamente. La figura 9a presenta los valores iniciales de LRV, uno para cada dispositivo. La Figura 9b presenta los valores finales de LRV, uno para cada dispositivo. Notablemente, no se produce un cambio significativo en el LRV después del tratamiento con SIP, y no se produce ningún cambio significativo en el LRV entre las mediciones de LRV inicial y final para cualquier dispositivo probado en este experimento. Sin embargo, se observan importantes mejoras de capacidad para todos los dispositivos DP4100 en relación con los dispositivos de 1% de HPC.

Ejemplo 6: Evaluación del desempeño de rendimiento de las membranas sin DACm.

En un experimento representativo, se elaboran membranas modificadas con PEGDA solamente (2 a 5%), con el fin de investigar si DACm es un componente necesario para lograr el desempeño deseable de rendimiento. Se modifica una serie de membranas usando una concentración de PEGDA575 que varía de 2% a 5% en peso en agua en incrementos de 1%. Se usa una membrana de PES como membrana base y se usa una membrana modificada con 1% de hidroxipropilcelulosa (HPC), como se describió anteriormente, como control. Las pruebas de desempeño de rendimiento en esta serie de membranas se llevan a cabo utilizando un prototipo de medio de cultivo celular químicamente definido (Beta-CHO, también denominado MX-201). Las diversas modificaciones de membrana se realizan usando polimerización in situ iniciada por un haz de electrones de la membrana a base de PES humectada en solución de PEGDA575 para impartir niveles crecientes de polímero sobre la superficie de la membrana con un nivel creciente de tratamiento con PEGDA (2%, 3%, 4% y 5%). La capacidad promedio y la permeabilidad promedio de cada nivel de modificación (determinaciones por duplicado) se muestran en la Figura 10.

Como se representa en la Figura 10, la capacidad aumenta con el aumento en la concentración del nivel de tratamiento con PEGDA, mientras que se observa lo contrario con la permeabilidad, es decir disminuye.

Con respecto al desempeño global de rendimiento, todas las membranas modificadas con PEGDA superaron a los controles por un factor significativo (V75: 2,86 a 4,72; V90: 3,96 a 6,10). Los resultados del desempeño se comparan con los resumidos en la Tabla III, en donde la modificación con 4% de DACm-1% de PEGDA575 da como resultado factores mejorados de desempeño de 6,78 para V75 y 4,29 para V90 sobre las membranas modificadas con 1% de HPC. Además, la formulación (HEA-TEGDA, también en la Tabla III) produjo factores de desempeño mejorados sobre las membranas de control de 2,65 para V75 y 1,69 para V90.

En otro experimento representativo, se preparan membranas con nivel de tratamiento de 2%, 3%, 4% y 5% de PEGDA575 y se prueban con medio de cultivo celular definido químicamente CD Opti-CHO de Life Technologies. De nuevo, se observa que el desempeño de rendimiento mejora con respecto a la membrana de control con 1% de HPC. Sin embargo, el desempeño continúa disminuyendo al aumentar el nivel de tratamiento con PEGDA. Esto se muestra en la Figura 11. En la Figura 11, se mide la capacidad en términos de A_{min} , que en este caso se define como el área mínima de membrana (en unidades de m^2) que se requiere para procesar 1.000 litros de medio en un período de 4 horas. Notablemente, se observa una relación inversa de A_{min} con respecto a la cantidad de filtrado recolectada durante los primeros 150 minutos del experimento. Por lo tanto, un A_{min} inferior corresponde a una capacidad superior. Debido a las tendencias de desempeño aparentemente opuestas de estas membranas con respecto a las dos corrientes de medios diferentes, el desempeño de la membrana se evaluó adicionalmente utilizando múltiples corrientes de alimentación. Parece que los resultados de la membrana usando el medio MX-201 mostrado en la Figura 10 mejoran al aumentar el nivel de tratamiento con PEGDA mientras que los resultados de desempeño de la membrana usando los resultados de CD Opti-CHO mostrados en la Figura 11 disminuyen con el mismo incremento en el nivel de tratamiento con PEGDA. Se observa que el medio MX-201 es más obstructivo que el medio Opti-CHO. Como resultado, el desempeño del dispositivo que utiliza el medio MX-201 se ve menos afectado por la permeabilidad y más por la obstrucción del medio. Aunque que, el medio Opti-CHO es menos obstructivo, por lo tanto, el desempeño del dispositivo depende más de la permeabilidad que del efecto de la obstrucción por el medio.

65

Ejemplo 7: evaluación del desempeño de membranas sin DACm y de membranas con DACm-PEGDA usando múltiples corrientes de alimentación

5 Debido a las atractivas tendencias de desempeño de las membranas sin DACm, en otro experimento representativo, se investiga una serie de membranas modificadas con PEGDA solamente o con DACm y PEGDA para el desempeño de rendimiento. Un control consiste en la membrana hidrófoba de PES para virus con una modificación de la superficie con 1% de HPC, y la segunda membrana de control consistió en una membrana de PES para virus modificada con 4% de DACm y 1% de PEGDA575. El segundo control se elabora usando un lote de membrana hidrófoba diferente comparada con las otras membranas en este experimento. Las tres membranas restantes incluyen una modificación de 1% de PEGDA, una modificación con 1% de PEGDA y 1% de DACm, y finalmente una modificación con 1% de PEGDA575 y 4% de DACm. Se recogieron tres conjuntos de datos con este conjunto de membranas, uno usando cada una de los siguientes corrientes de alimentación: 1) Medio de cultivo celular CHO químicamente definido comercialmente disponible, CD Opti-CHO de Life Technologies; 2) Medio de cultivo celular CHO químicamente definido comercialmente disponible, EMD Cellvento 200; y, 3) Corriente de alimentación diseñada experimentalmente, medio de Eagle modificado de Dulbecco enriquecido con 2 g/Litro de Pluronic, que con el medio CD Opti-CHO, que se considera un medio menos obstructivo, las membranas de superficie modificada con DACm bajo y sin DACm tienen un desempeño relativamente bueno y muy similar a la membrana con 2% de PEGDA que se muestra en la Figura 11. En el caso del medio más obstructivo Cellvento-200, únicamente las modificaciones de superficie de mayor nivel de DACm se desempeñan bien. Esto demuestra que las modificaciones de superficie con mayor nivel de DACm proporcionan un desempeño mejorado de rendimiento para el conjunto más amplio de corrientes de alimentación probadas.

25 La memoria descriptiva se entiende más completamente a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas dentro de la especificación. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones y no deben interpretarse como limitantes en el alcance. El experto en la técnica (facultativo) reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones están abarcadas por esta descripción. La cita de cualquier referencia en el presente documento no es una admisión de que tales referencias sean de la técnica anterior.

30 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc. utilizados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante las realizaciones descritas en este documento. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una membrana porosa que tiene una superficie modificada con un polímero que comprende monómeros dispuestos al azar y entrecruzados de diacetona acrilamida (DACm) y uno o más monómeros entrecruzables sin acrilamida, en el que el monómero entrecruzable sin acrilamida es diacrilato de polietilenglicol (PEGDA).
2. La membrana de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polímero se recubre directamente sobre la superficie de la membrana porosa usando una fuente de energía.
- 10 3. La membrana de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la fuente de energía se selecciona del grupo que consiste en calor, haz de electrones, luz ultravioleta o radiación gamma.
4. La membrana de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la membrana porosa es una membrana asimétrica y/o en la que la membrana es una membrana de polietersulfona (PES).
- 15 5. Un dispositivo que comprende la membrana porosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dispositivo comprende una o más capas de un elemento filtrante de membrana.
- 20 6. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el dispositivo es en un formato seleccionado de un disco, un cartucho plisado, un cartucho enrollado en espiral y una lámina plana de múltiples placas.
- 25 7. Un método para eliminar un virus contaminante de un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende la filtración del medio de cultivo celular químicamente definido a través de la membrana porosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el método comprende inicialmente proporcionar el medio de cultivo celular químicamente definido, y en el que se produce la filtración antes o durante la transferencia del medio a un biorreactor, en el que el nivel de uno o más contaminantes virales en el medio de cultivo celular químicamente definido dentro del biorreactor es más bajo que el nivel antes de filtrar el medio a través de la membrana.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el nivel de uno o más contaminantes virales, después de la etapa de filtración del medio de cultivo celular químicamente definido a través de la membrana porosa, se reduce en al menos un valor de reducción de 1Log_{10} (LRV) o al menos 4 LRV, o al menos 6 LRV.
- 40 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la filtración es:
 (a) llevada a cabo durante un período de menos de 24 horas, y/o
 (b) llevada a cabo a un pH que varía de 4 a 8, y/o
 (c) llevada a cabo a una temperatura que varía de 20°C a 25°C.
- 45 11. Un método para reducir la obstrucción de una membrana para retención de virus por uno o más componentes en un medio de cultivo celular químicamente definido durante la filtración, comprendiendo el método las etapas de:
 (a) proporcionar una membrana de retención de virus; y
 (b) modificar la membrana con un polímero que comprende monómeros dispuestos al azar y entrecruzados de diacetona acrilamida y uno o más monómeros entrecruzables sin acrilamida,
- 50 en el que la obstrucción de la membrana modificada por uno o más componentes en un medio de cultivo celular definido químicamente se reduce con respecto a una membrana no modificada, en donde el monómero entrecruzable sin acrilamida es PEGDA.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la membrana para retener de virus es una membrana de PES, una membrana de PVDF, una membrana de celulosa o una membrana de nailon.
- 60 13. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 7, la reivindicación 8 o la reivindicación 12, en el que la membrana o dispositivo se somete a limpieza o esterilización mediante autoclave, tratamiento térmico en seco o tratamiento de vapor en el lugar.
14. Un método de cultivo de células en un biorreactor para expresar una proteína de interés, en el que el método es de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, y además en el que la membrana porosa se utiliza al comienzo del biorreactor.

Capacidades* y Permeabilidades** de una Membrana de PES para Virus Modificada con Homopolímero de Diacetona Acrilamida de una Sola Capa

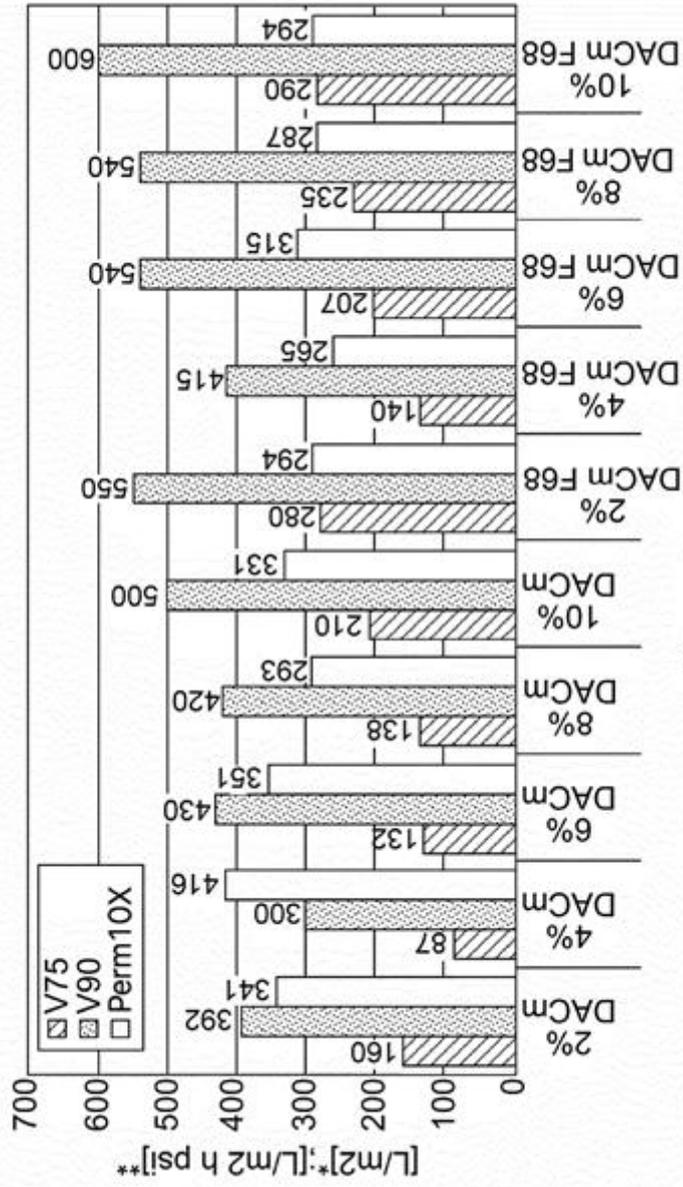
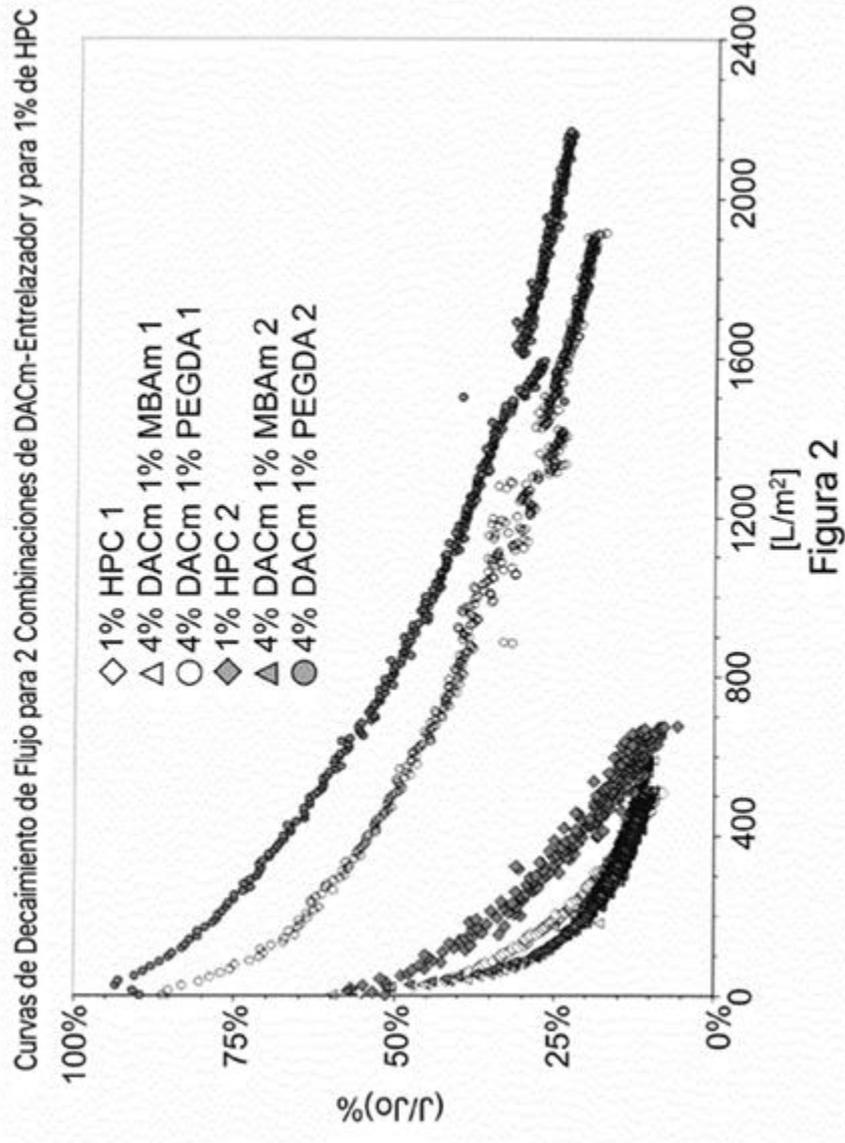


Figura 1



Capacidades* y Permeabilidades** de Compuestos Químicos de Modificación de Superficie DACm-MBAm, DACm-PEGDA, y de 1% de HPC en una Membrana de PES para Virus

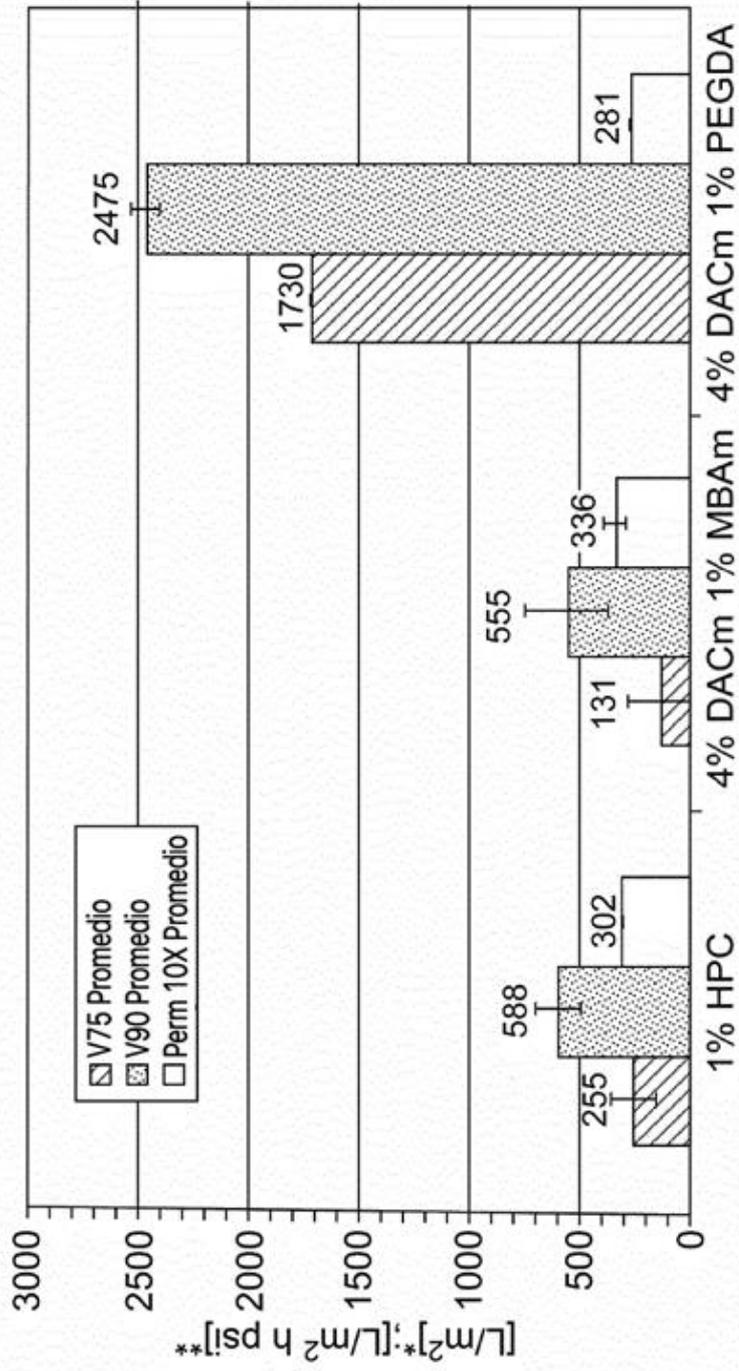


Figura 3

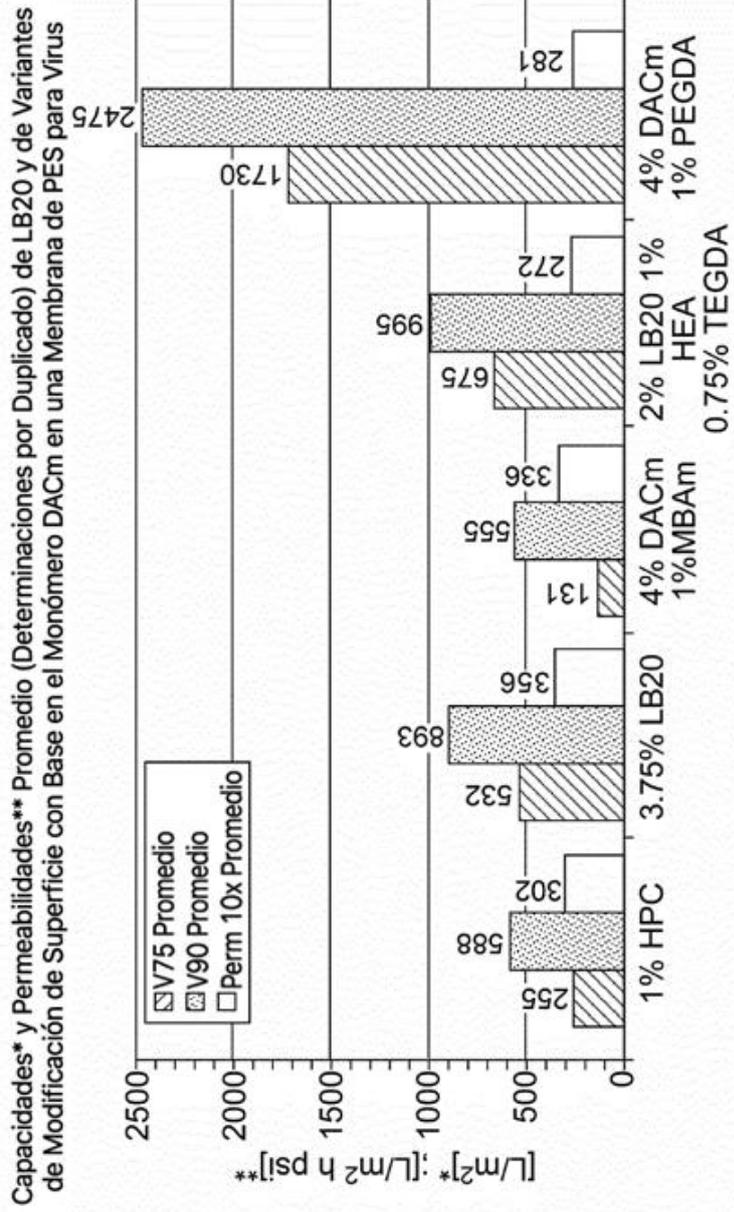


Figura 4

Curvas de Volumen frente a Tiempo para Variantes de Compuestos Químicos para Modificación de Superficie a Base de los Monómeros DACm y LB20

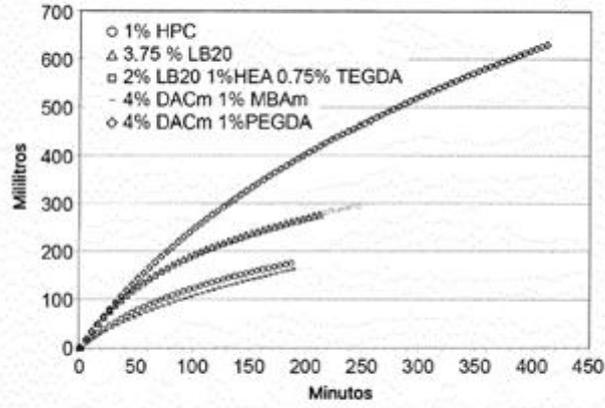
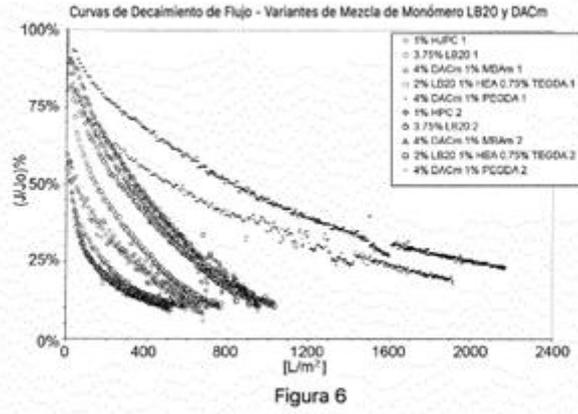


Figura 5



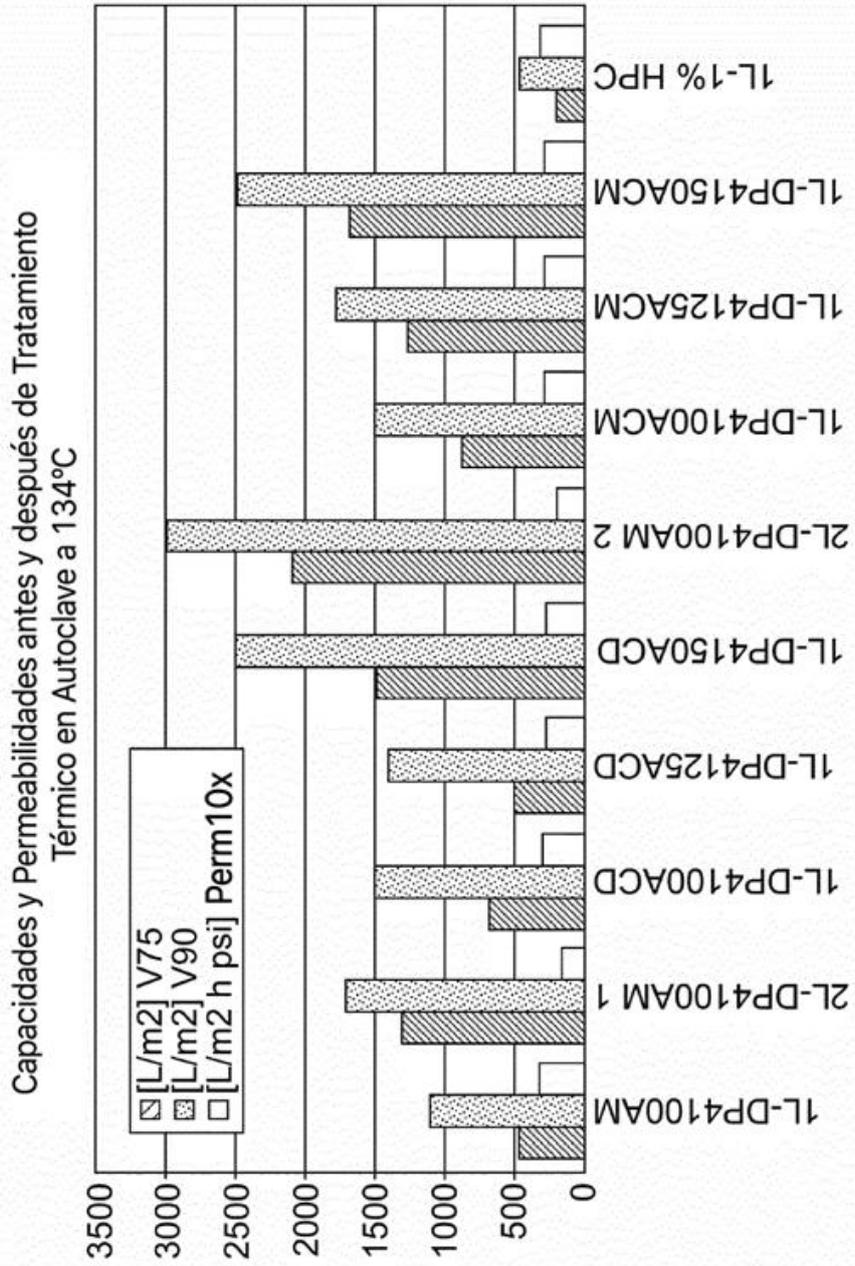


Figura 7

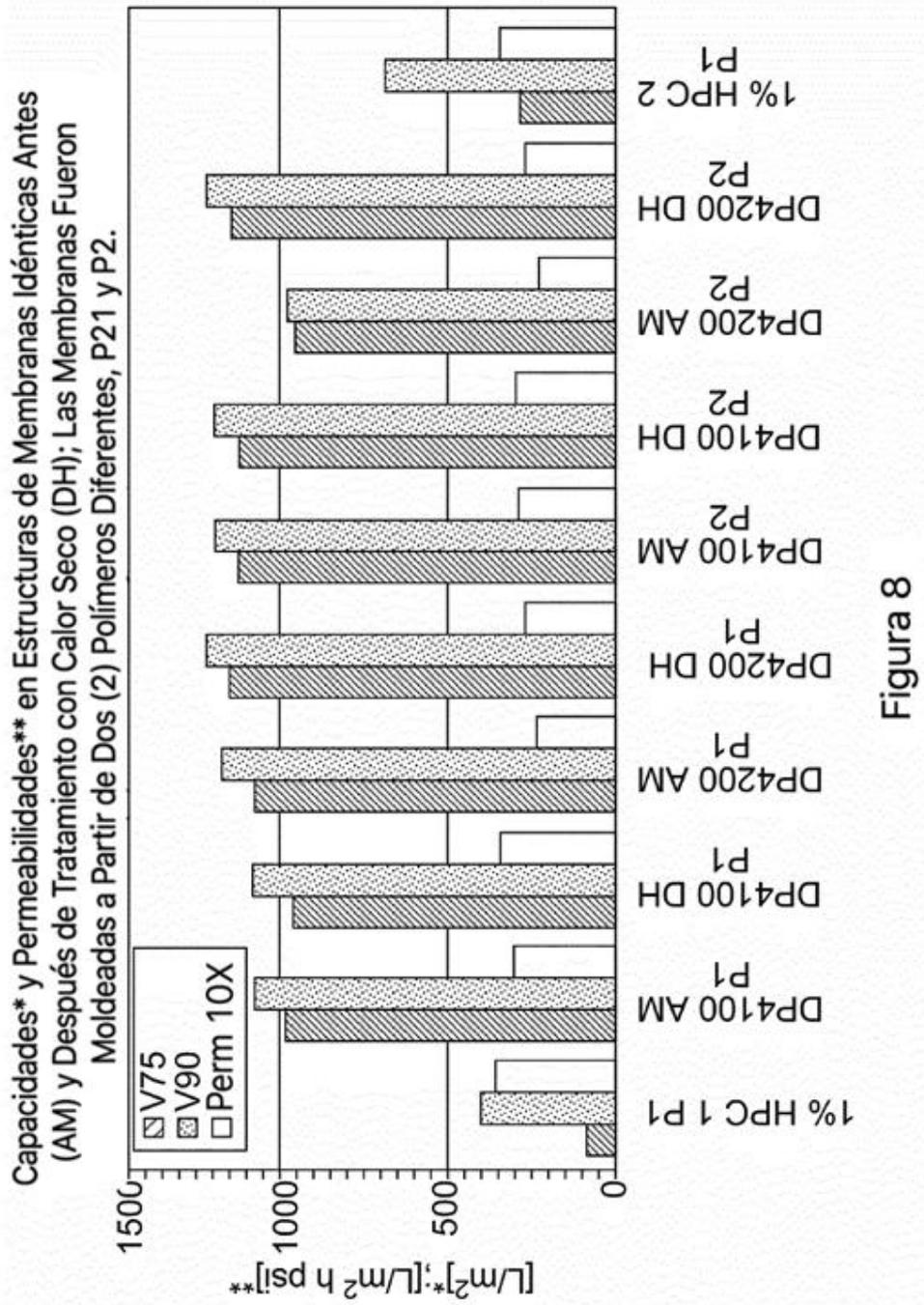


Figura 8

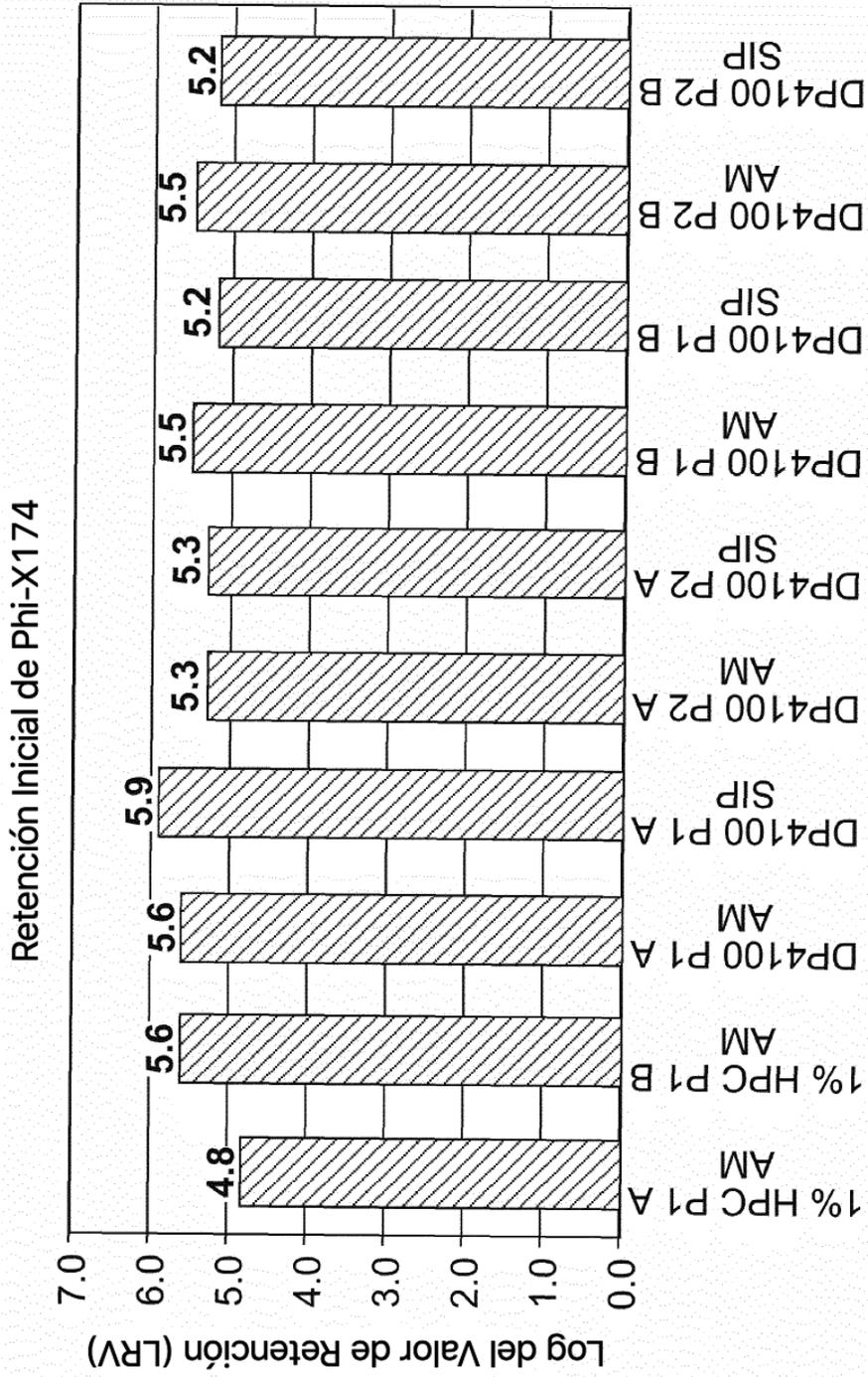


Figura 9A

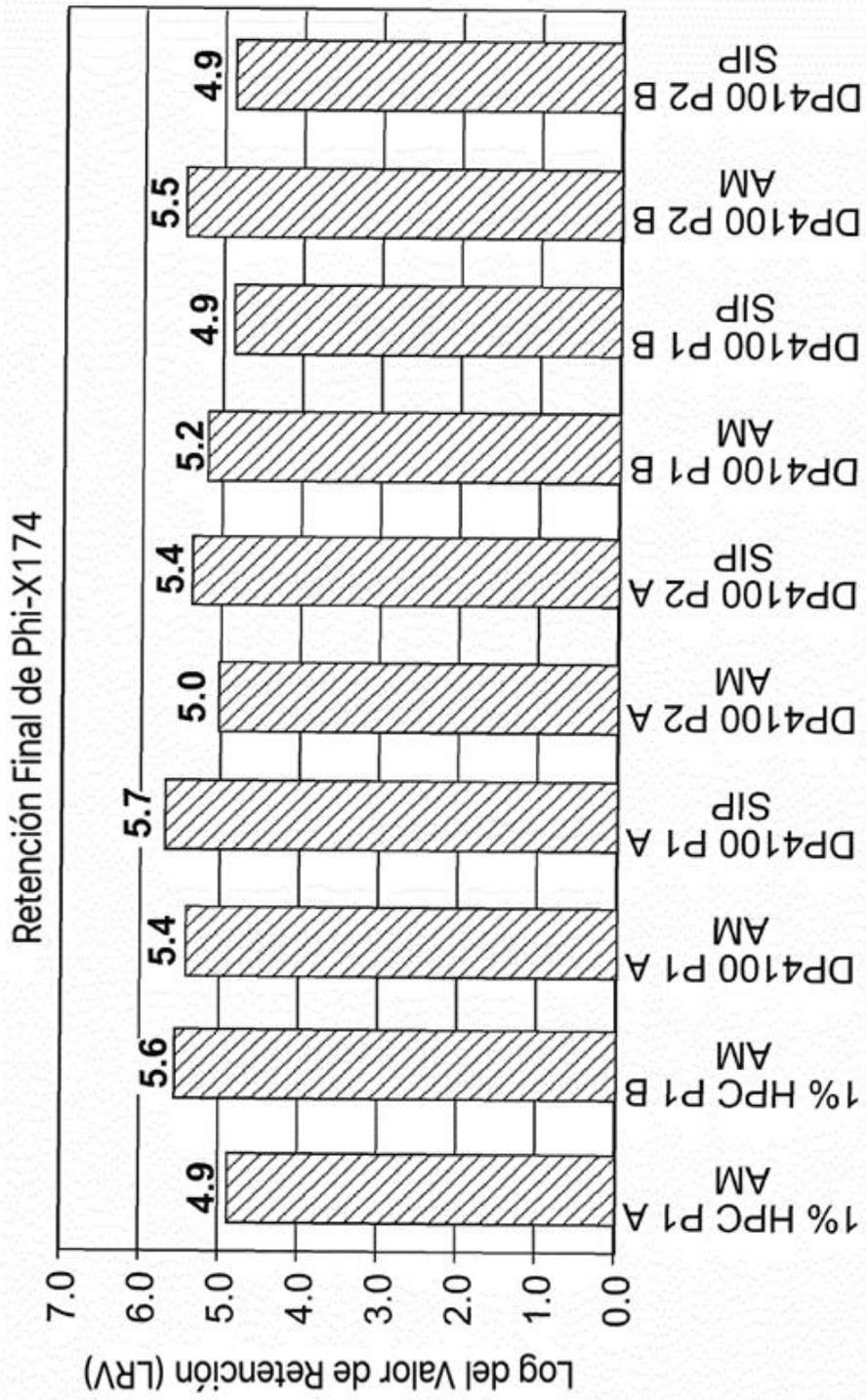


Figura 9B

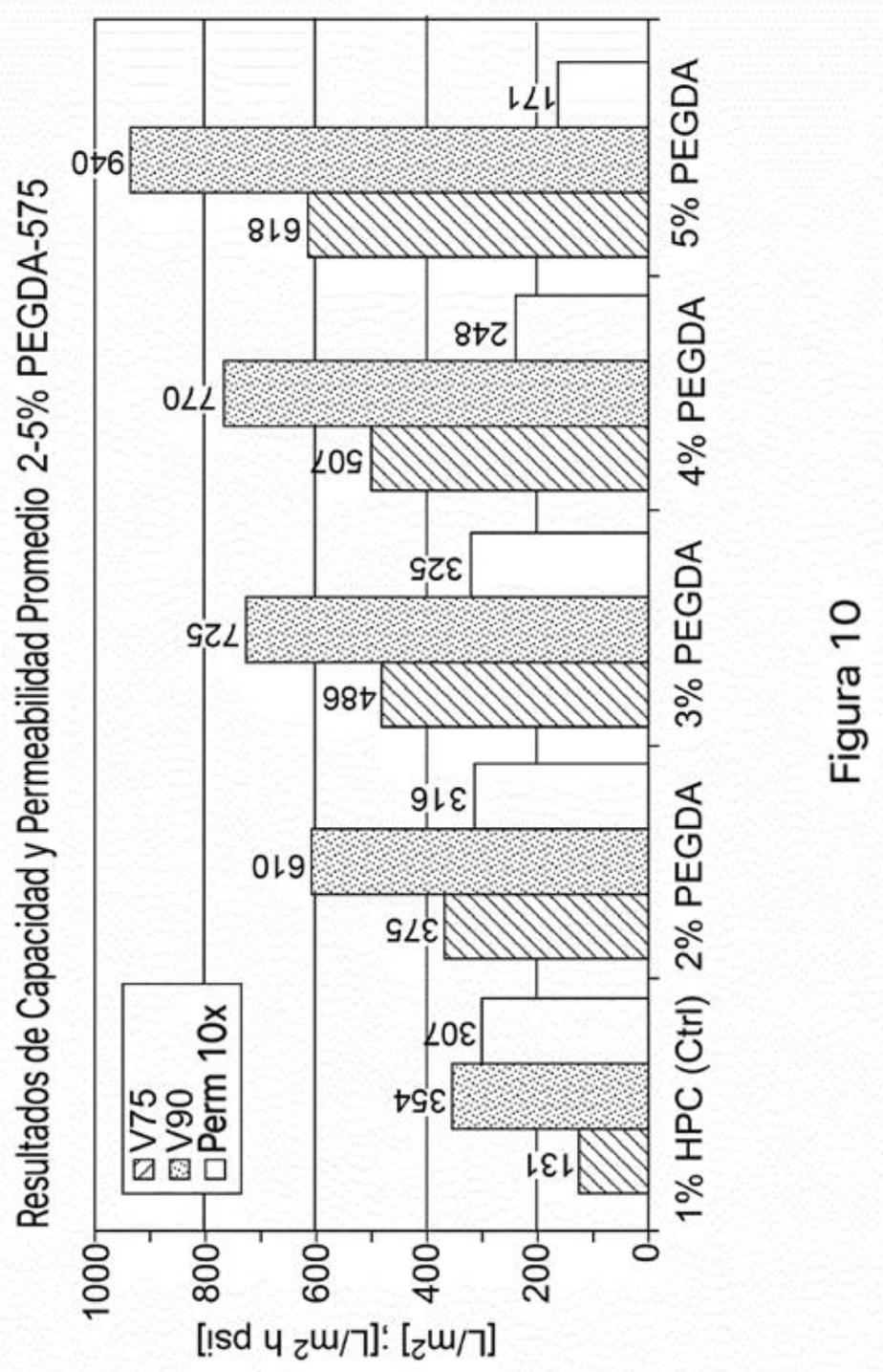


Figura 10

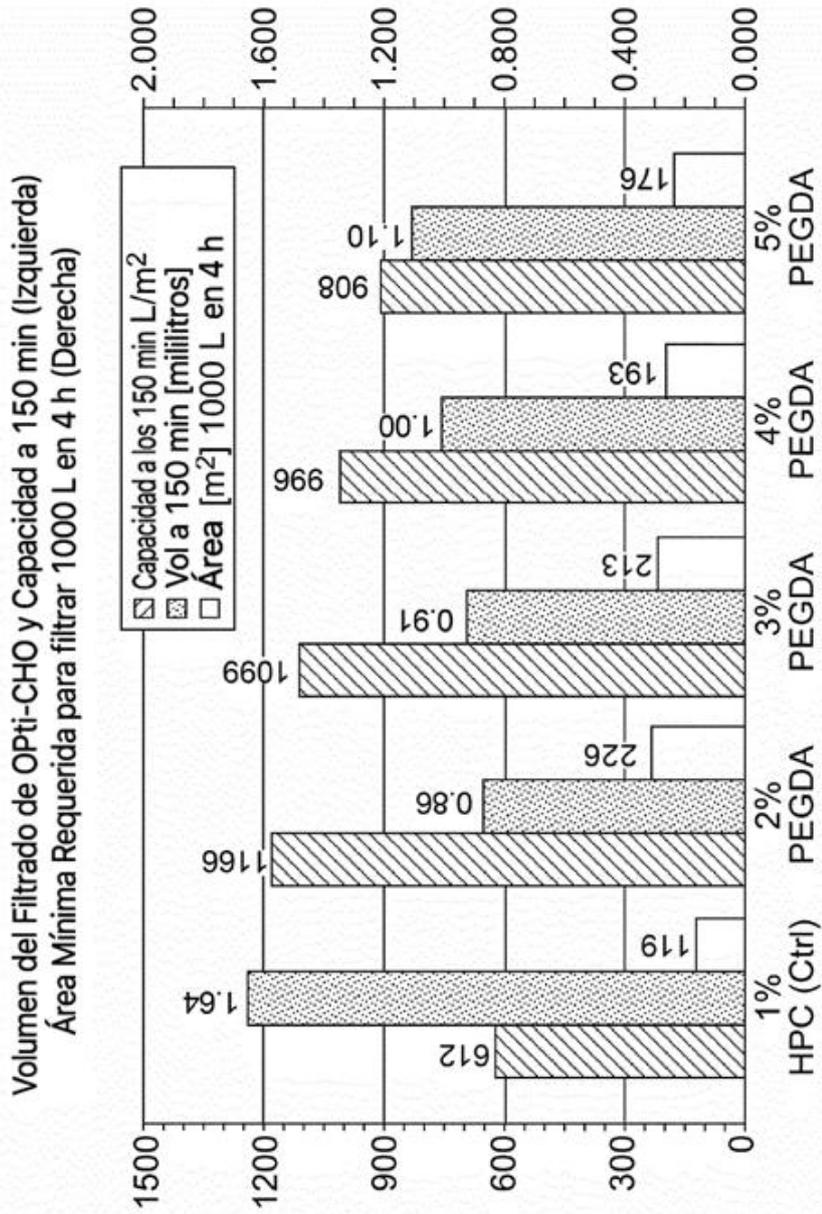


Figura 11

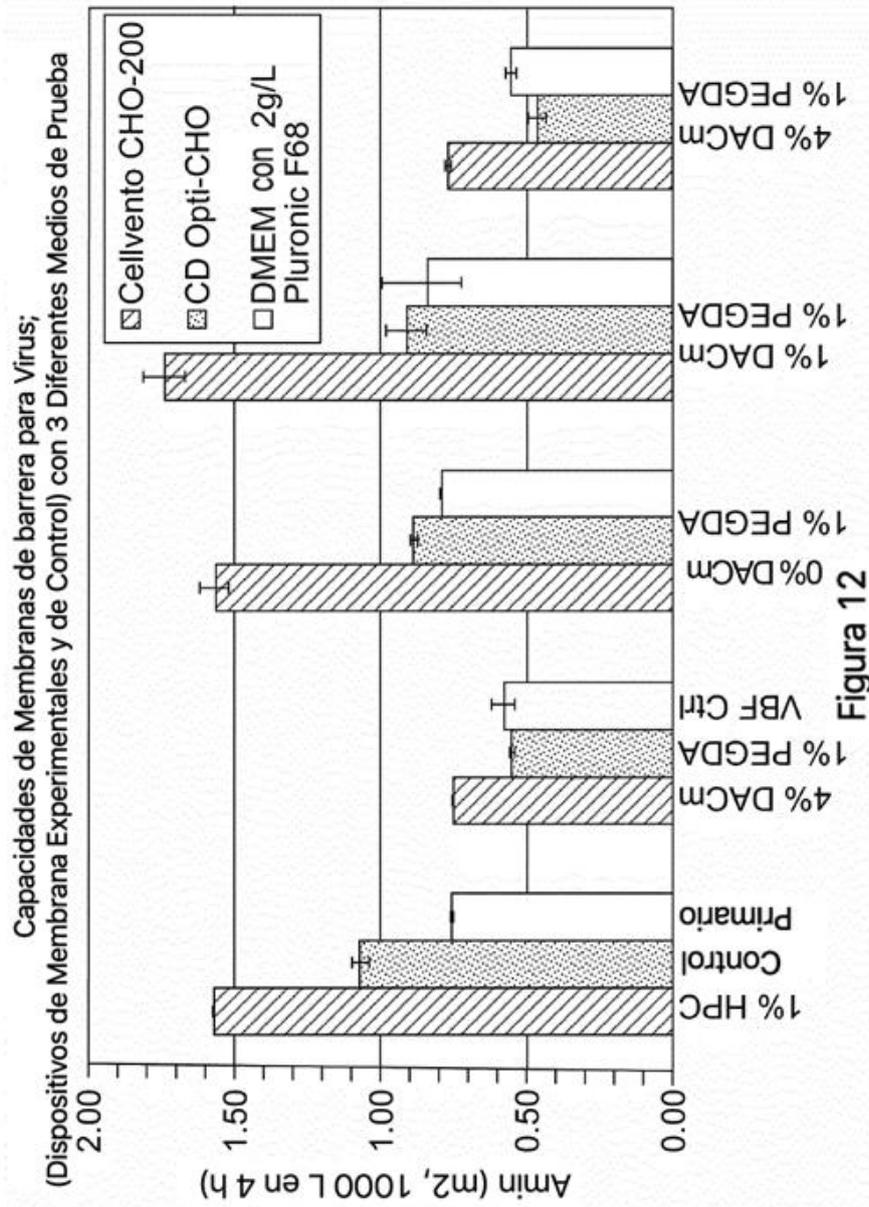


Figura 12