(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 527**

(51) Int. CI.:

D01F 2/24 (2006.01)
D01F 6/44 (2006.01)
D01F 6/88 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026233**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14126575**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13707504 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2959509**

(54) Título: **Fieltro híbrido de nanofibras electrohiladas, método de preparación del mismo y método de purificación de biomoléculas**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

(73) Titular/es:

NANOPAREIL, LLC (33.3%)
310 N. Derby Lane No. 96
Dakota Dunes, South Dakota 57049, US;
MENKHAUS, TODD (33.3%) y
FONG, HAO (33.3%)

(72) Inventor/es:

MENKHAUS, TODD y
FONG, HAO

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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).

DESRIPCIÓN

Fieltro híbrido de nanofibras electrohiladas, método de preparación del mismo y método de purificación de biomoléculas

Campo técnico

La presente invención se refiere, en general, a composiciones para su uso en separaciones biológicas y químicas, así como en otras aplicaciones. Más específicamente, la presente invención se refiere a fieltros híbridos que se fabrican a partir de nanofibras electrohiladas con alta permeancia y alta capacidad.

Antecedentes de la invención

Las membranas de microfibras y nanofibras, o "fieltros", tienen una diversidad de usos diferentes para aplicaciones tanto biológicas como industriales. Por ejemplo, los fieltros son útiles para proporcionar refuerzo textil, ropa protectora, medios catalíticos, aplicaciones agrícolas, sensores medioambientales, supervisión médica y militar, aplicaciones biomédicas (por ejemplo, bioseperaciones, ingeniería de tejidos y vendajes para heridas), aplicaciones electrónicas (por ejemplo, condensadores, transistores y diodos) y aplicaciones espaciales (por ejemplo, velas solares y estructura de refuerzo para espejos solares).
Los fieltros de microfibras y nanofibras son particularmente muy adecuados para la purificación de sustancias biológicas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, bacterias, virus, células y similares. Sin útiles en todas las aplicaciones de fluidos, tanto líquidos como gaseosos.

La industria terapéutica biofarmacéutica está en expansión y cada vez se aprueban más productos biofarmacéuticos para su venta. Además, las herramientas de diagnóstico de base biológica se usan ampliamente para realizar ensayos de diagnóstico sensibles de alta capacidad de producción para diversas patologías. Tanto para terapia como para diagnóstico, las sustancias biológicas (por ejemplo, proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, vacunas virales y ácidos nucleicos) deben producirse eficazmente y purificarse para su uso.

Las metodologías de purificación convencionales incluyen la separación de las sustancias biológicas deseadas de subproductos y otros contaminantes usando, por ejemplo, un relleno de microperlas para absorción/cromatografía, ultrafiltración y precipitación/cristalización. Estos métodos de separación convencionales proporcionan resultados adecuados para muchas aplicaciones biológicas, pero están limitados en términos de rendimiento, tiempo de procesamiento y grado de pureza. Estas limitaciones se deben fundamentalmente a las bajas velocidades de difusión de moléculas relativamente grandes, lo que limita la capacidad de la sustancia que se va a purificar (es decir, la "sustancia diana") a acceder a los sitios de unión disponibles más profundos dentro de la matriz de separación. Además, estos sistemas solo pueden usarse para un número de ciclos limitado, y algunos solo pueden usarse una vez.

El intercambio de iones (IE) y la adsorción por interacción hidrófoba (HI)/cromatografía son dos ejemplos de tecnologías de separación convencionales robustas que se usan ampliamente para la separación de sustancias biológicas. En general, son menos eficaces de forma global que las tecnologías de separación basadas en afinidad específicas, tales como separaciones basadas en anticuerpos, pero si las condiciones de separación se seleccionan cuidadosamente, aún son útiles para purificar muchas sustancias diana de subproductos e impurezas indeseables.

Aunque la adsorción basada en afinidad/cromatografía puede ser más eficaz que IE y HI, es generalmente más difícil y caro de fabricar, debido a la complejidad de producción y purificación de ligandos biológicos, tales como anticuerpos monoclonales y ácidos nucleicos. Tales ligandos a menudo también son muy sensibles a las condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura, pH, fuerza iónica, etc.) y pueden deteriorarse fácilmente, de modo que la interacción de afinidad requerida para la adsorción queda destruida. Además, la interacción de unión en ocasiones es difícil de alterar sin condiciones duras que pueden reducir la actividad biológica y, por tanto, la utilidad de la sustancia diana y/o la reutilizabilidad del medio de purificación.

Se han descrito membranas que son útiles para la purificación de sustancias biológicas. (Véase, por ejemplo, Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, Shang-Tian Yang, Ed., Capítulo 7.) Recientemente, la adsorción en membrana/cromatografía usando fibras con diámetro de nanómetros conseguidas en mallas de espesor contralado (es decir, "fieltros de nanofibras") se ha mostrado como una gran promesa para su uso en bioseparaciones (Todd J. Menkhaus, *et al.,* "Chapter 3: Applications of Electrospun Nanofiber Membranes for Bioseparations", en Handbook of Membrane Research, Stephan V. Gorley, Ed.) Tales fieltros de nanofibras son superiores a los fieltros de microfibras, por los tamaños de poro, las características de afinidad, así como otros criterios de rendimiento, pueden controlarse con mayor precisión.

Un artículo de Zeeshan Khatri et al. con el título *"Effect of deacetylation on wicking behavior of co-electrospun cellulose acetate/polyvinyl alcohol nanofibers blend"* divulga bandas de nanofibra de acetato de celulosa (CA) que tienen buenas propiedades de retención de agua. Se divulga que se preparan nanofibras combinadas de acetato de celulosa (CA)/alcohol polivinílico (PVA) por co-electrohilado usando una doble boquilla para emitir el chorro de

acetato de celulosa y alcohol polivinílico independientemente.

Un artículo de M. Webster et al. con el título *"Tunable Thermo-Responsive Poly(bi-vinylcaprolactam) Cellulose Nanofibers: Synthesis, Characterization, and Fabrication"* divulga homopolímeros de PVCL sensibles a la temperatura y polímeros de PVCL funcionales que contienen ácidos carboxílicos que se preparan en soluciones organicas y acuosas. Los polímeros a granel de PVCL se caracterizan por usar RMN de ^{1}H, fotometría, ATR-FTIR, y análisis térmico. Ocurre una transición en fase finita a 37-40 ºC en soluciones acuosas de PVCL y PVCL-COOH. Los polímeros de PVCL y PVCL-COOH se electrohilan en fibras que varían de 100 a 2.300 nm de diámetro. Las películas bicomponente de PVC L/celulosa se obtienen por electrohilado de CA y PVCL seguido de hidrólisis alcalina.

Aunque descritos previamente, los fieltros de nanofibras de un único componente han proporcionado resultados prometedores, a menudo son menos eficaces de lo que sería deseable en términos de estabilidad de los fieltros, así como requisitos de material y tiempo. Esto es particularmente cierto cuando la sustancia diana solo está presente en el material de partida que se va a purificar a una baja concentración y los contaminantes y/o subproductos de síntesis son abundantes. De esta manera, existe una necesidad de mejorar la estabilidad de los fieltros y la eficacia de purificación de productos biológicos. Las realizaciones divulgadas a continuación satisfacen esa necesidad.

Sumario de la invención

El siguiente sumario simplificado proporciona una comprensión básica de algunos aspectos de la materia objeto reivindicada. Este sumario no es un resumen extensivo y no pretende identificar elementos clave/críticos o delinear el alcance de la materia objeto reivindicada. Su fin es presentar algunos conceptos de una forma simplificada como preludio de la descripción más detallada que se presenta más adelante.

En una realización, la presente invención se refiere a un fieltro híbrido de nanofibras electrohiladas que comprende una nanofibra compuesta y una nanofibra de un único componente. La nanofibra compuesta comprende una mezcla de celulosa derivatizada y un primer polímero no basado en celulosa en donde la nanofibra de un único componente comprende un segundo polímero no basado en celulosa que preferentemente es el mismo o diferente del primer polímero no basado en celulosa. De acuerdo con la presente invención, el primer y segundo polímeros no basados en celulosa pueden retirarse de forma diferencial del fieltro de nanofibras. Esto significa que existen condiciones (ya sea usando disolventes o calor, o una combinación de disolvente y calor) que dan como resultado que uno de los polímeros no basado en celulosa se retire en una mayor extensión que el otro (por ejemplo, un 10 % de diferencia en la capacidad de retirada o mayor, tal como el 20 % o el 50 %).

La celulosa derivatizada en la nanofibra compuesta puede ser un éster organico de celulosa, un éster inorgánico de celulosa o una alquilcelulosa. El éster organico de celulosa puede ser acetato de celulosa, triacetato de celulosa o propionato de celulosa.

Cuando la celulosa derivatizada es un éster inorgánico, esta puede ser nitrato de celulosa y sulfato de celulosa, y cuando es un alquilcelulosa, esta puede ser hidroxietilcelulosa o carboximetilcelulosa.

El primer polímero no basado en celulosa puede ser un polímero sintético o natural, tal como un polímero de vinilo, un poliéter, un polímero acrílico, un poliéster, un policarbonato, un poliuretano, un polisacárido (por ejemplo, almidón o quitina), una poliamida (por ejemplo, proteína o gelatina), polilactida, poliglicolida o un copolímero de los mismos.

En una realización, el segundo polímero no basado en celulosa que forma la nanofibra de un único componente es un polímero sintético, tal como un polímero de vinilo, una poliamida, una poliimida, un poliéster o un copolímero de los mismos.

En otra realización, la presente invención es un método de electrohilado para la fabricación del fieltro de nanofibras descrito anteriormente, que puede describirse en las siguientes etapas: a) preparar por separado una solución de hilatura de un polímero compuesto y una solución de hilatura de un polímero de un único componente; b) poner las soluciones de hilatura en dos hileras diferentes; c) aplicar tensión a cada solución de hilatura con un electrodo; d) electrohilar por separado las nanofibras compuestas y de un único componente de las hileras; y e) recoger las nanofibras solidificadas ya sea como un fieltro de nanofibras tendidas aleatoriamente o alineadas parcialmente.

El fieltro de nanofibras como se forma puede procesarse adicionalmente regenerando la celulosa derivatizada en la nanofibra compuesta (es decir, convirtiéndola de nuevo en celulosa). El método de fabricación del fieltro de nanofibras puede incluir también las etapas adicionales de retirar algo o todo el primer polímero no basado en celulosa de la nanofibra compuesta. Como alternativa o además de estas etapas, el método de preparación del fieltro de nanofibras puede incluir también la etapa de funcionalización de la superficie de una o más de las nanofibras de polímero en el fieltro de nanofibras. Tal funcionalización de la superficie puede suponer la fijación de un ligando de afinidad que tiene una afinidad específica por una molécula diana particular que se va a purificar a partir de un fluido.

En otra realización más, la presente invención es un método de purificación de biomoléculas a partir de un fluido que puede describirse en las siguientes etapas: preparación de un fieltro de nanofibras de acuerdo con el método que se acaba de describir; b) hacer fluir el fluido a través del fieltro de nanofibras; y recuperar las biomoléculas del fieltro de nanofibras.

Otros aspectos de la invención se encuentran en otras partes de la memoria descriptiva.

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1** es una representación esquemática del proceso de electrohilado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, en general, a fieltros híbridos compuestos de nanofibras electrohiladas, usados, por ejemplo, para separaciones químicas y biológicas. Los fieltros híbridos de nanofibras tienen una alta capacidad de separación y proporcionan un rendimiento reproducible durante múltiples ciclos, tanto a alto flujo como a alta presión. Tales fieltros de nanofibras presentan estructuras porosas tridimensionales complejas interconectadas y áreas superficiales relativamente grandes.

En particular, los fieltros híbridos de nanofibras están compuestos de más de un tipo de polímero (es decir, son fieltros "híbridos").

Los fieltros de la presente invención están compuestos de más de un tipo de polímero (es decir, son fieltros "híbridos"). Esto significa que son fieltros híbridos preparados a partir de una combinación de nanofibras de un único componente y "compuestas" (por ejemplo, las nanofibras están preparadas a partir de una mezcla de dos o más materiales) en el fieltro "híbrido". Para la nanofibra "compuesta", el "polímero básico" es una celulosa derivatizada, y el primer polímero no celulósico puede retirarse de la fibra/fieltro por exposición del mismo a una temperatura elevada o disolventes químicos, o tanto a una temperatura elevada como a disolventes químicos. En algunas realizaciones, la retirada del polímero no celulósico simultáneamente convierte la celulosa derivatizada de nuevo en celulosa, es decir, la celulosa se "regenera".

Las nanofibras en los fieltros de la presente invención se fabrican usando una técnica de electrohilado. Esto se refiere a la fabricación de fibras basándose en la exposición de una "solución de hilatura" de polímero extruido a un campo electroestático, lo que da como resultado el alargamiento del "chorro" de polímero extruido en una nanofibra.

Estos y otros aspectos ejemplares de la invención se explican con mayor detalle a continuación.

Definiciones

En la descripción que sigue, se utiliza extensivamente un número de términos. Las siguientes definiciones no limitantes proporcionan una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo el alcance ejemplar que debe darse a tales términos.

Cuando se usan los términos "uno" o "una" en esta divulgación, estos significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que se indique otra cosa.

Los términos "invención" o "presente invención", como se usa en el presente documento, pretenden ser no limitantes y no pretenden hacer referencia a una realización individual de la invención particular sino abarcar todas las realizaciones posibles que se describen en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

El término "permeancia", como se usa en el presente documento, se refiere al flujo de fluido que pasa a través del fieltro de nanofibras por espesor unitario del fieltro, por caída de presión unitaria. Se considera que la permeancia es "alta" si está por encima de 500 l/(min m^2 10^5 Pa).

El término "flujo" se refiere al caudal de fluido que pasa a través del fieltro de nanofibras por tiempo unitario, por unidad de área facial expuesta al flujo.

El término "capacidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de producto unido por unidad de adsorbente. Se considera que la capacidad de absorción de proteínas es "alta" si está por encima de 100 mg de proteína/gramo de adsorbente.

Los términos "membrana", "fieltro" y "malla", como se usan en el presente documento, son intercambiables y se refieren a una agrupación de fibras no tejidas o tendidas aleatoriamente.

La expresión "fieltro de nanofibras", como se usa en el presente documento, se refiere a una agrupación de nanofibras en una disposición sustancialmente plana, que puede incluir también microfibras añadidas para

resistencia, potenciación de flujo, etc.

El término "microfibras", como se usa en el presente documento, se refiere a fibras con diámetros mayores de 1,0 micrómetros y, en general, entre 1,0 micrómetros y 1,0 milímetros.

El término "nanofibras", como se usa en el presente documento, se refiere a fibras con diámetros más pequeños de 1,0 micrómetros y, en general, entre 10 nanómetros y 1,0 micrómetros tal como entre 200 nm y 600 nm.

La expresión "fieltro híbrido de nanofibras", como se usa en el presente documento, se refiere a una agrupación de fibras no tejidas o tendidas aleatoriamente, que consiste en al menos dos tipos de polímeros en una combinación de fibras de un único componente o fibras compuestas con cualquiera de al menos otra fibra de un único componente o al menos otra fibra compuesta.

La expresión "nanofibras de un único componente", como se usa en el presente documento, se refiere a nanofibras producidas a partir de un único polímero.

La expresión "fieltro de nanofibras de un único componente", como se usa en el presente documento, se refiere a la acumulación de muchas nanofibras de un único componente en una agrupación de fibras no tejidas o tendidas aleatoriamente.

La expresión "nanofibras compuestas", como se usa en el presente documento, son nanofibras producidas a partir de al menos dos polímeros diferentes.

La expresión "temperaturas moderadamente elevadas", como se usa en el presente documento, se refiere a temperaturas entre 24 y 110 ºC.

La expresión "retirable diferencialmente", como se usa en el presente documento, indica que, cuando el fieltro híbrido de nanofibras consiste en al menos dos polímeros no basados en celulosa, pueden seleccionarse condiciones (temperatura elevada y/o exposición a disolvente) para retirar uno de los polímeros no basados en celulosa en un mayor grado (al menos 10 % diferente, y hasta 100 % frente a 0 %) que el otro polímero no basado en celulosa.

El término "disolvente", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier componente individual líquido o mezcla de líquidos capaz de disolver uno o más componentes del fieltro de nanofibras.

La expresión "solución de hilatura", como se usa en el presente documento, se refiere a la solución de polímero que se usa en el proceso de electrohilado.

El término "electrohilado", como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación de fuerzas eléctricas a la solución de hilatura para formar las nanofibras.

La expresión "térmicamente estable", como se usa en el presente documento, significa que el polímero no se desintegra en el intervalo de temperatura de 50-110 ºC.

La expresión "químicamente estable", como se usa en el presente documento, significa que el polímero no es soluble en disolventes tales como agua o disolventes orgánicos comunes (por ejemplo, alcoholes e hidrocarburos), y sus mezclas.

Celulosa derivatizada

La celulosa es el componente estructural encontrado en las paredes celulares de plantas y algas. La secretan también algunas bacterias. Como tal, la celulosa es el compuesto organico más abundante en la Tierra. Se deriva de unidades D-glucosa unidas entre sí en un polímero de cadena lineal mediante enlaces ß(1-4) glucosídicos. Para aplicaciones biológicas e industriales, se purifica a partir de plantas, pasta de madera o algodón y se convierte en muchas sustancias útiles tales como papel, celofán, rayón, biocombustibles, etc. La utilidad de la celulosa puede atribuirse en gran medida a sus propiedades físicas. Es inodora, hidrófila, relativamente insoluble, presenta una unión no específica muy baja y es biodegradable.

Aunque los medios de separación basados en celulosa tienen muchas ventajas, desafortunadamente experimentan inestabilidad química (es decir, se degradan) en ácidos y bases fuertes. Adicionalmente, la disolución de celulosa requiere el uso de mezclas de disolvente especiales tales como N-metilmorfolina-N-óxido (NMMO) y agua, o cloruro de litio y *N,N*-dimetilacetamida. Esto limita el uso de los medios basados en celulosa para operaciones que no requieren las condiciones de regeneración tan duras que a menudo se requieren en la industria biofarmacéutica para satisfacer regulaciones de limpieza estricta requeridas por la FDA.

Las fibras de celulosa se producen convencionalmente mediante hilado húmedo e implican derivatización de la celulosa previamente, puesto que es muy difícil electrohilar la celulosa directamente a partir de una solución o fundido. Para preparar nanofibras de celulosa, los esfuerzos de los investigadores se han dedicado a electrohilar derivados de celulosa tales como acetato de celulosa. A diferencia de la celulosa, el acetato de celulosa es soluble en muchos disolventes comunes tales como acetona. El acetato de celulosa puede electrohilarse y pueden producirse fibras de celulosa regeneradas sometiendo las nanofibras a un tratamiento post-hilado de hidrólisis/desacetilación.

Por consiguiente, en la práctica de la presente invención, uno de los polímeros en el fieltro hibrido de nanofibras es celulosa derivatizada. La celulosa puede derivatizarse fácilmente usando métodos bien conocidos, convirtiendo los grupos -OH de las unidades glucosa individuales en otros restos con mayor o menor reactividad, variando las cargas, etc. Tales especies de celulosa derivatizada presentan estabilidad potenciada cuando se exponen a disolventes y otras propiedades físicas deseables. Muchos derivados de celulosa son fácilmente disponibles en el mercado. Las especies de celulosa derivatizada ejemplares incluyen, por ejemplo: ésteres orgánicos (acetato, triacetato, propionato, acetato propionato, acetato butirato de celulosa); ésteres inorgánicos (nitrato de celulosa, sulfato de celulosa); y alquil celulosa (hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa).

Los fieltros híbridos de nanofibras de la presente invención normalmente tendrán una mayoría en masa (es decir, 51 % o mayor) de celulosa derivatizada, tal como mayor el 60 % o el 70 %.

Polímeros no basados en celulosa

Aunque la mayor parte en masa en el fieltro híbrido de nanofibras es celulosa derivatizada, la incorporación de tipos adicionales de fibras dentro de los fieltros proporciona la funcionalidad necesaria para las aplicaciones de los fieltros. Por consiguiente, es deseable tener fibras adicionales dentro de los fieltros porque pueden proporcionar resistencia mecánica aumentada al fieltro, permitir que se incorporen múltiples funcionalidades al fieltro, proporcionar estabilidad al proceso de fabricación y otros aspectos, como se explica en otro punto del presente documento. De hecho, los presentes inventores descubrieron inesperadamente que incluir una proporción incluso pequeña de polímeros que no están basados en productos celulósicos en el fieltro híbrido de nanofibras mejoraba el proceso de electrohilado y también permitía la personalización del producto acabado para una diversidad de aplicaciones biológicas e industriales, especialmente cuando el fieltro híbrido de nanofibras consistía tanto en una nanofibra compuesta como una nanofibra de un único componente.

Las nanofibras de polímero sintético (por ejemplo, aquellas producidas a partir de polímeros de vinilo y polímeros acrílicos) ofrecen un amplio intervalo de funcionalidades químicas para bioseparaciones y otras aplicaciones. Combinando diferentes unidades poliméricas, puede controlarse la química superficial de la fibra resultante, aparte del proceso de electrohilado, proporcionando funcionalidad directa a la nanofibra producida. Como una alternativa y de forma similar a las fibras a escala de micrómetros convencionales, la funcionalidad superficial de las nanofibras de polímero puede modificarse químicamente después del electrohilado para adaptarse a requisitos de funcionalidad específicos para diversas aplicaciones de bioseparación (analizadas más adelante). Las químicas de funcionalización se conocen bien en la técnica de polímeros. Generalmente soportan regímenes de limpieza duros asociados con los bioprocesos. Las químicas de funcionalización ejemplares se analizan también con mayor detalle en otro punto del presente documento.

Los medios de adsorción basados en carbono sintético y membranas de filtración a menudo son mucho más robustos químicamente que los medios basados en celulosa y, por tanto, pueden usarse cuando se requieren ácidos y bases fuertes para la limpieza de los medios de separación entre usos. Además, las nanofibras híbridas que incluyen polímeros tanto basados en celulosa como no basados en celulosa (por ejemplo, poliacrilonitrilo y alcohol polivinílico) presentan un área superficial específica incluso mayor y una resistencia incluso mayor y una resistencia mecánica mayor cuando se comparan con celulosa de un único componente o nanofibras de polímero sintético de un único componente. Por consiguiente, hay una sinergia observable cuando las nanofibras compuestas incluyen polímeros tanto basados en celulosa como no basados en celulosa.

Muchos polímeros se han electrohilado con éxito en nanofibras, incluyendo (1) homopolímeros termoplásticos tales como polímeros de vinilo, polímeros acrílicos, poliamidas, poliésteres, poliéteres y policarbonatos, (2) copolímeros termoplásticos tales como polímeros de vinil-co-vinilo, copolímeros de acrílico-co-acrílico y polímeros de vinilo-co-acrílico, (3) polímeros elastoméricos tales como elastómeros de copolímero tribloque, elastómeros de poliuretano y elastómeros de etileno-propileno-dieno, (4) polímeros de alto rendimiento tales como poliimidas y poliamidas aromáticas, (5) polímeros cristalinos líquidos tales como poli(p-fenilentereftalamida) y poliaramida, (6) polímeros textiles tales como polietilentereftarato y poliacrilonitrilo, (7) polímeros eléctricamente conductores tales como polianilina, así como (8) polímeros biocompatibles (es decir, "biopolímeros") como policaprolactona, polilactida, quitosano y poliglicolida. Como se describe, el polímero puede ser también un copolímero de dos o más de las especies de polímero nombradas anteriormente.

Los ejemplos de polímeros adicionales que pueden añadirse a los fieltros híbridos de nanofibras son electrohilado como nanofibras de un único componente a partir de poliacrilonitrilo (PAN), poliimidas, poliamidas (nailon 6, nailon

6,6, nailon 6,10, etc.), poliésteres (polietilentereftarato, etc.), así como copolímeros de los mismos.

Nanofibras compuestas

El fieltro híbrido de nanofibras de la presente invención incluye una nanofibra compuesta. Esto se debe parcialmente al hecho de que el proceso de electrohilado usado para preparar las nanofibras a partir de soluciones de celulosa derivatizada de un único componente puede ser inestable y dar como resultado rendimientos bajos, una baja eficacia (tiempos largos y muchas interrupciones), nanofibras de mala calidad (gran distribución de tamaño, frágiles, etc.), con solo una funcionalidad química. Por lo tanto, para crear eficientemente grandes cantidades de fieltros de nanofibras de alta calidad con múltiples funcionalidades, de acuerdo con la reivindicación 1, se combina un derivado de celulosa con al menos un polímero no basado en celulosa que estabiliza el proceso de electrohilado.

El polímero no basado en celulosa de las nanofibras compuestas de la presente invención puede consistir en polímeros basados en carbono sintéticos que son removibles del fieltro de nanofibras por exposición del mismo a una temperatura elevada y/o disolventes. La exposición del fieltro de nanofibras a cualquiera de una mezcla de disolventes o una combinación de temperatura elevada y disolventes puede ocurrir de forma simultánea o secuencial. La presencia del polímero no basado en celulosa durante el proceso de electrohilado potencia también la estabilidad de la nanofibra y otros aspectos del proceso, como se explica en otro punto del presente documento.

Las nanofibras de polímero sintético (por ejemplo, aquellas producidas a partir de polímeros de vinilo y polímeros acrílicos) ofrecen un amplio intervalo de funcionalidades químicas para aplicaciones de bioseparación. Combinando diferentes unidades poliméricas, la química superficial de la fibra resultante puede controlarse como parte del proceso de electrohilado, proporcionando funcionalidad directa a la nanofibra producida. Como una alternativa, y de forma similar a las fibras de escala micrométrica convencional, la funcionalidad superficial de las nanofibras de polímero puede modificarse químicamente después del electrohilado para adaptarse a requisitos de funcionalidad específicos para diversas aplicaciones de bioseparación (analizados más adelante). Las nanofibras de polímero sintético ofrecen un tremendo intervalo de químicas de funcionalización potenciales que sirven a una amplia diversidad de usos. Tales químicas de funcionalización se conocen bien en la técnica de polímeros. Soportan también generalmente los duros regímenes de limpieza asociados con los bioprocesos.

Muchos polímeros se han electrohilado con éxito en nanofibras, incluyendo (1) homopolímeros termoplásticos tales como polímeros de vinilo, polímeros acrílicos, poliamidas, poliésteres, poliéteres y policarbonatos, (2) copolímeros termoplásticos tales como polímeros de vinil-co-vinilo, copolímeros de acrílico-co-acrílico y polímeros de vinilo-co-acrílico, (3) polímeros elastoméricos tales como elastómeros de copolímero tribloque, elastómeros de poliuretano y elastómeros de etileno-propileno-dieno, (4) polímeros de alto rendimiento tales como poliimidas y poliamidas aromáticas, (5) polímeros cristalinos líquidos tales como poli(p-fenilentereftalamida) y poliaramida, (6) polímeros textiles tales como polietilentereftarato y poliacrilonitrilo, (7) polímeros eléctricamente conductores tales como polianilina, así como (8) polímeros biocompatibles como policaprolactona, polilactida y poliglicolida.

Los polímeros no basados en celulosa ejemplares para la preparación de nanofibras compuestas incluyen, por ejemplo, óxido de polietileno, poli(vinilpirrolidona), poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico), polisacáridos (quitina, almidón, etc.) poliestireno y poli(metil metacrilato).

El polímero no basado en celulosa normalmente está presente en las nanofibras compuestas en una cantidad del 49 % o menos en masa, tal como el 30 %, el 25 %, etc.

Electrohilado

El electrohilado es una técnica que utiliza fuerzas eléctricas únicamente para impulsar el proceso de hilado y producir fibras de polímero a partir de soluciones o fundidos. A diferencia de las técnicas de hilado convencionales (por ejemplo, hilado en solución y en estado fundido), que son capaces de producir fibras con diámetros en el intervalo de micrómetros (aproximadamente 5~25 μm), el electrohilado es capaz de producir fibras con diámetros en el intervalo de nanómetros. Las nanofibras de polímero electrohiladas poseen muchas propiedades extraordinarias incluyendo el pequeño diámetro de fibra y la consiguiente área superficial específica grande, el alto grado de orientación macromolecular y las propiedades mecánicas superiores resultantes. Adicionalmente, los fieltros preparados de nanofibras de polímero electrohilado presentan tamaños de poro controlados cuando se comparan con nanofibras que se forman usando otras técnicas de fabricación. A diferencia de las nanovarillas, nanotubos y nanocables que se producen principalmente por métodos sintéticos, las nanofibras electrohiladas se producen mediante un "proceso de nano-fabricación", que da como resultado nanofibras de bajo coste que son también relativamente fáciles de montar y procesar en aplicaciones.

En general, la formación de nanofibras es un equilibrio delicado y complicado de tres fuerzas principales implicadas en el proceso de electrohilado, incluyendo la fuerza eléctrica, la tensión superficial y la fuerza viscoelástica. Entre estas tres fuerzas, la fuerza eléctrica siempre favorece la formación del producto con las áreas superficiales más altas. La tensión superficial siempre favorece la formación de producto con las áreas superficiales más bajas. La fuerza viscoelástica es una fuerza que varía significativamente con la evaporación del disolvente, y es la razón

principal que evita la rotura del chorro de electrohilado/filamento en gotas. Cuando domina la fuerza eléctrica, la fuerza viscoelástica trabaja contra la fuerza eléctrica. Cuando domina la tensión superficial, la fuerza viscoelástica trabaja contra la tensión superficial.

En teoría, las nanofibras más pequeñas son capaces de formarse en dos condiciones: (1) cuando el exceso de densidad de carga llevado por el chorro de electrohilado es alto y (2) cuando el periodo de tiempo es suficientemente largo y la fuerza viscoelástica es suficientemente alta para evitar la rotura capilar del chorro/filamento, pero suficientemente baja para permitir que la fuerza eléctrica estire eficazmente el chorro. Para la condición (1), se ha encontrado que la adición de electrolitos solubles a la solución de hilatura (por ejemplo, la adición de electrolitos fuertes tales como NaCl a una solución acuosa de óxido de polietileno), puede aumentar significativamente el exceso de densidad de carga llevado por el chorro y provocar la formación de nanofibras de menor diámetro. Sin embargo, este método crea también efectos negativos tales como (a) un menor caudal y una disminución resultante en la productividad de nanofibras y (b) la contaminación de las nanofibras preparadas por los electrolitos. La retirada de los electrolitos sin sacrificar las propiedades de las nanofibras puede ser difícil.

Para la condición (2), se requiere la compresión adicional de la solidificación del chorro. En general, la solidificación del chorro está muy relacionada con la volatilidad del disolvente. Si la volatilidad del disolvente es demasiado alta, el periodo de tiempo para estirar eficazmente el chorro/filamento de electrohilado es corto. En consecuencia, se obtendrán fibras con diámetros relativamente grandes. Si la volatilidad del disolvente es demasiado baja, es probable que el chorro/filamento de electrohilado se rompa en gotas con el estirado. En consecuencia, se obtendrán perlas y/o fibras granuladas.

El proceso de electrohilado generalmente incluye tres etapas: (1) inicio del chorro/filamento de electrohilado y la extensión del chorro a lo largo de una trayectoria recta; (2) crecimiento de la inestabilidad por torsión y alargamiento adicional del chorro, lo que permite que el chorro se haga muy largo y gire mientras sigue una trayectoria de bucle y espiral; y (3) la solidificación del chorro mediante evaporación con disolvente o enfriamiento, que conduce a la formación de nanofibras. La Figura 1 muestra esquemáticamente el proceso de electrohilado (Hao Fong, In Polymeric Nanostructures and Their Applications, Volumen 2: Applications: Capítulo 11, Electrospun Polymer, Ceramic, Carbon/Graphite Nanofibers and Their Applications, Hari S. Nalwa Editor, American Scientific Publishers, Los Ángeles, CA (ISBN: 1-58883-070-5), 2007, pág. 451-474.

Un proceso de electrohilado de ejemplar puede describirse de forma general de la siguiente manera:

Etapa 1: Como se muestra en la Figura 1, una solución de hilatura (por ejemplo, una solución de polímero) se pone en un recipiente con una hilera (1), se aplica una alta tensión CC (2), normalmente en el intervalo de 5-40 kilovoltios, a la solución mediante un electrodo (por ejemplo, un hilo de cobre) (3). Se pone un colector (4) conectado eléctricamente a tierra a una cierta distancia (5) (conocida como distancia de separación) lejos de la hilera. La distancia de separación puede variar entre unos pocos centímetros hasta un metro. Cuando el campo electroestático alcanza un valor crítico y la fuerza eléctrica supera la tensión superficial y las fuerzas viscoelásticas, se eyecta un chorro/filamento y se desplaza recto una cierta distancia (conocida como longitud de chorro).

Etapa 2: El chorro empieza entonces a torcerse, formando bucles helicoidales. Este fenómeno se denomina "inestabilidad por torsión (o trepidación)". Típicamente, la inestabilidad por torsión provoca que la longitud de un chorro se alargue en más de 10.000 veces en un corto periodo de tiempo (50 ms o menos). De esta manera, la tasa de alargamiento durante la inestabilidad por torsión es extremadamente alta (hasta 1.000.000 s^{-1}). Esta tasa de alargamiento extremadamente alta puede estirar eficazmente la cadena de macromoléculas y alinearlas de forma cercana a lo largo del eje de la nanofibra.

Etapa 3: El chorro solidifica, ya sea por evaporación del disolvente o cuando el fundido se enfría por debajo de la temperatura de transición sólido-liquido. Cuanto más largo es el tiempo de solidificación, más puede alargarse el chorro. El tiempo de solidificación está relacionado con muchos factores tales como la presión de vapor del disolvente, la difusividad de disolvente, la densidad de carga volumétrica llevada por el chorro y la resistencia del campo electroestático aplicado.

Procesamiento post-electrohilado opcional

Después de la solidificación de las nanofibras recogidas, hay algunas etapas adicionales que pueden realizarse para "personalizar" las nanofibras para usos particulares. Se analizan a continuación algunas etapas adicionales ejemplares.

a. Retirada del primer polímero no celulósico

En algunos casos, uno o más de los polímeros, y en particular el polímero no basado en celulosa presente en una nanofibra compuesta, puede retirarse usando calor elevado y/o disolvente(s). La retirada del primer polímero no celulósico proporciona un área superficial adicional y una porosidad mejorada al polímero basado en celulosa restante. Esto es porque después de la retirada del polímero no basado en celulosa, el polímero basado en celulosa

tiene "poros" de tamaño controlado que quedan donde el polímero no basado en celulosa solía ocupar el espacio. Este "espacio hueco" adicional proporciona una mayor área superficial en el fieltro de nanofibras resultante que, por ejemplo, puede aumentar la capacidad de unión adsortiva para separaciones, mejorar la selectividad de separaciones basadas en tamaño y mejorar la capacidad de producción con respecto a porosidad adicional. La retirada del polímero no basado en celulosa anula la oportunidad de que están presentes múltiples funcionalidades (que habían estado presentes dentro de la nanofibra compuesta) directamente sobre la nanofibra de polímero basado en celulosa restante.

b. Regeneración de celulosa

Después de la preparación de las nanofibras por "electrohilado", la celulosa derivatizada puede convertirse en celulosa mediante el proceso de regeneración. La celulosa regenerada tendrá las mismas propiedades que la celulosa nativa pura descrita anteriormente. El proceso de regeneración se completa poniendo en contacto nanofibras que contienen celulosa derivatizada con, por ejemplo, una base fuerte (por ejemplo, hidróxido sódico), u otro disolvente. Después de la reacción de regeneración para conversión de celulosa, las nanofibras pueden lavarse para retirar cualquier exceso de disolvente usado durante el proceso.

c. Funcionalización de la superficie

Después de la preparación de fieltros híbridos de nanofibras, las superficies de las fibras pueden funcionalizarse. Algunos ejemplos no limitantes de funcionalización incluyen la adición de grupos de intercambio de iones tales como ácidos y bases débiles o fuertes (por ejemplo, ácidos carboxílicos y aminas), grupos hidrófobos tales como compuestos fenólicos y ligandos de actividad tales como anticuerpos o sustratos enzimáticos.

Para su uso en bioseparación, los fieltros híbridos de nanofibras de la presente invención son idealmente biológicamente inertes, lo que significa que deberían resistir la unión no especifica de sólidos insolubles tales como células y residuos celulares, así como interacciones no deseadas con proteínas, azúcares, ácidos nucleicos, virus y otros componentes solubles presentes en muchos sistemas producidos biológicamente.

Además, los fieltros de nanofibras para su uso en bioseparación deberían presentar diversas cualidades: (1) fibras de pequeño diámetro para permitir la mayor cantidad de área específica (este criterio es más importante para procesos de adsorción y menos importante para separaciones basadas estrictamente en tamaño, analizadas más adelante); (2) distribución del tamaño de poro bien controlada y estrecha entre fibras para permitir una distribución de flujo uniforme durante las aplicaciones de adsorción y para un corte de tamaño preciso para separaciones basadas en tamaño; (3) las fibras deberían tener excelente estabilidad mecánica y química para soportar presiones operativas potencialmente altas y condiciones de limpieza duras; y (4) las fibras deberían tener un tamaño y una composición química bien definidos y espacialmente consistentes.

Para los procesos de adsorción, donde los productos macromoleculares tales como proteínas, ácidos nucleicos y virus son las dianas predominantes, el área superficial extremadamente grande asociada con los fieltros de nanofibras proporciona un enorme número de sitios de unión potenciales para bioseparaciones de adsorción. Las nanofibras pueden modificarse para contener un tremendo número de sitios de unión y la adsorción ocurre casi exclusivamente sobre la superficie de las fibras, lo que hace que los sitios de unión estén inmediatamente disponibles sin requerir que la molécula diana relativamente grande se difunda internamente. La difusión interna puede limitar la capacidad de muchos procesos de adsorción de bioproductos cuando se usan perlas de resina porosa tradicionales. Además, debido a que las membranas de nanofibras pueden prepararse a partir de muchas químicas diferentes, el ligando de adsorción puede adaptarse para satisfacer las necesidades de una separación particular (por ejemplo, iónica, hidrófoba y de afilidad). En algunos casos, el ligando puede incorporarse en la nanofibra a partir de los materiales fuente durante el electrohilado o, como alternativa, la superficie puede modificarse químicamente parar modificar el agente adsorbente deseado después de producir la nanofibra.

Dos de las características más importantes de la operación de separación son que, (1) el flujo es a través de los micro- y macro- poros del fieltro (a diferencia de las perlas de resina fuertemente empaquetadas), y (2) la adsorción tiene lugar sobre la superficie de las fibras, donde no se requiere difusión interna. Estos factores reducen las preocupaciones sobre caídas de alta presión con caudales elevados, y eliminan la lenta difusión intrapartículas requerida para la adsorción dentro de las perlas de resina. Se ha mostrado que la capacidad de unión de biomoléculas a los fieltros de adsorción actualmente disponibles es similar en magnitud a las perlas de resina, pero puede trabajar a caudales de procesamiento 10 veces más rápido que los lechos de relleno. Estos factores permiten tiempos de procesamiento mucho más rápidos y niveles de unión potencialmente mayores para purificar productos biológicos valiosos. Esto es altamente deseable, especialmente para biomoléculas grandes (pesos moleculares mayores de 250 kDa y/o diámetros hidrodinámicos de 20-300 nm), porque son extremadamente difíciles de purificar usando lechos de relleno debido a las severas limitaciones de transferencia de masa dentro de los pequeños poros de las perlas de resina.

La superficie de los fieltros de nanofibras de la presente invención puede modificarse para proporcionar intercambio de iones y química de interacción hidrófoba. Se ha usado una modificación química sencilla, tal como la sulfonación

de las fibras de poliestireno con ácido sulfúrico, para producir un medio de intercambio de cationes. Se ha usado injerto, polimerización por radicales con transferencia de átomos (ATRP) y tratamientos con plasma para crear grupos funcionales en la superficie de intercambio de iones, así como agrupaciones tridimensionales a partir de una diversidad de sustancias poliméricas incluyendo polipropileno, difluoruro de polivinilideno, polisulfona y otros. Pueden introducirse grupos fenilo y butilo como ligandos de interacción hidrófoba. En ocasiones, la superficie de las membranas de polímero debe modificarse adicionalmente para una mayor hidrofilia para rechazar la unión no específica. Esto se ha conseguido mediante la introducción de poli(etilenglicol) y otros polioles sobre la superficie.

La capacidad de intercambio de iones de un fieltro híbrido de nanofibras puede potenciarse también mediante la introducción, por ejemplo, de grupos dietilaminoetilo (DEAE) como un ligando de intercambio de aniones débil o ácido carboxílico como un ligando de intercambio de cationes débil.

d. Funcionalización de la superficie con antimicrobianos

En una realización de la presente invención, el polímero no basado en celulosa es poliacrilonitrilo (PAN). Las membranas fibrosas de PAN se han adoptado ampliamente en filtración debido a su estabilidad térmica, altas propiedades mecánicas y resistividad química. Los fieltros de nanofibras de PAN electrohiladas son de particular interés debido a propiedades tales como pequeños diámetros de fibra y las consecuentes grandes áreas superficiales específicas, así como capacidades para controlar los tamaños de poro entre nanofibras y de incorporar agentes microbianos a escala nanométrica. Los fieltros que consisten en nanofibras con funcionalidad antimicrobiana han atraído una atención creciente debido a preocupaciones sobre calidades de agua purificada y/o aire filtrado, así como costes de procesamiento. Los filtros de agua y aire (particularmente aquellos que funcionan en condiciones de oscuridad y humedad) son constantemente sujeto de ataques por microorganismos medioambientales. Los microorganismos (tal como bacterias) que pueden ser capturados fácilmente por los filtros crecen rápidamente, dando como resultado la formación de biopelículas. En consecuencia, la acumulación de microorganismos sobre las superficies del filtro deteriora las calidades del agua purificada y/o el aire filtrado; adicionalmente, tienen también efectos desfavorables sobre el flujo de agua y/o aire.

Además, los filtros contaminados con biopelículas son difíciles de limpiar. Normalmente, se requiere alta presión durante la operación. Esto a su vez aumenta el coste. En los métodos de los que se ha informado se incorporan agentes antimicrobianos (tales como *N*-halamina e iones/nanopartículas de plata) directamente sobre las soluciones de hilatura, de esta manera las moléculas/partículas de agentes antimicrobianos se distribuyen por todas las nanofibras (Xinbo Sun, Lifeng Zhang, Zhengbing Cao, Ying Deng, Li Liu, Hao Fong, and Yuyu Sun. "Electrospun Composite Nanofiber Fabrics Containing Uniformly Dispersed Antimicrobial Agents as an Innovative Type of Polymeric Materials with Superior Anti-Infective Efficacy". ACS Applied Materials and Interfaces, 2(4), 952-956, 2010).

Sin embargo, esto a menudo conduce a problemas en el proceso, fundamentalmente debido al alto contenido de agentes microbianos que puede afectar seriamente al proceso de electrohilado y/o deteriorar las propiedades de las nanofibras resultantes. Una solución potenciada a estos problemas es introducir funcionalidad antimicrobiona sobre las superficies de las nanofibras después de que se produzcan las nanofibras (Lifeng Zhang, Jie Luo, Todd J. Menkhaus, Hemanthram Varadaraju, Yuyu Sun, and Hao Fong. "Antimicrobial Nano-fibrous Membranes Developed from Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers". Journal of Membrane Science, 369, 499-505, 2011).

Se sabe que los grupos nitrilo (-C=N) en PAN pueden convertirse químicamente en grupos amidoxima ($-C(NH_2)=NOH$). Los grupos amidoxima pueden coordinarse con un amplio intervalo de iones metálicos incluyendo iones plata, y los iones plata coordinados pueden reducirse a nanopartículas de plata. Tanto los iones de plata como las nanopartículas de plata son agentes microbianos con alta eficacia antimicrobiana.

e. Otros ejemplos

Una alternativa prometedora a la cromatografía de lecho de relleno y otras tecnologías de separación es el uso de los fieltros híbridos de nanofibras de la presente invención como membranas de adsorción selectivas. Este estilo de adsorción utiliza los fieltros de nanofibras como soporte para ligandos que se usan durante los procesos de adsorción selectiva.

La adsorción selectiva implica una funcionalización de superficie "activa" del fieltro híbrido de nanofibras, que permite la captura directa (adsorción) de sustancias diana. Tal modificación se simplifica si los fieltros híbridos de nanofibras incluyen restos químicos sobre sus superficies que sean relativamente sencillos de modificar químicamente para proporcionar sitios de adsorción.

A diferencia de la modificación de las superficies de nanofibras para intercambio de iones y funcionalidad con interacción hidrófoba, la incorporación de ligandos de afinidad sobre la nanofibra puede ser más que un desafío. A menudo, el proceso requiere modificar en primer lugar la superficie para crear sitios de acoplamiento para inmovilización del ligando, seguido de fijación del ligando al sitio activo. Es importante que tanto la modificación inicial de la superficie como el acoplamiento del ligando será robustos, para que no haya lixiviado durante el

procesamiento.

En algunos casos, grupos carboxilos sencillos de injerto de ácido metacrílico sobre la superficie pueden actuar como el sitio de acoplamiento activo creando un enlace amida covalente entre el grupo carboxilo funcionalizado y el grupo amina expuesto en un ligando de proteína. Análogamente, una fuerte oxidación de la celulosa (si se controla apropiadamente) puede proporcionar grupos aldehído sobre la superficie de la fibra, que pueden formar una fijación covalente a aminas primarias de una proteína (incluyendo proteína A y proteína G); especialmente mediante el aminoácido lisina. En otros casos, la funcionalización de la superficie con un tinte de afinidad general (por ejemplo, azul Cibacron, capaz de unirse a algunas proteínas) puede acoplarse directamente a una nanofibra de celulosa.

De forma más elaborada, los sitios bioactivos para inmovilización de ligando de proteína pueden incorporarse en la estructura básica de la nanofibra durante la construcción del nanofieltro. Un ejemplo de esto es el uso de polietilenglicol (PEG) con poli D,L-lactida (PDLLA) como un copolímero de bloques. El glicol puede acoplarse con biocitina (capaz de interacción de afinidad con proteínas de fusión de estreptavidina) después del electrohilado para crear una nanofibra de afinidad. Análogamente, puede crearse una policaprolactona (PCL) y un poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico)-b-PEG-NH2 (PLGA-b-PEF-NH2) que contiene nanofibras aminadas en superficie para acoplamiento con proteínas que usan un agente de acoplamiento homobifuncional. Finalmente, en algunos casos, es posible usar sitios activos intrínsecos asociados con ciertas matrices de nanofibras. Por ejemplo, ha sido exitoso el acoplamiento de concanavalina A, un marcador de afinidad para lectina asociado con glicol-proteínas y/u otros conjugados de glicol) a una nanofibra basada en quitosano.

Se conocen en la tecnología química otras técnicas para fijar ligandos específicos a compuestos basados en celulosa y/o polímeros sintéticos.

Separaciones basadas en tamaño

Como un mecanismo de purificación ortogonal para la adsorción, las separaciones basadas en tamaño también se usan rutinariamente en bioprocesamiento aguas abajo. La filtración y microfiltración en profundidad son operaciones usadas para el aclarado del caldo de fermentación, donde las células (aproximadamente 1~20 µm) y residuos celulares (0,1~1 µm) se retiran de la suspensión del biorreactor. La nanofiltración con membrana se utiliza para aclaramiento y/o purificación viral de 20~200 nm partículas de virus, y la ultrafiltración se empela comúnmente para la concentración y purificación de proteínas. En todos los casos, son deseables varias características del medio de separación. En primer lugar, se desea un corte de tamaño bien definido para obtener separaciones estrictamente controladas. En segundo lugar, se necesita un material de alta porosidad para un procesamiento de alta capacidad de producción sin requisitos de presión excesivos para minimizar el tiempo de operación y/o los requisitos de área de membrana. Y en tercer lugar, es deseable robustez química y física para condiciones de limpieza duras y operación a presiones moderadas. Los fieltros de nanofibras, debido a que se producen de forma más barata en gran cantidad para fibras fuertes mecánica y químicamente, y con un tamaño de poro bien controlado de unas fibras a otras (o como fibras huecas), ofrecen una tremenda oportunidad como medio de separación basado en tamaño avanzado. Las nanofibras de polímero en general muestran la mínima cantidad de unión no específica, pero sufren de ser menos robustas químicamente que las fibras de carbono y cerámicos. Las fibras cerámicas sufren de ser quebradizas y tener el potencial para grandes cantidades de adsorción no específica de biomasa/biopartículas, con el concomitante ensuciamiento, pero pueden soportar condiciones de regeneración duras.

Hasta la fecha, las mallas de nanofibras para separaciones basadas en tamaño han tenido aplicación principalmente para el aislamiento de biopartículas a escala de nanómetros y micrómetros (o similares) mediante un mecanismo de filtración en profundidad. El área superficial específica elevada de las nanofibras dentro de una malla de filtración proporciona una trayectoria más tortuosa y mayor oportunidad de interceptar una partícula deseada desde la solución mientras se mantiene una alta porosidad. Las nanofibras de polímero, carbón y cerámico se han evaluado todas, y eran todas capaces de separar el tamaño de partícula deseado de una mezcla mientras se mantenían flujos elevados. Específicamente, las nanofibras electrohiladas preparadas a partir de floruro de polivinilideno (PVDF) y nailon 6 serán capaces de retirar partículas de poliestireno entre 0,5~10 µm. Las mallas de nanofibra cerámica se han usado quizás de forma más extensiva. Un ejemplo muestra que una combinación de grandes nanofibras de titanato con nanofibras de bohemita más pequeñas era capaz de flujos muy altos (1000 $l/m^2 \cdot h$) con una fuerza impulsora de presión relativamente baja (20 kPa) y podían retirar virtualmente todas las partículas mayores de 60 nm de una solución. Debe observarse que muchas aplicaciones de micro y nanofiltración en profundidad también dependen de la adsorción química de partículas a la superficie, nanofibras que son fácilmente capaces de y que pueden fabricarse para adsorber específicamente una impureza deseada.

Construcción/configuración del nanofieltro

Utilizando fibras con diámetros en el intervalo de submicrómetros a nanómetros (1~1000 nm, denominados fieltros de "nanofibras"), el área superficial disponible dentro de un volumen de lecho dado para unión potencial aumentará en gran medida en tanto como dos órdenes de magnitud. Controlando el tamaño de poro de los fieltros de nanofibras, puede controlarse también la caída de presión y las características de flujo interior dinámico, y hacerse tan eficientes como los fieltros de microfibras.

Además, los tamaños de poro entre las fibras en el fieltro normalmente tienen una distribución de tamaño de poro ajustada (más del 90 % de las nanofibras están dentro del intervalo de 100 nm a 500 nm) para oponerse a la canalización y retener solo aquellas especies por encima de un tamaño de corte deseado para las operaciones de filtración. Finalmente, los fieltros de nanofibras normalmente son lo suficientemente fuertes mecánicamente para operar en condiciones de caídas de presión potencialmente altas (hasta 0,7 MPa (100 psi)) y altos caudales (valores de flujo por encima de 30 l/(min.m^2)) y lo suficientemente robustos químicamente para soportar los regímenes de limpieza potencialmente duros (que a menudo incluyen ácidos y bases fuertes, y disolventes orgánicos) sin hacerse pedazos.

En una realización, los fieltros de nanofibras consisten en una nanofibra compuesta (un polímero de celulosa derivatizada más un polímero que no es celulosa) y una nanofibra de un único componente (polímero no basado en celulosa). Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, los nanofieltros híbridos pueden formarse a partir de una diversidad de combinaciones de polímeros y nanofibras. Los ejemplos de estos incluyen, por ejemplo:

- Un fieltro de nanofibras compuestas, en donde todas las nanofibras en el fieltro consisten en una única especie de nanofibra compuesta fabricada a partir de una mezcla coextruida de un polímero básico y un primer polímero no celulósico (no de acuerdo con la presente invención).

- Un fieltro de nanofibras que consiste en al menos dos nanofibras de un único componente diferentes (no de acuerdo con la presente invención).

- Un fieltro de nanofibras que consiste en al menos una nanofibra de un único componente y al menos una nanofibra compuesta.

Además de las configuraciones de nanofieltro descritas anteriormente, los nanofieltros de la presente invención pueden incluir también microfibras para añadir estabilidad, resistencia y adaptarse a otras características físicas de los fieltros para su uso en aplicaciones particulares. Cuando se compara con fieltros de nanofibras de un único componente, los fieltros de nanofibras híbridos de la presente invención presentan las siguientes propiedades mejoradas ejemplares:

Tabla 1

Atributo	Indicadores de rendimiento	Medidas cuantitativas
Durabilidad/Estabilidad /Permeancia	Rendimiento robusto y reproducible durante múltiples ciclos (con diferentes agentes de limpieza) y condiciones de operación agresivas (alto flujo y alta presión)	- Capacidad de adsorción frente al n.º de ciclo (menos del 10 % de pérdida de capacidad después de 50 ciclos) - Cinética de adsorción frente al n.º de ciclo (menos del 10 % de tiempos de adsorción mayores después de 50 ciclos) - Soporta fuerza antes de fallo mecánico (hasta 0,7 MPa (100 psi) de presión con flujo líquido) - Permeancia de flujo líquido (por encima de 500 l/(min.m^2.mm.10^5Pa)
Características de adsorción mejoradas	- Capacidad de adsorción de proteínas elevada, mecanismo de adsorción con equilibrio más favorable y cinética de adsorción de proteína más rápida - Mayor área superficial por introducción de poros dentro de las nanofibras - Mayor selectividad de adsorción	- Modelo de isoterma de adsorción estática (capacidad y favorabilidad) (para proteínas, por encima de 0,2 mg/mg de malla) - Cinética de adsorción (por encima del 90 % de equilibrio conseguido en 3 minutos). - Análisis del área superficial BET (mayor de 20 m^2/g) - Factores de separación cuando se purifican mezclas de (bio)químicos (al menos purificación doble)
Distribución uniforme de los diámetros de fibra y tamaño de poro	Hidrodinámica mejorada y rendimiento de adsorción reproducible	- Imágenes SEM visuales (>90 % de diámetros de fibra está dentro del intervalo de 100 nm a 500 nm) - Análisis de distribución de flujo (condiciones de unión y de no unión) (número de Peclet sobre 100 para un soluto de no unión)

Ejemplos

Ejemplo 1:

Preparación de un fieltro de nanofibras de un único componente de acetato de celulosa de la técnica anterior

Se preparó un fieltro de nanofibras de un único componente de acetato de celulosa como se describe en: Handbook of Membrane Research, Capítulo 3, *Applications of Electrospun Nanofiber Membranes for Bioseparations,* Todd J. Menkhaus, *et al,* Nova Science Publishers, Inc., editado por Stephan V. Gorley. El acetato de celulosa (peso molecular promedio de ~30.000 g/mol), NaOH, NaCl, acetona, N,N-dimetilacetamida (DMAc) y *N,N*-dimetilformamida (DMF) se adquirieron de en Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI). El clorhidrato de cloruro de 2-(dietilaminoetilo) (DAECH) con una pureza del 98 % se adquirió en Alfa Aesar Co. (Ward Hill, MA).

Se preparó una solución del 15 % (fracción en masa) de acetato de celulosa en acetona/DMAC (razón en masa de 2/1) a temperatura ambiente. La solución se añadió a una jeringa. El despliegue de electrohilado incluía un suministro de potencia de alta tensión y un rodillo producido en el laboratorio. Durante el electrohilado, se aplicó una alta tensión positiva de 15 kV a la aguja y el caudal de 1,0 ml/h se mantuvo usando una bomba de jeringa. Las nanofibras de acetato de celulosa se recogieron como un fieltro extendido aleatoriamente sobre una lámina de aluminio conectada eléctricamente a tierra que cubría el rodillo. Se usó una lámpara de calentamiento para secar el fieltro de nanofibras durante el electrohilado y el fieltro se secó adicionalmente en un horno de vacío después del electrohilado. En general, el proceso de electrohilado era relativamente inestable, con interrupciones frecuentes a intervalos de aproximadamente 2 horas. El fieltro de nanofibras de acetato de celulosa recogido tenía un espesor de aproximadamente 225 µm y una masa por área unitaria de aproximadamente 60 g/m^2.

Los fieltros de nanofibras de acetato de celulosa tal cual se electrohilan se hidrolizaron/desacetilaron en primer lugar por inmersión en una solución acuosa de NaOH 0,05 M durante 24 horas. Los productos, denominados fieltros de nanofibras de celulosa regenerada, después se aclararon en agua destilada 3 veces y se secaron en un horno de vacío a 60 ºC. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa DAECH al 15 % (fracción en masa) durante 10 minutos seguido de secado a 60 ºC. Las muestras después se sumergieron en una solución acuosa de NaOH 0,5 M a 90 ºC durante 10 min. Las muestras se aclararon en agua destilada 3 veces y se secaron a 60 ºC para producir fieltros de nanofibras de celulosa de intercambio de aniones DEAE.

Ejemplo 2:

Preparación de un fieltro híbrido de nanofibras compuestas CA/PEO y nanofibras de un único componente de PAN

Acetato de celulosa (CA), óxido de polietileno (PEO), cloroformo ($CHCl_3$), dimetilformamida (DMF), poliacrilonitrilo (PAN) y cloruro de dietil amino etilo se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI).

Las soluciones de hilatura de PAN y CA+PEO se prepararon por separado. Brevemente, para la preparación de la solución de hilatura de PAN el PAN se disolvió en DMF para preparar una solución. Para la solución de hilatura de CA más PEO, se preparó CA más PEO en $CHCl_3$/DMF con cloruro de dietil amino etilo.

Durante el proceso de electrohilado se pusieron dos jeringas cargadas con solución de hilatura de PAN o CA+PEO en el lado opuesto del rodillo producido en el laboratorio. En general, el proceso de electrohilado era muy estable y era sostenible durante largos periodos (>48 horas), y las mallas nanofibrosas híbridas electrohiladas consistían en nanofibras compuestas de CA+PEO y nanofibras de PAN (ya sea autosoporte o soportadas habrá una grasa de algodón de calidad médica) se recogieron sobre la lámina de aluminio conectada eléctricamente a tierra que cubría el rodillo.

Las mallas nanofibrosas híbridas de CA+PEO+PAN tal cual se electrohilaron después se recocieron durante 24 horas para completar la dispersión de fases de CA y PEO. Después de esto, las mallas se hidrolizaron/desacetilaron por inmersión en una solución acuosa de NAOH durante 24 horas. Las mallas de nanofibra híbrida resultantes que consistían en nanofibras de celulosa regenerada y nanofibras de PAN se aclararon con agua destilada y se secaron.

Ejemplo 3:

Preparación de un fieltro híbrido de nanofibras de nanofibras compuestas de CA/PVP y nanofibras de un único componente de PAN

El acetato de celulosa (CA), polivinilpirrolidona (PVP), cloroformo ($CHCl_3$), dimetilformamida (DMF), poliacrilonitrilo (PAN), y cloruro de dietil amino etilo se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI).

Las soluciones de hilatura de PAN y CA+PVP se prepararon por separado. Brevemente, para la preparación de la solución de hilatura de PAN, el PAN se disolvió en DMF para preparar una solución. Para la solución de hilatura de CA+PEO, se preparó CA+PVP en $CHCl_3$/DMF con cloruro de dietil amino etilo.

Durante el proceso de electrohilado se pusieron dos jeringas cargadas con solución de hilatura de PAN o CA+PVP en el lado opuesto del rodillo producido en el laboratorio. En general, el proceso de electrohilado era sostenible durante largos periodos (>48 horas), y las mallas nanofibrosas híbridas electrohiladas que consistían en nanofibras compuestas de CA+PVP y nanofibras de PAN (ya sea de autosoporte o soportadas sobre una gasa de algodón de calidad médica) se recogieron sobre la lámina de aluminio conectada eléctricamente a tierra que cubría el rodillo.

Las mallas nanofibrosas híbridas de CA+PVP+PAN tal cual se electrohilaron se recocieron entonces durante 24 horas para completar la dispersión de fases de CA y PVP. Después de esto, las mallas se hidrolizaron/desacetilaron por inmersión en una solución acuosa de NaOH durante 24 horas; el proceso disolvería también/retiraría la PVP de las mallas. Las mallas nanofibrosas híbridas resultantes consistían en nanofibras de celulosa regenerada y nanofibras de PAN que se aclararon con agua destilada y se secaron.

Ejemplo 4:

Preparación de un fieltro híbrido de nanofibras de nanofibras compuestas de CA/PEO y nanofibras de un componente único de nailon 6

El acetato de celulosa (CA), óxido de polietileno (PEO), cloroformo ($CHCl_3$), hexafloroisopropano (HFIP), nailon 6 y cloruro de dietilaminoetilo se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI).

Las soluciones de hilatura de nailon 6 y CA+PEO se prepararon por separado. Brevemente, para la preparación de la solución de hilatura de nailon 6, el polímero se disolvió en HFIP. Para la solución de hilatura de CA+PEO, se preparó CA+PEO en $CHCl_3$/DMF con cloruro de dietil amino etilo.

Durante el proceso de electrohilado se pusieron dos jeringas cargadas con solución de hilatura de nailon 6 o CA+PEO en el lado opuesto en el rodillo producido en el laboratorio. En general, el proceso de electrohilado era muy estable y sostenible durante largos periodos (>48 horas), y las mallas nanofibrosas híbridas electrohiladas que consistían en nanofibras compuestas de CA+CEO y nanofibras de nailon 6 (ya sea de autosoporte o soportadas en una gasa de algodón de calidad médica) se recogieron sobre la lámina de aluminio conectada eléctricamente a tierra que cubría el rodillo.

Las mallas nanofibrosas híbridas de CA+PEO+nailon 6 tal cual se electrohilaron se recocieron después durante 24 h para completar la dispersión de fases de CA y CEO. Después de esto, las mallas se hidrolizaron para desacetilar por inmersión en una solución acuosa de NaOH durante 24 horas; el proceso también disolvería/retiraría el PEO de las mallas. Las mallas nanofibrosas híbridas resultantes consistían en nanofibras de celulosa regenerada y nanofibras de nailon 6 que se aclararon con agua destilada y se secaron.

Ejemplo 5:

Preparación de un fieltro híbrido de nanofibras de nanofibras compuestas de CA/PVP y nanofibras de un componente único de nailon 6

El acetato de celulosa (CA), polivinilpirrolidona (PVP), cloroformo ($CHCl_3$), hexaflorisopropanol (HFIP), nailon 6 y cloruro de dietil amino etilo se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI).

Las soluciones de hilatura de nailon 6 y CA+PVP se prepararon por separado. Brevemente, para la preparación de la solución de hilatura de nailon 6, el nailon 6 se disolvió en HFIP para preparar una solución. Para la solución de hilatura de CA+PEO, se preparó CA más PVP en $CHCl_3$/DMF con cloruro de dietil amino etilo.

Durante el proceso de electrohilado se cargaron dos jeringas con solución de hilado de nailon 6 o CA+PVP que se pusieron en el lado opuesto del rodillo producido en el laboratorio. En general, el proceso de electrohilado era muy estable y era sostenible durante largos periodos (>48 horas), y las mallas nanofibrosas híbridas electrohiladas que consistían en nanofibras compuestas de CA+PVP y nanofibras de nailon 6 (ya sea de autosoporte o soportadas sobre una gasa de algodón de calidad médica) se recogieron sobre la lámina de aluminio conectada eléctricamente a tierra que cubría el rodillo.

Las mallas nanofibrosas híbridas de CA+PVP+nailon 6 tal cual se electrohilaron después se recocieron durante 24 h para completar la dispersión de fases de CA y PVP. Después de esto, las mallas se hidrolizaron y desacetilaron por inmersión en una solución acuosa de NaOH durante 24 horas; el proceso disolvería/retiraría la PVP de las mallas. Las mallas nanofibrosas híbridas resultantes consistían en nanofibras de celulosa regeneradas y nanofibras de nailon 6 que se aclararon con agua destilada y se secaron.

Ejemplo 6:

Evaluación del rendimiento de fieltros de nanofibras de un único componente e híbridos

La adsorción discontinua, adsorción dinámica, dispersión de flujo y estudios de permeabilidad con las mallas de nanofibra de un componente único (Ejemplo 1) y mallas de nanofibra híbridas (Ejemplos 2-6), se compararon con una membrana de adsorción de celulosa regenerada disponible en el mercado y una bola de algodón. La membrana de celulosa comercial y la bola de algodón experimentaron los mismos tratamientos post-electrohilado que el fieltro de nanofibras de un único componente y el fieltro de nanofibras híbrido antes del ensayo.

Se completaron experimentos de adsorción discontinuos para determinar las isotermas de adsorción de equilibrio de Langmuir. Para análisis discontinuos, el fieltro de un único componente, el fieltro híbrido, la celulosa comercial y la bola de algodón se enjuagaron con tampón cortado en piezas individuales de aproximadamente 1 cm^2, y se pesaron para cada medio, diez de las piezas individuales (~100mg) se pusieron en tubos de centrífuga de 15 mililitros (ml). La solución madre de la proteína diana se preparó a 2,0mg/ml mezclando una masa conocida de proteína liofilizada con tampón. Se añadieron combinaciones apropiadas de solución madre y tampón a cada tubo de ensayo que contenía las piezas de fieltro cortadas, la membrana de celulosa comercial o las bolas de algodón para proporcionar un volumen final de 14 ml en cada tubo y una concentración inicial de proteína entre 0,0mg/ml y 2,0mg/ml de proteína. Se tomó una muestra líquida de 1,0 ml de cada una de las diferentes concentraciones de proteína iniciales inmediatamente y se midió la adsorbancia UV a 280 nm. Las muestras después se pusieron en una mezcladora fin-sobre-fin que giraba a aproximadamente 40 revoluciones por minuto (rpm). Después del mezclado durante un mínimo de 24 horas, el líquido de cada muestra se retiró y la concentración de proteína se determinó por adsorbancia UV-280 nm con un espectrofotómetro Genesys 10 UV adquirido en Thermo Electron Corporation (Madison, WI). Por la diferencia, pudo calcularse la proteína adsorbida en el fieltro. Se preparó también un tubo con 2,0 mg de proteína/ml y sin fieltro para evaluar el potencial de adsorción de proteína a la superficie de tubo. No se encontró adsorción a la superficie del tubo. Análogamente, se supervisaron controles para evaluar el potencial de productos químicos lixiviados que pudiera contribuir a la adsorbancia UV a 280 nm, y la unión no específica de proteína a la membrana no derivatizada (después de la regeneración NaOH). No se observó lixiviado o unión no específica para ninguna de las muestras. Después se prepararon las isotermas de adsorción de Langmuir y las constantes de modelado (Q_{max} y K_{dmax}) se determinaron mediante ajusto por regresión de mínimos cuadrados de la ecuación:

$$Q = \frac{Q_{\max} C}{K_d + C}$$

donde Q es la concentración de equilibrio adsorbida de proteína a la membrana (mg/g), Q_{max} es la capacidad de saturación máxima asintótica, C es la concentración de equilibrio de la fase líquida de proteína (mg/ml), K_d es la constante de adsorción (mg/ml). Valores altos de Q y valores bajos de K_d son indicativos de procesos de adsorción altamente eficientes. Después del análisis de adsorción, el líquido se decantó y los fieltros se lavaron con 14 ml de tampón junto con mezclado durante 1 hora. Después de retirar la solución de lavado, se añadió a los tubos el tampón con NaCl 1 M, se mezcló durante 1 hora, y el líquido se muestreó para la concentración de proteína para adsorbancia de UV-280- nm. El porcentaje de elución se calculó basándose en las cantidades de unión encontradas durante la fase de adsorción del estudio.

Los resultados, mostrados en la Tabla 2 a continuación, indicaban que los fieltros híbridos de nanofibras electrohiladas tenían una mayor capacidad, seguido del fieltro de nanofibras de celulosa de un único componente. Ambos materiales de adsorción basados en nanofibras tenían una capacidad de saturación significativamente mayor en todas las concentraciones en fase líquida en equilibrio que cualquiera de los medios de adsorción basados en celulosa comerciales. Los fieltros de microfibras de celulosa regenerada y bolas de algodón tenían la capacidad de unión más baja. El área superficial específica alta combinada con la morfología única del fieltro de nanofibras se atribuyen a la capacidad de unión elevada. En todos los casos, podía conseguirse la dilución cuantitativa de la proteína.

Tabla 2: Resultados de unión estadísticos

Medio de muestra	Qmáx (mg/g)	Kd (mg/ml)
Fieltro de híbrido de nanofibras	168	0,31
Fieltro de nanofibras de un único componente	40,0	0,30
Membrana de celulosa comercial	33,5	0,54
Fieltro de microfibra de celulosa regenerada	14,5	0,31
Bola de algodón	15,5	0,82

Se midieron las permeabilidades del tampón a través de los fieltros híbridos de nanofibra y de un único componente, y las membranas de adsorción de celulosa regenerada disponibles en el mercado. Valores de permeabilidad mayores indican la posibilidad de operar con una capacidad de producción mayor (tiempo de procesamiento más rápido) y/o presión menor; ambos de los cuales proporcionan beneficios significativos a los procesos de fabricación. Se utilizó un soporte de adsorción de membrana a pequeña escala de tipo "moneda" para todos los experimentos. La unidad permite un área de filtración eficaz de aproximadamente 1,5 cm^2 y se sella con una junta tórica para impedir fugas. Inicialmente, la caída de presión del sistema únicamente, con el soporte de membrana en su sitio, pero sin membrana presente, se evalúa a caudales que variaban de 2,0 ml/min a 30,0 ml/min. Después las capas de cada fieltro de nanofibras o membrana comercial se añadieron sucesivamente a la unidad mientras se medía la

caída de presión a diferentes caudales. Se evaluaron una, tres, cinco, siete y nueve capas para cada fieltro/membrana. La caída de presión del sistema se restó de la caída de presión medida con el fieltro/membrana en su sitio para calcular la permeabilidad del fieltro/membrana a cada caudal. Se realizó un mínimo de cinco caudales y lecturas de presión correspondientes con cada número de capas diferente.

Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, la permeabilidad del tampón a través de las filas de fieltros híbridos de nanofibras era significativamente mayor que los fieltros de un único componente, y la permeabilidad del fieltro de nanofibras de un único componente era al menos cinco veces mayor que la de las muestras de celulosa regenerada comercial correspondientes. Asimismo, para comparación, el fabricante presentó un lecho de relleno de 15 cm de Sepharose Fast Flow, que tenía una permeabilidad de aproximadamente 7 l/(min m^2 IO^3 Pa), que era similar a la membrana comercial funcionalizada, pero mucho más lenta que los nanofieltros.

Tabla 3: Permeabilidad (l/(min m^2 10^s Pa))

Número de capas	Fieltro híbrido de nanofibras	Fieltro de nanofibras de un único componente	Membrana de celulosa regenerada comercial
1	1220(±110)	801(±75)	148 (±18)
3	977(±76)	563(±44)	92 (±11)
5	627(±47)	451(±21)	32 (±1)
7	318(±23)	76 (±6)	19 (±1)
9	No determinado	35 (±2)	7 (±1)

El análisis de dispersión del sistema se realizó para los fieltros de nanofibras híbrido y de un único componente y las membranas de adsorción de celulosa regenerada comercial para determinar el grado de mezclado axial con diferentes números de capas en su sitio. Es deseable un menor mezclado axial (mejor dispersión de flujo) para minimizar la canalización y la degradación prematura durante los procesos de adsorción. La misma disposición usada para el análisis de permeabilidad se usó para los ensayos de dispersión del sistema, excepto que el caudal se mantuvo 1,0 ml/min durante todo el proceso.
Después del equilibrado, la pila de fieltros/membranas con tampón, una solución al 1 % (fracción en volumen) de acetona en tampón se añadió al sistema. Al adsorbancia en línea a UV-280- nm se supervisó y se analizó la curva resultante para calcular el número de Peclet (Pe) mediante ajuste por mínimos cuadrados de la ecuación:

$$\frac{C_{salida}}{C_{entrada}} = \frac{1}{2}\left\{1 + erf\left[\frac{(Pe)^{1/2}(V - V_{50})}{2(VV_{50})^{1/2}}\right]\right\}$$

donde C_{salida} es la absorbancia del efluente a 280 nm, $C_{entrada}$ es la absorbancia entrante a 280 nm, V es el volumen de solución de acetona añadido, y V_{50} es el volumen cuando $C_{salida}/C_{entrada}$ = 0,50. Valores mayores de Pe se usaron para indicar la propiedad deseable de ser una aproximación más cercana al flujo pistón (menor mezclado axial y mejor dispersión de flujo).

La Tabla 4 a continuación, resume los resultados para el número de Pe según se determinó para diferentes números de mallas de nanofibra híbrida y de un único componente y capas de fieltro de celulosa regenerada comercial/membrana. Los resultados indican que los fieltros de nanofibras producidos en este estudio tenían una hidrodinámica comparable.

Tabla 4: Resultados de dispersión del sistema

Número de capas	Número de Peclet (Pe) Fieltro híbrido de nanofibras	Fieltro de nanofibras de un único componente	Membrana de celulosa regenerada comercial
1	45,2	25,7	39,8
3	81,7	43,4	62,3
5	96,3	59,8	78,4
7	112,0	74,1	92,7
9	No determinado	88,2	102,2

Se completaron análisis de degradación dinámica para evaluar la eficacia de absorción cuando se trabajaba en condiciones de flujo. Una mayor capacidad a un porcentaje de degradación bajo indicaría un material absorbente más eficaz. Los experimentos de degradación dinámica se completaron usando un soporte de tipo moneda Pall Mustang de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usaron nueve capas de cada uno de los fieltros de nanofibras o las membranas comerciales en los análisis. Todos los experimentos trabajaron con un purificador AKT (GE Healthcare, Piscataway, NJ) con medición en línea de la adsorbancia UV-290- nm, pH y conductividad y se controlaron mediante el software Unicorn versión 5.01. Las fracciones se recogieron automáticamente por el sistema en alícuotas de 0,60 ml (aproximadamente dos volúmenes de lecho). Se usó un mínimo de 10 volúmenes de lecho para el equilibrado. Se usó la elución de etapa a 100 % tampón B (tampón B equilibrado con la adición de NaCl 1,0 M) para cada experimento. Para todos los ensayos de degradación dinámica el caudal se mantuvo a un valor de

1,0 ml/min. Se cargó la solución de proteína preparada a 1,5 mg/ml en tampón hasta que se consiguió un 100 % de degradación. El fieltro después se lavó con tampón durante un mínimo de 10 volúmenes de lecho antes de la desorción. Se recogió todo el eluyente (flujo a través durante la carga, lavado y elución), se pesó para determinar el volumen y se analizó para la concentración de proteína por absorbancia UV-280- nm. Se calculó entonces el balance de masas de proteína basándose en el volumen cargado y todas las fracciones recogidas durante el proceso.

La evaluación práctica final para cualquier sistema de adsorción es el análisis de degradación dinámica, una combinación de la capacidad de unión en equilibrio, la cinética de adsorción y la dispersión del sistema. También es una filtración directa de la capacidad para un modo de flujo a modo de operación de flujo a través donde la molécula unida no necesita efluirse selectivamente de otras impurezas.

La Tabla 5 a continuación muestra la capacidad de unión dinámica de la proteína al 10 % de degradación de los fieltros de nanofibras y las membranas de adsorción de celulosa regenerada comerciales. La capacidad dinámica era sustancialmente mayor para las mallas de nanofibras híbridas comparadas con cualquier otro medio de adsorción evaluado. Además, los resultados de elución indicaban que, dentro de la incertidumbre experimental, la elución de proteína se hubo completado para cada sistema de adsorción y el balance de masas global no mostró pérdidas.

Tabla 5: Resultados de unión dinámica

Medio de muestra	Capacidad de degradación 10 % (mg/g)
Fieltro híbrido de nanofibras	122
Fieltro de nanofibras de un único componente	26,9
Membrana de celulosa comercial	20,9
Fieltro de microfibra de celulosa regenerada	No determinado
Bola de algodón	No determinado

REIVINDICACIONES

1. Un fieltro híbrido de nanofibras electrohiladas que comprende una nanofibra compuesta y una nanofibra de un único componente,

en donde la nanofibra compuesta comprende una mezcla de celulosa derivatizada y un primer polímero no basado en celulosa, y
en donde la nanofibra de un único componente comprende un segundo polímero no basado en celulosa,
en donde el primer y segundo polímeros no basados en celulosa pueden retirarse diferencialmente del fieltro de nanofibras.

2. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la celulosa derivatizada se selecciona del grupo que consiste en: un éster orgánico de celulosa, un éster inorgánico de celulosa y una alquilcelulosa.

3. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 2, en donde (i) la celulosa derivatizada comprende un éster organico de celulosa seleccionado del grupo que consiste en: acetato de celulosa, triacetato de celulosa y propionato de celulosa, o:

en donde (ii) la celulosa derivatizada comprende un éster inorgánico de celulosa seleccionado del grupo que consiste en: nitrato de celulosa y sulfato de celulosa, o:
en donde (iii) la celulosa derivatizada comprende una alquil celulosa seleccionada del grupo que consiste en: hidroxiétil celulosa y carboximetil celulosa.

4. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer polímero no basado en celulosa comprende un polímero sintético.

5. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polímero sintético se selecciona del grupo que consiste en: un polímero de vinilo, un poliéter, un polímero acrílico, u poliéster, un policarbonato y un poliuretano.

6. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer polímero no basado en celulosa comprende un polímero natural.

7. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el polímero natural se selecciona del grupo que consiste en: un polisacárido, una poliamida y una polilactida.

8. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el polímero natural es un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en: almidón y quitina o:

en donde el polímero natural es una poliamida seleccionada del grupo que consiste en: proteína y gelatina.

9. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el segundo polímero no basado en celulosa comprende un polímero sintético.

10. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el polímero sintético se selecciona del grupo que consiste en: polímero de vinilo, poliamida, poliimida y poliéster.

11. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el primer polímero no basado en celulosa es un copolímero.

12. El fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el segundo polímero no basado en celulosa es un copolímero.

13. Un método de electrohilado de preparación del fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas:

a) preparar por separado una solución de hilatura de polímero compuesto y una solución de hilatura de polímero de un único componente;
b) poner las soluciones de hilatura en dos hileras diferentes:
c) aplicar tensión a cada solución de hilatura con un electrodo;
d) electrohilar por separado las nanofibras compuestas y de un único componente de las hileras; y
e) recoger las nanofibras solidificadas como un fieltro de nanofibras tendido aleatoriamente o parcialmente alineado.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende además (i) la etapa de convertir la celulosa derivatizada en celulosa, o:

que comprende además (ii) la etapa de retirar al menos una porción del primer polímero no basado en celulosa de la nanofibra compuesta en el fieltro de nanofibras, o:
que comprende además (iii) la etapa de funcionalización de la superficie de una o más de las nanofibras en el fieltro de nanofibras, preferentemente en donde la funcionalización de la superficie comprende la fijación de un ligando de afinidad.

15. Un método de purificación de biomoléculas a partir de un fluido que comprende las etapas de:

a) preparar un fieltro de nanofibras de acuerdo con la reivindicación 11;
b) hacer fluir el fluido a través del fieltro de nanofibras; y
c) recuperar las biomoléculas del fieltro de nanofibras.

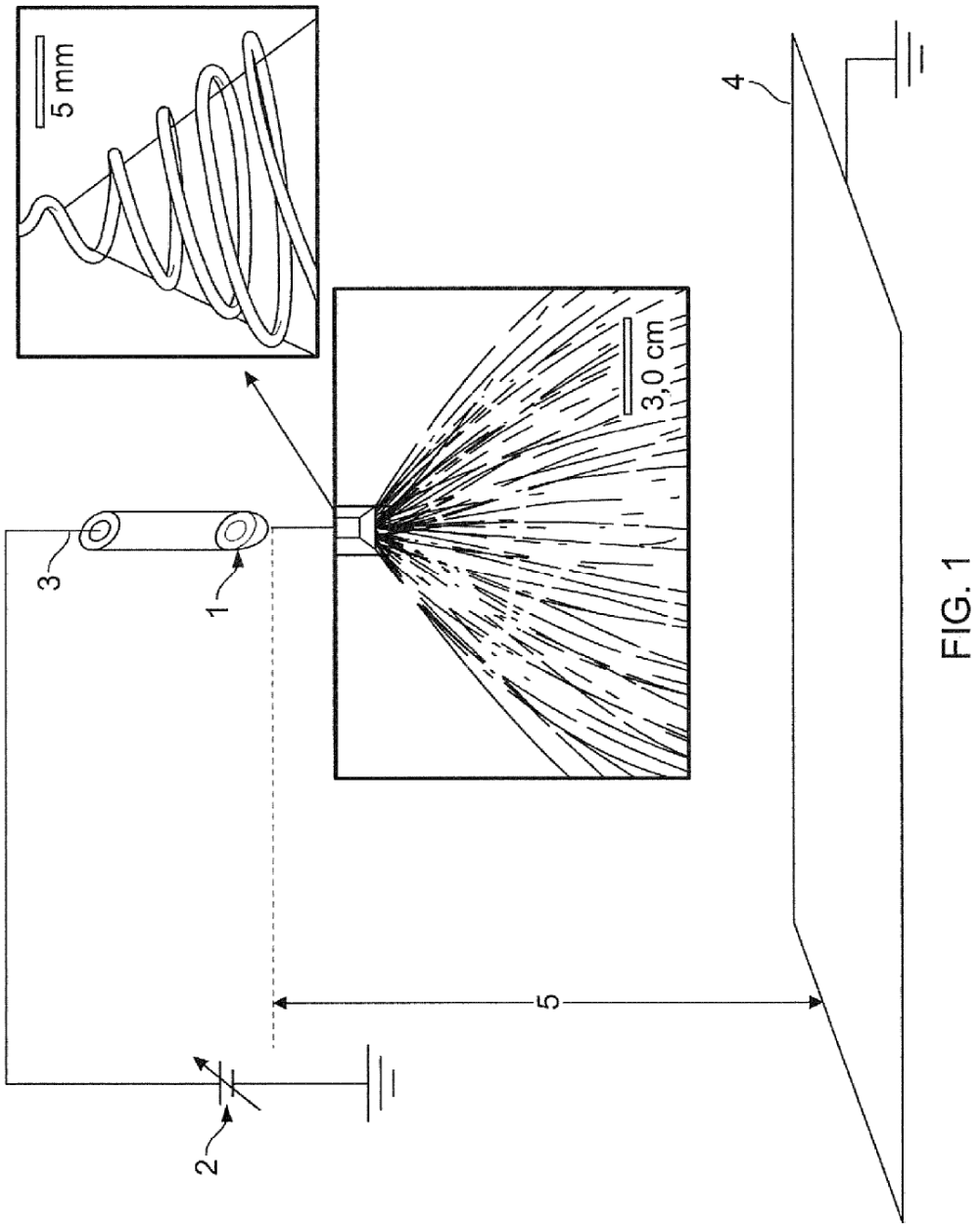

FIG. 1