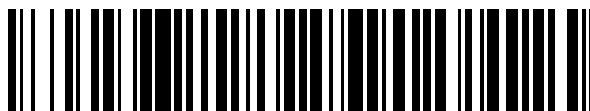


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 211**

51 Int. Cl.:

A61K 47/30 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2013** **PCT/US2013/022057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013** **WO13109825**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2013** **E 13739077 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 2804634**

54 Título: **Medios cromatográficos para el almacenamiento y suministro de productos biológicos terapéuticos y moléculas pequeñas**

30 Prioridad:

19.01.2012 US 201261588312 P

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

25.03.2020

73 Titular/es:

MERCK MILLIPORE LTD. (100.0%)

Tullagreen

County Cork, Carrigtwohill, IE

72 Inventor/es:

CHICKOSKY, JOHN, A.;

HONEYMAN, CHARLES, H.;

MCGLAUGHLIN, MOLLY, S. y

RAGHEB, AMRO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 750 211 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

Medios cromatográficos para el almacenamiento y suministro de productos biológicos terapéuticos y moléculas pequeñas

5 Antecedentes de la invención

10 Muchas biomoléculas, moléculas pequeñas, fármacos y otros agentes terapéuticos son inestables y requieren costosos procedimientos de aislamiento, tal como liofilización, para lograr una vida en anaquel adecuada. La formulación de formas de dosificación medidas previamente de estos agentes también es un desafío. Además, incluso una vez aislado correctamente, el suministro del agente terapéutico a un paciente aún requiere formulación o reconstitución para crear un material biodisponible.

15 Los medios cromatográficos pueden usarse para capturar y purificar moléculas pequeñas, vacunas y especies biológicas, por ejemplo. Muchos tipos de medios cromatográficos pueden usarse en un modo de captura positiva.

El documento US2010178210 describe composiciones y métodos para el almacenamiento de biomoléculas, en donde las biomoléculas se almacenan mediante absorción a un sustrato. Las biomoléculas absorbidas pueden eluirse o recuperarse del sustrato en un momento futuro, y opcionalmente pueden someterse a un análisis o aplicación posterior.

20 El documento US2009029438 describe un material compuesto que comprende un miembro de soporte que tiene una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte y, localizado en los poros del miembro de soporte, y rellenando los poros del miembro de soporte, un gel macroporoso reticulado.

25 Existe la necesidad de un método para estabilizar y almacenar cantidades medidas previamente de estos agentes terapéuticos que optimice la vida en anaquel, la facilidad de transporte y la estabilidad térmica del material. Además, existe la necesidad de coordinar estos dispositivos de almacenamiento con el último sistema de administración, por ejemplo, goteros o jeringas intravenosas.

30 Resumen de la invención

En un primer aspecto, se proporciona un material compuesto seco y estabilizado, que comprende:

35 un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y un gel macroporoso reticulado, que comprende una pluralidad de macroporos; una proteína unida covalentemente al gel macroporoso reticulado, en donde la proteína es proteína A; y un agente estabilizante que comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa; en donde el gel macroporoso reticulado se localiza en los poros del miembro de soporte; y el diámetro promedio de poro de los macroporos es menor que el diámetro promedio de poro de los poros.

40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende además un agente terapéutico.

45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es inestable. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es térmicamente inestable.

50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un anticuerpo, una proteína o un virus. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un anticuerpo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un virus. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un virus vivo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un virus oncolítico.

55 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es IgG.

60 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es 0547659 (Pfizer), agalsidasa beta, alemtuzumab, alglucosidasa alfa, alteplasa, ALXN6000 (Dyax), AMG 386 (Dyax), AMG 479 (Dyax), AMG 780 (Dyax), AMG 888 (Daiichi Sankyo), anrukinzumab, vacuna contra el ántrax, MAb anti-CD19, anticuerpo anti-HB-EGF, factor antihemofílico, anticuerpo anti-HER3, ASG-5ME (Seattle Genetics), ASG-22ME (Seattle Genetics), AV-203 (Aveo), bapineuzumab, BAY 94-9343 (Immunogen), bevacizumab, BI-204 (Dyax), BI-505 (Dyax), BIIB 033 (Dyax), *Bordetella pertussis* (inactivado), bortezomib, brentuximab vedotina, capecitabina, CDX-0011 (Celldex), CDX-014 (Celldex), CDX-301 (Celldex), CDX-1127 (Celldex), CDX-1135 (Celldex), CDX-1402 (Celldex), certolizumab pegol, cetuximab, vacuna contra el cólera (WC-rBS), coriogonadotropina

- 5 alfa, coriogonadotropina alfa (recombinante), cixutumumab, clofarabina, colagenasa de *Clostridium histolyticum*, CT-322 (Bristol-Myers Squibb), DA-3801 (Dong-A), daclizumab, darbepoyetina alfa, denosumab, toxoide diftérico, doripenem, dornasa alfa, ecallantida, eculizumab, enfuvirtida, eplerenona, epoyetina alfa, erlotinib, ertapenem, eritropoyetina (recombinante), etanercept, ficlatuzumab, filgrastim (recombinante), folitropina alfa, anticuerpo monoclonal contra el ántrax completamente humano, G-CSF, golimumab, vacuna conjugada contra *Haemophilus b*, vacuna conjugada contra *Haemophilus b* (conjugada proteica meningocócica), vacuna contra la hepatitis A, antígeno de superficie de la hepatitis B, vacuna contra la hepatitis B (recombinante), oligosacárido Hib (conjugado a CRM₁₉₇), inmunoglobulina humana contra el ántrax, hormona humana estimulante de folículo (recombinante), vacuna contra el virus del papiloma humano (recombinante), ibandronato, IMC-3C5 (Dyax), IMC-11fb (Imclone), IMC-18F1 (Imclone), IMC-303 (Imclone), IMC-305 (Imclone), IMC-2007S (Imclone), IMC-RON8 (Imclone), IMGN529 (Immunogen), imiglucerasa, infliximab, vacuna contra el virus de la influenza, vacuna contra el virus de la influenza (inactivado), vacuna contra el virus de la influenza (tetraivalente, vivo atenuado), inotuzumab ozogamicina, interferón alfa-2a, interferón alfa-2a (recombinante), interferón alfa-2b (recombinante), interferón beta-la, interleucina-21, laronidasa, lorvotuzumab mertansina, lutropina alfa, vacuna contra el virus del sarampión (vivo atenuado), MEDI-3250 (Medimmune), MEDI-551 (Medimmune), MM-121 (Dyax), moxetumomab pasudotox, MT201 (Dyax), micofenolato mofetilo, natalizumab, necitumamab, NRG1 (Bluebird bio), omalizumab, palivizumab, panitumumab, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b, interferón lambda pegilado, PF-0 se alfa (Pfizer), PF-04236921 (Pfizer), plerixafor, vacuna antineumocócica conjugada, vacuna antineumocócica polivalente, vacuna contra el antígeno protector del ántrax (recombinante), ramucirumab, ranibizumab, rituximab, romiplostim, vacuna contra el virus de la rubéola (vivo atenuado, cepa Wistar RA27/3), samalizumab, SAR566658 (Immunogen), SAR650984 (Immunogen), SGN-75 (Seattle Genetics), SGN-CD19A (Seattle Genetics), somatropina, somatropina (ADN recombinante), taliglucerasa alfa, tanezumab, tenecteplasa, toxoide tetánico, trombina, tirotrópina alfa, tigatuzumab, tocilizumab, trastuzumab emtansina, trastuzumab, vacuna contra la fiebre tifoidea (TY21a vivo), U3-1287 (Daiichi Sankyo), U3-1565 (Daiichi Sankyo), ustekinumab o vemurafenib.
- 25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es una molécula pequeña.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es ceftriaxona, clonazepam, diazepam, fludarabina, flumazenil, naproxeno, orlistat, fosfato de oseltamivir, mesilato de saquinavir o valganciclovir.
- 30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se une covalentemente al gel macroporoso reticulado. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se adsorbe o absorbe en el gel macroporoso reticulado. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se adsorbe reversiblemente o se absorbe reversiblemente en el gel macroporoso reticulado.
- 35 La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto está sustancialmente libre de agua.
- La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende un agente estabilizante que comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa.
- 45 La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es polietilenglicol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(etilenglicol). En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es polietilenglicol; y el peso molecular promedio en número (M_n) del polietilenglicol es de aproximadamente 300 a aproximadamente 40 000. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es polietilenglicol; y el peso molecular promedio en número (M_n) del polietilenglicol es de aproximadamente 1000.
- 50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un polietilenglicol monofuncional.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(etilenglicol) metil éter, mesilato de polietilenglicol mono metil éter, metoxipolietilenglicol amina, ácido metoxipolietilenglicol propiónico, O-metil-O'-succinilpolietilenglicol o tetraglicol.
- 60 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un polietilenglicol difuncional. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es O-(2-
- 65

carboxietil)polietilenglicol, O-(2-aminoetil)polietilenglicol, poli(etilenglicol) dimetil éter, diestearato de poli(etilenglicol), poli(etilenglicol) bis(amina), α,ω -bis{2-[(3-carboxi-1-oxopropil)amino]etil}polietilenglicol,, poli(etilenglicol) bis(carboximetil) éter, poli(etilenglicol) butil éter, poli(etilenglicol) tetrahidrofurfuril éter, poli(etilenglicol) bis(carboximetil) éter, hexaoleato de poli(etilenglicol) sorbitol, poli(etilenglicol) diacrilamida, diacrilato de poli(etilenglicol), diacrilato de tetra(etilenglicol), dimetacrilato de di(etilenglicol), poli(etilenglicol) ditiol, tri(etilenglicol) divinil éter o poli(etilenglicol) diglicidil éter.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un polietilenglicol de múltiples brazos. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es etoxilato de glicerol, poli(óxido de etileno) terminado en 4 brazos de amina o poli(óxido de etileno) terminado en 4 brazos de hidroxil.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un copolímero de polietilenglicol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol), poli(etilenglicol)-ran-propilenglicol, poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol) bis(2-aminopropil éter), poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol), poli(etilenglicol)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) metil éter, poli(etilenglicol)-bloque-polilactida metil éter o sal de potasio de poli(etilenglicol) 4-nonilfenil 3-sulfopropil éter.

En la presente descripción se describe un método, que comprende las etapas de:

poner en contacto un agente terapéutico con cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, formando de este modo un material compuesto con un agente terapéutico asociado;
poner en contacto el material compuesto con el agente terapéutico asociado con una primera solución, en donde la primera solución comprende un agente estabilizante, formando de este modo un material compuesto estabilizado; y
secar sustancialmente el material compuesto estabilizado a una temperatura durante un período de tiempo, eliminando de este modo sustancialmente el agua del material compuesto estabilizante.

En la presente descripción se describe un método para suministrar un agente terapéutico a un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de:

poner en contacto cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente con una segunda solución, disociando de este modo el agente terapéutico del material compuesto y formando una tercera solución; y
suministrar la tercera solución al sujeto.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa las capacidades de unión de las membranas en función de los tiempos de remojo en la solución de trehalosa.

La Figura 2 representa las capacidades de unión de las membranas en función de los tiempos de secado.

La Figura 3 representa las capacidades de unión de las membranas en función de la concentración de trehalosa.

La Figura 4 tabula las capacidades de unión de las membranas en función de la concentración de tampón en una solución de trehalosa.

La Figura 5 tabula las capacidades de unión de las membranas en función de varias variables.

La Figura 6 tabula la masa calculada de trehalosa en las membranas secas.

La Figura 7 tabula la capacidad de unión y el flujo en el tiempo de las membranas funcionalizadas con ProA almacenadas a temperatura ambiente (arriba) y a 50 °C (abajo).

La Figura 8 representa imágenes a 400x (izquierda) y 1200x (derecha) de la superficie de una membrana funcionalizada con ProA después de almacenarla a 50 °C durante una semana.

La Figura 9 tabula la capacidad de unión en el tiempo de las membranas funcionalizadas con aldehído secadas a temperatura ambiente y después almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 10 tabula el flujo en el tiempo de las membranas funcionalizadas con aldehído secadas a temperatura ambiente y después almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 11 tabula la capacidad de unión en el tiempo de las membranas funcionalizadas con aldehído secadas a 50 °C durante 1 h, y después almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 12 tabula el flujo en el tiempo de las membranas funcionalizadas con aldehído secadas a 50 °C durante 1 h, y después almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 13 tabula la capacidad de unión en el tiempo de las membranas funcionalizadas con epoxi secadas a temperatura ambiente, y después almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 14 tabula el flujo en el tiempo de membranas funcionalizadas con epoxi secadas a temperatura ambiente, y después almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 15 representa el efecto de la tasa de flujo de la solución eluyente (solución de IgG) en la capacidad de unión al 10 % de penetración (izquierda) y a la saturación (centro). El por ciento de recuperación se muestra a la derecha. En cada caso, la barra izquierda indica una tasa de flujo de 2 ml/min, y la barra derecha indica una tasa de flujo de 1 ml/min.

La Figura 16 representa el efecto del pH de la solución eluyente en la capacidad de unión al 10 % de penetración (izquierda) y a la saturación (derecha). En cada caso, la barra izquierda indica pH 7,4, la barra central indica pH 6,5 y la barra derecha indica pH 8,0.

La Figura 17 tabula la capacidad de unión y el por ciento de recuperación en función de la identidad del tampón en la solución eluyente.

La Figura 18 tabula la capacidad de unión y el por ciento de recuperación en varias etapas de penetración para una solución eluyente de glicina 0,2 M + glucosa 0,2 M y etanol (8:2, v:v).

La Figura 19 tabula la capacidad de unión y el por ciento de recuperación para varias soluciones eluyentes que contienen glicina y NaCl.

La Figura 20 muestra el por ciento de recuperación en función del pH de la solución eluyente (barra izquierda = pH 3,0, barra central = pH 3,5, barra derecha = pH 4,0).

La Figura 21 tabula el efecto en el tamaño de la membrana del almacenamiento de varias membranas a 50 °C.

La Figura 22 tabula el efecto en el tamaño de la membrana del proceso de acoplamiento de ProA.

La Figura 23 muestra una imagen ESEM a 190x de la superficie de una membrana funcionalizada con ProA que se había envuelto alrededor de un cilindro.

La Figura 24 tabula la capacidad de unión en el tiempo de las membranas funcionalizadas con ProA almacenadas a temperatura ambiente o a 50 °C.

La Figura 25 representa la capacidad de unión en el tiempo de las membranas funcionalizadas con ProA almacenadas a (a) temperatura ambiente o (b) 50 °C.

La Figura 26 tabula los resultados de unir IgG a un material compuesto en presencia o ausencia de un agente estabilizante, secar el material compuesto y después eluir la IgG del material compuesto después de 1 día o 16 días de almacenamiento a 2-8 °C. **PEG1000 es polietilenglicol con $M_n = 1000$.

La Figura 27 tabula el porcentaje de IgG activa recuperada después de unir IgG a un material compuesto en presencia o ausencia de un agente estabilizante, secar el material compuesto y después eluir la IgG del material compuesto después de 1 día o 16 días de almacenamiento a 2-8 °C.

La Figura 28 representa una curva de calibración ilustrativa para la concentración de IgG en una solución.

La Figura 29 tabula la cantidad de IgG unida al material compuesto, el % de esa IgG que después se eluyó del material compuesto con un tampón con pH 7,2, y la capacidad de unión del material compuesto.

Descripción detallada de la invención

Información General

Existe la necesidad de medios de almacenamiento y suministro convenientes para fármacos y productos biológicos inestables. Muchas de las limitaciones de los métodos actuales pueden minimizarse mediante el uso de membranas y procesos de membrana. En ciertas modalidades, los procesos de separación de membranas son muy adecuados para aplicaciones a gran escala porque combinan las siguientes características atractivas: bajo consumo de energía, gran capacidad de procesamiento, bajo costo, alta eficiencia, simplicidad, modo de operación continua, fácil adaptación a una serie de configuraciones del proceso relevantes para la producción, escalado conveniente, alto flujo y, en la mayoría de los casos, procesamiento a temperatura ambiente.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un material compuesto que comprende un gel macroporoso dentro de un miembro de soporte poroso. Los materiales compuestos son adecuados para el almacenamiento de solutos inestables, tales como moléculas pequeñas o productos biológicos.

5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de adsorción reversible de una sustancia en un gel macroporoso de un material compuesto.

10 En ciertas modalidades, puede liberarse una sustancia adsorbida permitiendo que el líquido fluya a través del gel macroporoso del material compuesto. En ciertas modalidades, la captación y liberación de sustancias pueden controlarse mediante variaciones en la composición del gel macroporoso reticulado.

Diversas características de los materiales compuestos ilustrativos

15 Composición de los geles macroporosos

En ciertas modalidades, los geles macroporosos pueden formarse a través de la reacción *in situ* de uno o más monómeros polimerizables con uno o más reticuladores. En ciertas modalidades, los geles macroporosos pueden formarse a través de la reacción de uno o más polímeros reticulables con uno o más reticuladores. En ciertas modalidades, puede formarse un gel reticulado que tiene macroporos de un tamaño adecuado.

20 En ciertas modalidades, los monómeros polimerizables adecuados incluyen monómeros que contienen grupos vinilo o acrílico. En ciertas modalidades, un monómero polimerizable se selecciona del grupo que consiste en acrilamida, N-acriloxisuccinimida, acrilato y metacrilato de butilo, N,N-dietilacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, acrilato y metacrilato de 2-(N,N-dimetilamino)etilo, N-[3-(N,N-dimetilamino)propil]metacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, acrilato de n-dodecilo, metacrilato de n-dodecilo, acrilato y metacrilato de fenilo, metacrilato de dodecilo, acrilato y metacrilato de etilo, metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de hidroxipropilo, acrilato y metacrilato de glicidilo, metacrilato de etilenglicol fenil éter, acrilato y metacrilato de n-heptilo, acrilato y metacrilato de 1-hexadecilo, metacrilamida, anhídrido metacrílico, octadecil acrilamida, octilacrilamida, metacrilato de octilo, acrilato y metacrilato de propilo, N-iso-propilacrilamida, acrilato y metacrilato de estearilo, estireno, derivados de estireno alquilados, 4-vinilpiridina, ácido vinilsulfónico y N-vinil-2-pirrolidinona (VP). En ciertas modalidades, los monómeros polimerizables pueden comprender cadenas laterales de butilo, hexilo, fenilo, éter o poli(propilenglicol). En ciertas modalidades, pueden usarse otros monómeros de vinilo o acrílico que comprenden un grupo funcional reactivo; estos monómeros reactivos pueden funcionalizarse posteriormente.

35 En ciertas modalidades, el monómero puede comprender un grupo funcional reactivo. En ciertas modalidades, el grupo funcional reactivo del monómero puede hacerse reaccionar con cualquiera de una variedad de ligandos específicos. En ciertas modalidades, esta técnica permite el control parcial o completo de la densidad del ligando o el tamaño de poro. En ciertas modalidades, el grupo funcional reactivo del monómero puede funcionalizarse antes de la reacción de formación de gel. En ciertas modalidades, el grupo funcional reactivo del monómero puede funcionalizarse después de la reacción de formación de gel. En ciertas modalidades, los monómeros, tales como metacrilato de glicidilo, acrilamidoxima, anhídrido acrílico, anhídrido azelaico, anhídrido maleico, hidrazida, cloruro de acrililo, metacrilato de 2-bromoetilo o vinil metil cetona, pueden funcionalizarse adicionalmente.

45 En ciertas modalidades, el agente de reticulación puede ser un compuesto que contiene al menos dos grupos vinilo o acrílico. En ciertas modalidades, el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en ácido bisacrilamidoacético, 2,2-bis[4-(2-acriloxietoxi)fenil]propano, 2,2-bis(4-metacriloxifenil)propano, diacrilato y dimetacrilato de butanodiol, 1,4-butanodiol divinil éter, diacrilato y dimetacrilato de 1,4-ciclohexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,10-dodecanodiol, 1,4-diacrilolpiperazina, dialilftalato, diacrilato y dipentacrilato de 2,2-dimetilpropanodiol, pentaacrilato de dipentaeritritol, diacrilato y dimetacrilato de dipropilenglicol, N,N-dodecametilenbisacrilamida, divinilbenceno, trimetacrilato de glicerol, glicerol tris(acriloxipropil) éter, N,N'-hexametilenbisacrilamida, N,N'-octametilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de 1,5-pentanodiol, 1,3-fenilendiácrito, diacrilato de dimetacrilato de poli(etilenglicol), diacrilato y dimetacrilato de poli(propileno), diacrilato y dimetacrilato de trietilenglicol, trietilenglicol divinil éter, diacrilato o dimetacrilato de tripropilenglicol, carbonato de dialil diglicol, poli(etilenglicol)divinil éter, N,N'-dimetacrilolpiperazina, divinilglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, N,N'-metilenbisacrilamida, trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolefano, triacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano, trimetacrilato de 1,1,1-trimetilolpropano (TRIM-M), acrilato de vinilo, diacrilato y dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato y dimetacrilato de 1,3-butilenglicol, diacrilato de ciclohexano dimetanol alcohilado, diacrilato de hexanodiol alcohilado, diacrilato de neopentilglicol alcohilado, dimetacrilato aromático, diacrilato de neopentilglicol hidroxipivalato modificado con caprolactona, diacrilato y dimetacrilato de ciclohexano dimetanol, diacrilato y dimetacrilato de bisfenol etoxilado, diacrilato y dimetacrilato de neopentilglicol, triacrilato de trimetilolpropano etoxilado, triacrilato de trimetilolpropano propoxilado, triacrilato de glicerilo propoxilado, triacrilato de pentaeritritol, triacrilato de tris (2-hidroxietil)isocianurato, tetraacrilato de di-trimetilolpropano, pentaacrilato de dipentaeritritol, tetraacrilato de pentaeritritol etoxilato, éster de pentaacrilato, tetraacrilato de pentaeritritol, hexaacrilato de dipentaeritritol modificado con caprolactona, N,N'-metilenbisacrilamida, diacrilato y dimetacrilato de dietilenglicol, triacrilato de trimetilolpropano, diacrilato y dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de tetra(etilenglicol), diacrilato de 1,6-hexanodio, divinilbenceno, y diacrilato de poli(etilenglicol).

En ciertas modalidades, el tamaño de los macroporos en el gel resultante aumenta a medida que aumenta la concentración del agente de reticulación. En ciertas modalidades, el por ciento en moles (% en moles) del agente de reticulación con relación al(a los) monómero(s) puede ser aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 54 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 57 %, aproximadamente 58 %, aproximadamente 59 % o aproximadamente 60 %.

En ciertas modalidades, las propiedades de los materiales compuestos pueden afinarse mediante el ajuste del diámetro promedio de poro del gel macroporoso. El tamaño de los macroporos depende generalmente de la naturaleza y concentración del agente de reticulación, la naturaleza del disolvente o los disolventes en los que se forma el gel, la cantidad de cualquier iniciador o catalizador de la polimerización y, si está presente, la naturaleza y concentración del porógeno. En ciertas modalidades, el material compuesto puede tener una distribución estrecha del tamaño de poro.

Miembro de soporte poroso

En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso está hecho de material polimérico y contiene poros de tamaño promedio entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 25 μm , y una porosidad volumétrica entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 90 %. Pueden usarse muchos sustratos o membranas porosas como miembro de soporte pero el soporte puede ser un material polimérico. En ciertas modalidades, el soporte puede ser una poliolefina, la cual está disponible a bajo costo. En ciertas modalidades, la poliolefina puede ser poli(etileno), poli(propileno) o poli(difluoruro de vinilideno). Se mencionan las membranas de poliolefina extendidas elaboradas mediante separación de fases inducida térmicamente (TIPS) o separación de fases inducida no por disolvente. En ciertas modalidades, el miembro de soporte puede elaborarse de polímeros naturales, tales como celulosa o sus derivados. En ciertas modalidades, los soportes adecuados incluyen membranas de polietersulfona, membranas de poli(tetrafluoroetileno), membranas de nylon, membranas de ésteres de celulosa o papeles de filtro.

En ciertas modalidades, el soporte poroso está compuesto de material fibroso tejido o no tejido, por ejemplo, una poliolefina, tal como polipropileno. Tales miembros de soporte fibrosos tejidos o no tejidos pueden tener tamaños de poro más grandes que los miembros de soporte TIPS, en algunos casos hasta aproximadamente 75 μm . Los poros más grandes en el miembro de soporte permiten la formación de materiales compuestos que tienen macroporos más grandes en el gel macroporoso. También pueden usarse miembros de soporte no poliméricos, tales como soportes a base de cerámica. En ciertas modalidades, el miembro de soporte es fibra de vidrio. El miembro de soporte poroso puede tomar varias formas y tamaños.

En algunas modalidades, el miembro de soporte tiene la forma de una membrana que tiene un espesor de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000 μm , de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 μm , o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 μm . En otras modalidades, pueden combinarse múltiples unidades de soporte poroso, por ejemplo, mediante apilamiento. En una modalidad, puede ensamblarse una pila de membranas de soporte poroso, por ejemplo, de 2 a 10 membranas, antes de que se forme el gel macroporoso dentro del vacío del soporte poroso. En otra modalidad, se usan unidades de miembros de soporte individuales para formar membranas de material compuesto, que después se apilan antes de su uso.

Relación entre el gel macroporoso y el miembro de soporte

El gel macroporoso puede estar anclado dentro del miembro de soporte. El término "anclado" pretende significar que el gel se mantiene dentro de los poros del miembro de soporte, pero el término no se restringe necesariamente a significar que el gel está unido químicamente a los poros del miembro de soporte. El gel puede sostenerse por la restricción física impuesta al enredarlo y entrelazarlo con elementos estructurales del miembro de soporte, sin que se injerte químicamente en el miembro de soporte, aunque en algunas modalidades, el gel macroporoso puede injertarse en la superficie de los poros del miembro de soporte.

Debido a que los macroporos están presentes en el gel que ocupa los poros del miembro de soporte, los macroporos del gel deben ser más pequeños que los poros del miembro de soporte. En consecuencia, las características de flujo y las características de separación del material compuesto dependen de las características del gel macroporoso, pero son en gran medida independientes de las características del miembro de soporte poroso, con la condición de que el tamaño de los poros presentes en el miembro de soporte sea mayor que el tamaño de los macroporos del gel. La porosidad del material compuesto puede adaptarse rellenando el miembro de soporte con un gel cuya porosidad está dictada parcialmente o completamente por la naturaleza y las cantidades de monómero o polímero, agente de reticulación,

disolvente de reacción y cualquier porógeno, si se usa. Como los poros del miembro de soporte se rellenan con el mismo material de gel macroporoso, se logra un alto grado de consistencia en las propiedades del material compuesto, y para un miembro de soporte particular estas propiedades se determinan parcialmente, si no del todo, por las propiedades del gel macroporoso. El resultado neto es que la invención proporciona control sobre el tamaño de los macroporos, la permeabilidad y el área superficial de los materiales compuestos.

El número de macroporos en el material compuesto no está dictado por el número de poros en el material de soporte. El número de macroporos en el material compuesto puede ser mucho mayor que el número de poros en el miembro de soporte porque los macroporos son más pequeños que los poros en el miembro de soporte. Como se mencionó anteriormente, el efecto del tamaño de poro del material de soporte en el tamaño de poro del gel macroporoso es generalmente insignificante. Se encuentra una excepción en los casos donde el miembro de soporte tiene una gran diferencia en el tamaño de poro y la distribución del tamaño de poro, y donde se busca un gel macroporoso que tenga tamaños de poro muy pequeños y un intervalo estrecho en la distribución del tamaño de poro. En estos casos, grandes variaciones en la distribución del tamaño de poro del miembro de soporte se reflejan débilmente en la distribución del tamaño de poro del gel macroporoso. En ciertas modalidades, puede usarse un miembro de soporte con un intervalo de tamaño de poro algo estrecho en estas situaciones.

Preparación de materiales compuestos

En ciertas modalidades, los materiales compuestos de la invención pueden prepararse mediante métodos de un solo paso. En ciertas modalidades, estos métodos pueden usar agua u otros disolventes beneficiosos para el medio ambiente como disolvente de reacción. En ciertas modalidades, los métodos pueden ser rápidos y, por lo tanto, pueden conducir a procesos de fabricación más fáciles. En ciertas modalidades, la preparación de los materiales compuestos puede ser económica.

En ciertas modalidades, los materiales compuestos de la invención pueden prepararse mezclando uno o más monómeros, uno o más agentes de reticulación, uno o más iniciadores, y opcionalmente uno o más porógenos, en uno o más disolventes adecuados. En ciertas modalidades, la mezcla resultante puede ser homogénea. En ciertas modalidades, la mezcla puede ser heterogénea. En ciertas modalidades, la mezcla puede introducirse después en un soporte poroso adecuado, donde puede tener lugar una reacción de formación de gel.

En ciertas modalidades, los disolventes adecuados para la reacción de formación de gel incluyen 1,3-butanodiol, di(propilenglicol) propil éter, N,N-dimetilacetamida, acetato de di(propilenglicol) metil éter (DPMA), agua, dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetona, etanol, N-metilpirrolidona (NMP), tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno, xilenos, hexano, N-metilacetamida, propanol, metanol o mezclas de estos. En ciertas modalidades, pueden usarse disolventes que tienen un punto de ebullición más alto, ya que estos disolventes reducen la inflamabilidad y facilitan la fabricación. En ciertas modalidades, pueden usarse disolventes que tienen una baja toxicidad, por lo que pueden descartarse, reutilizarse o reciclarse fácilmente después del uso. Un ejemplo de tal disolvente es el dipropilenglicol monometil éter (DPM).

En ciertas modalidades, puede añadirse un porógeno a la mezcla de reactivos, en donde los porógenos pueden describirse ampliamente como aditivos de generación de poros. En ciertas modalidades, el porógeno se selecciona del grupo que consiste en disolventes pobres y polímeros extraíbles, por ejemplo, poli(etilenglicol), tensioactivos y sales.

En algunas modalidades, los componentes de la reacción de formación de gel reaccionan espontáneamente a temperatura ambiente para formar el gel macroporoso. En otras modalidades, la reacción de formación de gel debe iniciarse. En ciertas modalidades, la reacción de formación de gel puede iniciarse mediante cualquier método conocido, por ejemplo, mediante activación térmica o radiación UV. En ciertas modalidades, la reacción puede iniciarse mediante radiación UV en presencia de un fotoiniciador. En ciertas modalidades, el fotoiniciador se selecciona del grupo que consiste en 2-hidroxi-1-[4-2(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), benzofenona, benzoína y éteres de benzoína, tales como éter etílico de benzoína y éter metílico de benzoína, dialcoxiacetofenonas, hidroxialquilfenonas y ésteres sulfónicos de α -hidroximetil benzoína. La activación térmica puede requerir la adición de un iniciador térmico. En ciertas modalidades, el iniciador térmico se selecciona del grupo que consiste en 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (catalizador VAZO® 88), azobis(isobutironitrilo) (AIBN), persulfato de potasio, persulfato de amonio y peróxido de benzoilo.

En ciertas modalidades, la reacción de formación de gel puede iniciarse por radiación UV. En ciertas modalidades, puede añadirse un fotoiniciador a los reactivos de la reacción de formación de gel, y el miembro de soporte que contiene la mezcla de monómero, agente de reticulación y fotoiniciador pueden exponerse a radiación UV a longitudes de onda de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 400 nm por un período de unos pocos segundos a unas pocas horas. En ciertas modalidades, el miembro de soporte que contiene la mezcla de monómero, agente de reticulación y fotoiniciador pueden exponerse a radiación UV a aproximadamente 350 nm durante un período de unos pocos segundos a unas pocas horas. En ciertas modalidades, el miembro de soporte que contiene la mezcla de monómero, agente de reticulación y fotoiniciador pueden exponerse a radiación UV a aproximadamente 350 nm durante aproximadamente 10 minutos. En ciertas modalidades, puede usarse luz de longitud de onda visible para iniciar la polimerización. En ciertas modalidades,

el miembro de soporte debe tener una baja absorbancia a la longitud de onda usada para que la energía pueda transmitirse a través del miembro de soporte.

En ciertas modalidades, la tasa a la que se lleva a cabo la polimerización puede tener un efecto en el tamaño de los macroporos obtenidos en el gel macroporoso. En ciertas modalidades, cuando la concentración de reticulador en un gel se aumenta a una concentración suficiente, los constituyentes del gel comienzan a agregarse para producir regiones de alta densidad de polímero y regiones con poco o ningún polímero, a estas últimas regiones se les conoce como "macroporos" en la presente descripción. Este mecanismo se ve afectado por la tasa de polimerización. En ciertas modalidades, la polimerización puede llevarse a cabo lentamente, tal como cuando se usa una baja intensidad de luz en la fotopolimerización. En este caso, tarda más en tener lugar la agregación de los componentes del gel, lo que conduce a poros más grandes en el gel. En ciertas modalidades, la polimerización puede llevarse a cabo a una tasa alta, tal como cuando se usa una fuente de luz de alta intensidad. En este caso, puede haber menos tiempo disponible para la agregación y se producen poros más pequeños.

En ciertas modalidades, una vez que se preparan los materiales compuestos estos pueden lavarse con varios disolventes para eliminar cualquiera de los componentes sin reaccionar y cualquier polímero u oligómero que no esté anclado dentro del soporte. En ciertas modalidades, los disolventes adecuados para lavar el material compuesto incluyen agua, acetona, metanol, etanol, N,N-dimetilacetamida, piridina y DMF.

Determinación del tamaño de poro

SEM y ESEM

El diámetro promedio de los macroporos en el gel reticulado macroporoso puede estimarse mediante uno de muchos métodos. Un método que puede emplearse es la microscopía electrónica de barrido (SEM). El SEM es un método bien establecido para determinar el tamaño de los poros y las porosidades en general, y para caracterizar las membranas en particular. Se hace referencia al libro *Basic Principles of Membrane Technology* por Marcel Mulder (© 1996) ("Mulder"), especialmente el Capítulo IV. Mulder proporciona una descripción general de los métodos para caracterizar las membranas. Para las membranas porosas, el primer método mencionado es la microscopía electrónica. SEM es una técnica muy simple y útil para caracterizar membranas de microfiltración. Puede obtenerse una imagen clara y concisa de la membrana en términos de la capa superior, la sección transversal y la capa inferior. Además, la porosidad y la distribución del tamaño de poro puede estimarse a partir de las fotografías.

La SEM ambiental (ESEM) es una técnica que permite la obtención de imágenes no destructivas de muestras que están húmedas, al permitir un ambiente gaseoso en la cámara de muestras. El detector secundario ambiental (ESD) requiere un fondo de gas para que funcione y opera de aproximadamente 3 torr a aproximadamente 20 torr. Estas restricciones de presión limitan la capacidad de variar la humedad en la cámara de muestras. Por ejemplo, a 10 torr, la humedad relativa a una temperatura específica es la siguiente:

Humedad relativa a 10 torr (%)	T (°C)
Aproximadamente 80	Aproximadamente 16
Aproximadamente 70	Aproximadamente 18
Aproximadamente 60	Aproximadamente 20
Aproximadamente 40	Aproximadamente 24
Aproximadamente 20	Aproximadamente 40
Aproximadamente 10	Aproximadamente 50
Aproximadamente 2	Aproximadamente 70
Aproximadamente 1	Aproximadamente 100

Esta es una guía útil para la humedad relativa en la cámara de muestras a diferentes temperaturas. En ciertas modalidades, la humedad relativa en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 %. En ciertas modalidades, la humedad relativa en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 %. En ciertas modalidades, la humedad relativa en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es aproximadamente del 45 %.

En ciertas modalidades, el microscopio tiene una resolución nanométrica y un aumento de hasta aproximadamente 100 000X.

5 En ciertas modalidades, la temperatura en la cámara de muestra durante la formación de imágenes es de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 95 °C. En ciertas modalidades, la temperatura en la cámara de muestra durante la formación de imágenes es de aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 9 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 12 °C, aproximadamente 14 °C, aproximadamente 16 °C, aproximadamente 18 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C o aproximadamente 85 °C. En ciertas modalidades, la temperatura en la cámara de muestra durante la formación de imágenes es de aproximadamente 5 °C.

15 En ciertas modalidades, la presión en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 0,5 torr a aproximadamente 20 torr. En ciertas modalidades, la presión en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 4 torr, aproximadamente 6 torr, aproximadamente 8 torr, aproximadamente 10 torr, aproximadamente 12 torr, aproximadamente 14 torr, aproximadamente 16 torr, aproximadamente 18 torr o aproximadamente 20 torr. En ciertas modalidades, la presión en la cámara de muestras durante la formación de imágenes es de aproximadamente 3 torr.

25 En ciertas modalidades, la distancia de trabajo desde la fuente del haz de electrones hasta la muestra es de aproximadamente 6 mm a aproximadamente 15 mm. En ciertas modalidades, la distancia de trabajo desde la fuente del haz de electrones hasta la muestra es de aproximadamente 6 mm, aproximadamente 7 mm, aproximadamente 8 mm, aproximadamente 9 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 11 mm, aproximadamente 12 mm, aproximadamente 13 mm, aproximadamente 14 mm o aproximadamente 15 mm. En ciertas modalidades, la distancia de trabajo desde la fuente del haz de electrones hasta la muestra es de aproximadamente 10 mm.

30 En ciertas modalidades, el voltaje es de aproximadamente 1 kV a aproximadamente 30 kV. En ciertas modalidades, el voltaje es de aproximadamente 2 kV, aproximadamente 4 kV, aproximadamente 6 kV, aproximadamente 8 kV, aproximadamente 10 kV, aproximadamente 12 kV, aproximadamente 14 kV, aproximadamente 16 kV, aproximadamente 18 kV, aproximadamente 20 kV, aproximadamente 22 kV, aproximadamente 24 kV, aproximadamente 26 kV, aproximadamente 28 kV o aproximadamente 30 kV. En ciertas modalidades, el voltaje es de aproximadamente 20 kV.

35 En ciertas modalidades, el diámetro promedio de poro puede medirse estimando los diámetros de poro en una muestra representativa de imágenes desde la parte superior o inferior de un material compuesto. Un experto en la técnica reconocerá y conocerá diversas variables experimentales asociadas con la obtención de una imagen ESEM de una membrana húmeda, y podrá diseñar un experimento en consecuencia.

40 Porometría de flujo capilar

La porometría de flujo capilar es una técnica analítica usada para medir el(los) tamaño(s) de poro de los materiales porosos. En esta técnica analítica, se usa un líquido humectante para rellenar los poros de una muestra de prueba y se usa la presión de un gas que no reacciona para desplazar el líquido de los poros. La presión de gas y la tasa de flujo a través de la muestra se miden con precisión y los diámetros del poro se determinan mediante el uso de la siguiente ecuación: La presión de gas requerida para eliminar el líquido de los poros se relaciona con el tamaño del poro mediante la siguiente ecuación:

$$D = 4 \times \gamma \times \cos\theta / P$$

50 D = diámetro de poro
 γ = tensión superficial del líquido
 θ = ángulo de contacto del líquido
P = presión de gas diferencial

55 Esta ecuación muestra que la presión requerida para desplazar el líquido de la muestra húmeda se relaciona inversamente con el tamaño de poro. Dado que esta técnica implica el flujo de un líquido desde los poros de la muestra de prueba bajo presión, es útil para la caracterización de "poros pasantes" (poros interconectados que permiten el flujo del fluido desde un lado de la muestra al otro). Otros tipos de poros (poros cerrados y ciegos) no son detectables mediante este método.

60 La porometría de flujo capilar detecta la presencia de un poro cuando el gas comienza a fluir a través de ese poro. Esto ocurre solo cuando la presión del gas es lo suficientemente alta como para desplazar el líquido desde la parte más estrecha del poro. Por lo tanto, el diámetro de poro calculado mediante el uso de este método es el diámetro del poro en la parte más estrecha y cada poro se detecta como un poro individual de este diámetro estrecho. El diámetro de poro más grande (llamado punto de burbuja) está determinado por la presión de gas más baja necesaria para iniciar el flujo a través de una muestra húmeda y se calcula un diámetro medio de poro a partir de la presión media de flujo. Además, tanto el

intervalo de diámetro de poro estrecho como la distribución del tamaño de poro pueden determinarse mediante el uso de esta técnica.

5 Este método puede realizarse en pequeñas muestras de membrana (~por ejemplo, aproximadamente 2,5 cm de diámetro) que se sumergen en un fluido de prueba (por ejemplo, agua, tampón, alcohol). El intervalo de presión de gas aplicado puede seleccionarse de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 psi.

Otros métodos para determinar el diámetro de poro

10 Mulder describe otros métodos para caracterizar el tamaño promedio de poro de una membrana porosa, incluidos microscopía de fuerza atómica (AFM) (página 164), cálculos de permeabilidad (página 169), adsorción-desorción de gas (página 173), termoporometría (página 176), permoporometría (página 179) y desplazamiento de líquidos (página 181).

Materiales compuestos ilustrativos

15 En ciertas modalidades, los materiales compuestos se han descrito previamente, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 7,316,919, y las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos núms. 2008/0314831, 2008/0312416, 2009/0029438, 2009/0032463, 2009/0008328, 2009/0035552, 2010/0047551, 2010/0044316, 2008/0017578 y 2011/0253616.

20 La invención se refiere a un material compuesto seco y estabilizado, que comprende:

un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y
un gel macroporoso reticulado, que comprende una pluralidad de macroporos;
25 una proteína unida covalentemente al gel macroporoso reticulado, en donde la proteína es proteína A; y
un agente estabilizante que comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa;
en donde el gel macroporoso reticulado se localiza en los poros del miembro de soporte; y el diámetro promedio de poro de los macroporos es menor que el diámetro promedio de poro de los poros.

30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende además un agente terapéutico.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es inestable. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es térmicamente inestable.

35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un anticuerpo, una proteína o un virus. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un anticuerpo.
40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un virus. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un virus vivo. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es un virus oncolítico.

45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es IgG.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es 0547659 (Pfizer), agalsidasa beta, alemtuzumab, alglucosidasa alfa, alteplasa, ALXN6000 (Dyax), AMG 386 (Dyax), AMG 479 (Dyax), AMG 780 (Dyax), AMG 888 (Daiichi Sankyo), anrukinzumab, vacuna contra el ántrax, MAb anti-CD19, anticuerpo anti-HB-EGF, factor antihemofílico, anticuerpo anti-HER3, ASG-5ME (Seattle Genetics), ASG-22ME (Seattle Genetics), AV-203 (Aveo), bapineuzumab, BAY 94-9343 (Immunogen), bevacizumab, BI-204 (Dyax), BI-505 (Dyax), B1B 033 (Dyax), *Bordetella pertussis* (inactivado), bortezomib, brentuximab vedotina, capecitabina, CDX-0011 (Celldex), CDX-014 (Celldex), CDX-301 (Celldex), CDX-1127 (Celldex), CDX-1135 (Celldex), CDX-1402 (Celldex), certolizumab pegol, cetuximab, vacuna contra el cólera (WC-rBS), coriogonadotropina alfa, coriogonadotropina alfa (recombinante), cixutumumab, clofarabina, colagenasa de *Clostridium histolyticum*, CT-322 (Bristol-Myers Squibb), DA-3801 (Dong-A), daclizumab, darbepoyetina alfa, denosumab, toxoide diftérico, doripenem, dornasa alfa, ecallantida, eculizumab, enfuvirtida, eplerenona, epoyetina alfa, erlotinib, ertapenem, eritropoyetina (recombinante), etanercept, ficlatuzumab, filgrastim (recombinante), folitropina alfa, anticuerpo monoclonal contra el ántrax completamente humano, G-CSF, golimumab, vacuna conjugada contra *Haemophilus b*, vacuna conjugada contra *Haemophilus b* (conjugada proteica meningocócica), vacuna contra la hepatitis A, antígeno de superficie de la hepatitis B, vacuna contra la hepatitis B (recombinante), oligosacárido Hib (conjugado a CRM₁₉₇), inmunoglobulina humana contra el ántrax, hormona humana estimulante de folículo (recombinante), vacuna contra el virus del papiloma humano (recombinante), ibandronato, IMC-3C5 (Dyax), IMC-111f (Imclone), IMC-18F1 (Imclone), IMC-303 (Imclone), IMC-305 (Imclone), IMC-2007S (Imclone), IMC-RON8 (Imclone), IMGN529 (Immunogen), imiglucerasa, infliximab, vacuna contra

- el virus de la influenza, vacuna contra el virus de la influenza (inactivado), vacuna contra el virus de la influenza (tetraivalente, vivo atenuado), inotuzumab ozogamicina, interferón alfa-2a, interferón alfa-2a (recombinante), interferón alfa-2b (recombinante), interferón beta-la, interleucina-21, laronidasa, lorvotuzumab mertansina, lutropina alfa, vacuna contra el virus del sarampión (vivo atenuado), MEDI-3250 (Medimmune), MEDI-551 (Medimmune), MM-121 (Dyax), moxetumomab pasudotox, MT201 (Dyax), micofenolato mofetilo, natalizumab, necitumamab, NEGF (Blueblood), omalizumab, palivizumab, panitumumab, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b, interferón lambda pegilado, PF-0 se alfa (Pfizer), PF-04236921 (Pfizer), plerixafor, vacuna antineumocócica conjugada, vacuna antineumocócica polivalente, vacuna contra el antígeno protector del ántrax (recombinante), ramucirumab, ranibizumab, rituximab, romiplostim, vacuna contra el virus de la rubéola (vivo atenuado, cepa Wistar RA27/3), samalizumab, SAR566658 (Immunogen), SAR650984 (Immunogen), SGN-75 (Seattle Genetics), SGN-CD19A (Seattle Genetics), somatropina, somatropina (ADN recombinante), taliglucerasa alfa, tanezumab, tenecteplasa, toxoide tetánico, trombina, tiotropina alfa, tigatuzumab, tocilizumab, trastuzumab, trastuzumab emtansina, vacuna contra la fiebre tifoidea (TY21a vivo), U3-1287 (Daiikio Sankyo), U3-1565 (Daiikio Sankyo), ustekinumab o vemurafenib.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es una molécula pequeña.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico es ceftriaxona, clonazepam, diazepam, fludarabina, flumazenil, naproxeno, orlistat, fosfato de oseltamivir, mesilato de saquinavir o valganciclovir.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se une covalentemente al gel macroporoso reticulado. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se adsorbe o absorbe en el gel macroporoso reticulado. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se adsorbe reversiblemente o se absorbe reversiblemente en el gel macroporoso reticulado.
- La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto está sustancialmente libre de agua.
- La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende un agente estabilizante que comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa.
- La invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es polietilenglicol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(etilenglicol). En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es polietilenglicol; y el peso molecular promedio en número (M_n) del polietilenglicol es de aproximadamente 300 a aproximadamente 40 000. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es polietilenglicol; y el peso molecular promedio en número (M_n) del polietilenglicol es de aproximadamente 1000.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un polietilenglicol monofuncional.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(etilenglicol) metil éter, mesilato de polietilenglicol mono metil éter, metoxipolietilenglicol amina, ácido metoxipolietilenglicol propiónico, O-metil-O'-succinilpolietilenglicol o tetraglicol.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un polietilenglicol difuncional. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es O-(2-carboxietil)polietilenglicol, O-(2-aminoetil)polietilenglicol, poli(etilenglicol) dimetil éter, diestearato de poli(etilenglicol), poli(etilenglicol) bis(amina), α,ω -bis{2-[(3-carboxi-1-oxopropil)amino]etil}polietilenglicol,, poli(etilenglicol) bis(carboximetil) éter, poli(etilenglicol) butil éter, poli(etilenglicol) tetrahidrofurfuril éter, poli(etilenglicol) bis(carboximetil) éter, hexaoleato de poli(etilenglicol) sorbitol, poli(etilenglicol) diacrilamida, diacrilato de poli(etilenglicol), diacrilato de tetra(etilenglicol), dimetacrilato de di(etilenglicol), poli(etilenglicol) ditiol, tri(etilenglicol) divinil éter o poli(etilenglicol) diglicidil éter.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un polietilenglicol de múltiples brazos. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es etoxilato de glicerol, poli(óxido de etileno) terminado en 4 brazos de amina o poli(óxido de etileno) terminado en 4 brazos de hidroxil.

- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es un copolímero de polietilenglicol. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol), poli(etilenglicol)-ran-propilenglicol, poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol) bis(2-aminopropil éter), poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol), poli(etilenglicol)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) metil éter, poli(etilenglicol)-bloque-polilactida metil éter o sal de potasio de poli(etilenglicol) 4-nonilfenil 3-sulfopropil éter.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el agente estabilizante es poli(succinato de etileno), poli(adipato de etileno) o poli(acetato de etileno-co-vinilo).
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende además una sal.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la sal es una sal de fosfato. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la sal es acetato de amonio, formiato de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, tartrato de amonio, acetato de potasio, citrato de potasio, formiato de potasio, fosfato de potasio, acetato de sodio, formiato de sodio, fosfato de sodio o tartrato de sodio.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es sustancialmente estable a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C o aproximadamente 60 °C.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es sustancialmente estable durante aproximadamente 7 d, aproximadamente 14 d, aproximadamente 21 d, aproximadamente 28 d, aproximadamente 35 d, aproximadamente 42 d, aproximadamente 49 d, aproximadamente 75 d, aproximadamente 100 d, aproximadamente 125 d, aproximadamente 150 d, aproximadamente 175 d, aproximadamente 200 d, aproximadamente 225 d, aproximadamente 250 d, aproximadamente 275 d, aproximadamente 300 d, aproximadamente 325 d, aproximadamente 400 d, aproximadamente 425 d, aproximadamente 450 d, aproximadamente 475 d, aproximadamente 500 d, aproximadamente 525 d, aproximadamente 550 d, aproximadamente 575 d, aproximadamente 600 d, aproximadamente 625 d, aproximadamente 650 d, aproximadamente 675 d, aproximadamente 700 d, aproximadamente 725 d, aproximadamente 750 d, aproximadamente 775 d, o aproximadamente 800 d.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es sustancialmente estable a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 7 d, aproximadamente 14 d, aproximadamente 21 d, aproximadamente 28 d, aproximadamente 35 d, aproximadamente 42 d, aproximadamente 49 d, aproximadamente 75 d, aproximadamente 100 d, aproximadamente 125 d, aproximadamente 150 d, aproximadamente 175 d, aproximadamente 200 d, aproximadamente 225 d, aproximadamente 250 d, aproximadamente 275 d, aproximadamente 300 d, aproximadamente 325 d, aproximadamente 400 d, aproximadamente 425 d, aproximadamente 450 d, aproximadamente 475 d, aproximadamente 500 d, aproximadamente 525 d, aproximadamente 550 d, aproximadamente 575 d, aproximadamente 600 d, aproximadamente 625 d, aproximadamente 650 d, aproximadamente 675 d, aproximadamente 700 d, aproximadamente 725 d, aproximadamente 750 d, aproximadamente 775 d o aproximadamente 800 d.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde "sustancialmente estable" se refiere a una pérdida de capacidad de unión de menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 35 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 25 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 % o menos de aproximadamente 10 % de la capacidad de unión al inicio (día cero).
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la relación de masa del agente estabilizante con respecto al agente terapéutico es de aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2 o aproximadamente 1:4.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la cantidad de agente terapéutico en el material compuesto representa una cantidad conocida.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado macroporoso comprende un polímero derivado de acrilamida, N-acriloxisuccinimida, acrilato o metacrilato de butilo, N,N-dietilacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, acrilato o metacrilato de 2-(N,N-dimetilamino)etilo, acrilato o metacrilato de 2-(N,N-dietilamino)etilo N-[3-(N,N-dimetilamino)propil]metacrilamida, N,N-dimetilacrilamida,

- acrilato de n-dodecilo, metacrilato de n-dodecilo, acrilato o metacrilato de fenilo, dodecil metacrilamida, acrilato o metacrilato de etilo, acrilato o metacrilato de 2-etilhexilo, acrilato o metacrilato de hidroxipropilo, acrilato o metacrilato de glicidilo, metacrilato de etilenglicol fenil éter, acrilato o metacrilato de n-heptilo, acrilato o metacrilato de 1-hexadecilo, metacrilamida, anhídrido metacrílico, octadecil acrilamida, octilacrilamida, acrilato o metacrilato de octilo, acrilato o metacrilato de propilo, N-iso-propilacrilamida, acrilato o metacrilato de estearilo, estireno, derivados de estireno alquilados, 4-vinilpiridina, ácido vinilsulfónico, N-vinil-2-pirrolidinona (VP), ácido acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido algínico, haluro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, haluro de dialildimetilamonio, haluro de 4-vinil-N-metilpiridinio, haluro de vinilbencil-N-trimetilamonio, haluro de metacriloxietiltrimetilamonio o acrilato o metacrilato de 2-(2-metoxi)etilo. En ciertas modalidades, el haluro es cloruro, bromuro o yoduro.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado macroporoso comprende un polímero derivado de acrilamida, acrilato o metacrilato de butilo, acrilato o metacrilato de etilo, metacrilato de 2-etilhexilo, acrilato o metacrilato de hidroxipropilo, acrilato o metacrilato de hidroxietilo, acrilato o metacrilato de hidroximetilo, acrilato o metacrilato de glicidilo, acrilato o metacrilato de propilo o N-vinil-2-pirrolidinona (VP).
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado macroporoso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 30 % a aproximadamente 80 %; y los macroporos tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 3000 nm.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado macroporoso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 %. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado macroporoso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 % o aproximadamente 70 %.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 1000 nm.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 200 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 450 nm o aproximadamente 500 nm.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 300 nm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es de aproximadamente 75 nm a aproximadamente 150 nm.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es una membrana.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un volumen vacío; y el volumen vacío del miembro de soporte se rellena sustancialmente con el gel reticulado macroporoso.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende un polímero; el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 5000 µm; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 25 µm; y el miembro de soporte tiene una porosidad de volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 500 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 30 µm a aproximadamente 300 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 30 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 100 µm, aproximadamente 150 µm, aproximadamente 200 µm, aproximadamente 250 µm o aproximadamente 300 µm. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde pueden apilarse una pluralidad de miembros de soporte de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 500 µm de espesor para formar un miembro de soporte de hasta aproximadamente 5000 µm de espesor.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 25 μm . En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 15 μm . En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,5 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 2 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 6 μm , aproximadamente 7 μm , aproximadamente 8 μm , aproximadamente 9 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 11 μm , aproximadamente 12 μm , aproximadamente 13 μm , aproximadamente 14 μm o aproximadamente 15 μm .

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 %.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende una poliolefina.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en polisulfonas, polietersulfonas, polifenilenoóxidos, policarbonatos, poliésteres, celulosa y derivados de celulosa.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende una fibra de vidrio no tejida.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende una tela fibrosa tejida o no tejida que comprende un polímero; el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 2000 μm ; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 25 μm ; y el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte comprende un material no tejido que comprende fibra de vidrio; el miembro de soporte tiene un espesor de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 5000 μm ; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 50 μm ; y el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

Métodos ilustrativos de la descripción

En la presente descripción se describe un método, que comprende las etapas de:

poner en contacto un agente terapéutico con cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, formando de este modo un material compuesto con un agente terapéutico asociado; poner en contacto el material compuesto con el agente terapéutico asociado con una primera solución, en donde la primera solución comprende un agente estabilizante, formando de este modo un material compuesto estabilizado; y secar sustancialmente el material compuesto estabilizado a una temperatura durante un período de tiempo, eliminando de este modo sustancialmente el agua del material compuesto estabilizante.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agente terapéutico se pone en contacto con el material compuesto en presencia de una sal tampón. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón comprende un acetato. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón comprende acetato de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón es acetato de sodio.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de lavar el material compuesto después de que este se haya puesto en contacto con el agente terapéutico. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto se lava con un tampón. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tampón comprende un acetato. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tampón comprende acetato de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el tampón es acetato de sodio.

- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la primera solución comprende además una sal tampón. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón comprende un fosfato o un acetato. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón comprende un acetato. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón comprende acetato de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón es acetato de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal tampón es acetato de sodio a aproximadamente pH 5.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración del agente estabilizante en la primera solución es de aproximadamente 5 % en peso, aproximadamente 10 % en peso, aproximadamente 15 % en peso, aproximadamente 20 % en peso, aproximadamente 30 % en peso, aproximadamente 40 % en peso o aproximadamente 50 % en peso.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sal tampón en la primera solución es de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 230 mM, aproximadamente 240 mM o aproximadamente 250 mM. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sal tampón en la primera solución es de aproximadamente 85 mM.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH de la primera solución es aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH de la primera solución es de aproximadamente 5.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto con el agente terapéutico asociado se remoja en la primera solución.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto con el agente terapéutico asociado se pone en contacto con la primera solución durante aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 min, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, aproximadamente 110 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 130 minutos o aproximadamente 140 minutos.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto estabilizado se seca sustancialmente durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, aproximadamente 110 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 130 minutos o aproximadamente 140 min.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto estabilizado se seca sustancialmente a una temperatura de aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C o aproximadamente 60 °C.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el gel macroporoso muestra una interacción selectiva para el agente terapéutico.
- La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el gel macroporoso muestra una interacción específica para el agente terapéutico.
- En la presente descripción se describe un método para suministrar un agente terapéutico a un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de:
- poner en contacto cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente con una segunda solución, disociando de este modo el agente terapéutico del material compuesto y formando una tercera solución; y suministrar la tercera solución al sujeto.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la segunda solución comprende una sal. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la segunda solución comprende una sal de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la segunda solución comprende cloruro de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sal en la segunda solución es de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 230 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 750 mM, aproximadamente 1 M, aproximadamente 1,25 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 2 M, aproximadamente 2,25 M o aproximadamente 2,5 M La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sal en la segunda solución es de aproximadamente 1 M.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la segunda solución comprende una sal tampón. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la segunda solución comprende un fosfato. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la segunda solución comprende fosfato de sodio. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sal de tampón en la segunda solución es de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 230 mM, aproximadamente 240 mM o aproximadamente 250 mM. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sal tampón en la segunda solución es de aproximadamente 100 mM.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH de la primera solución es de aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8. La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH de la primera solución es de aproximadamente 7,2.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto está configurado en una jeringa.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto está configurado en una línea intravenosa.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto está configurado en un vial.

La descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la tercera solución se suministra al sujeto por vía intravenosa.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención. Sin embargo, se entenderá que los detalles específicos dados en cada ejemplo se han seleccionado con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En general, los experimentos se realizaron en condiciones similares a menos que se señale lo contrario.

Ejemplo 1 - Condiciones de secado de la membrana con proteína A

Los experimentos se realizaron con membranas unidas covalentemente a proteína A como prueba de que las membranas con biomoléculas asociadas pueden secarse adecuadamente y estabilizarse contra la degradación, mientras que mantienen su función después de la rehumectación. Las biomoléculas no necesitan estar unidas covalentemente a la membrana para que el principio sea verdadero.

Para mejorar la estabilidad de la proteína A después de ser inmovilizada en la membrana con aldehído, la proteína debe secarse en presencia de un "agente de secado" que sea capaz de conservar la selectividad y la actividad de la molécula injertada de proteína A. Se consideraron y examinaron tres opciones para secar la membrana con proteína A como se muestra a continuación.

1.1 PEG/Glucosa

Los polietilenglicoles, que se conocen como macromoléculas amigables con las proteínas, se han usado ampliamente para conservar moléculas inmovilizadas en las superficies y dentro de los polímeros. Los azúcares, por otro lado, son bien conocidos por su impacto positivo como agente de secado para proteínas liofilizadas e inmovilizadas. Los primeros trabajos sobre el secado de la membrana con ProA demostraron que una mezcla de PEG (10 % en peso, Mwt promedio 2000 Da) y glucosa (10 % en peso) en tampón fosfato 50 mM mantuvo ~80 % de actividad de la proteína A después del secado durante 2 horas en horno.

Uno de los problemas asociados con el PEG es lograr un lavado completo antes de que se realice el proceso de captura de IgG. Las trazas de PEG pueden interferir con el proceso de unión y minimizar la eficiencia de la unión.

1.2 Glicerol/Trehalosa

Además de su capacidad para conservar la estructura tridimensional de las proteínas, el glicerol es más fácil de eliminar de la membrana en comparación con el PEG. La trehalosa, por otro lado, es un disacárido y se ha usado para estabilizar la estructura de la proteína. El trabajo exploratorio demostró que una membrana con ProA seca con una mezcla de glicerol (50 % en peso) y trehalosa (10 % en peso) era capaz de conservar la proteína A inmovilizada; la capacidad de unión de la membrana "seca" era ~95 % de la membrana húmeda.

A pesar de su buen rendimiento, el uso de glicerol puede ser cuestionable, ya que las membranas pueden tener algo de contenido de agua (lo que puede afectar la estabilidad de la proteína a largo plazo), y la instalación de una membrana en el dispositivo puede estar asociada con problemas técnicos no deseados.

1.3 Trehalosa

La trehalosa, un disacárido, es una molécula amigable con las proteínas que puede servir como agente de secado para las membranas. El secado de una membrana con ProA mediante el uso de trehalosa demostró ser exitoso, ya que la membrana seca exhibía una capacidad de unión que varió entre 90-85 % de la capacidad de unión de la membrana húmeda. Debido a su naturaleza hidrofílica y el pequeño tamaño de molécula, puede lavarse fácilmente de la membrana, por lo que no afectará la etapa de unión de IgG.

La membrana con ProA se remojó durante 2 h en trehalosa al 10 % en peso en tampón fosfato 0,1 M a pH 7. Después, la membrana se secó en el horno (50 °C) durante otras 2 horas. Este procedimiento se estudió con cierto detalle para determinar la variabilidad del proceso y los factores que afectan la eficiencia de conservar la actividad de la proteína A.

1.3.1 Tiempo de remojo

Un tiempo de remojo más corto es ventajoso en cualquier proceso de fabricación. El examen del tiempo de remojo de la membrana con ProA en solución de trehalosa antes del secado mostró que era posible adoptar un tiempo de remojo tan corto como 10 minutos mientras se conservaba la actividad de unión de la membrana. [Membrana 090824-E2-AR9]. Ver la Figura 1.

1.3.2 Tiempo de secado

El tiempo de secado puede ser crítico en términos de fabricación de membranas estables que funcionen consistentemente. Los largos tiempos de secado estresan los restos de proteína A y pueden provocar daños estructurales. Aunque se desean tiempos de secado cortos, el secado incompleto (es decir, la eliminación incompleta de agua) puede dañar la membrana a largo plazo ya que las moléculas residuales de agua permiten cambios lentos en la estructura de la proteína y posiblemente den como resultado la desnaturalización. Por lo tanto, cualquier proceso de secado debe garantizar una eliminación adecuada y eficiente del agua sin sobrecargar la proteína A inmovilizada.

Se secó una membrana con ProA durante diferentes períodos de tiempo. Los resultados mostraron que la membrana puede secarse con eficacia en 30 minutos en el horno (50 °C) y conservar su capacidad de unión. Ver la Figura 2. Vale la pena señalar que las condiciones de secado en las líneas de fabricación son diferentes al enfoque del horno de laboratorio. Se necesita más trabajo para explorar las condiciones del proceso de secado en un entorno piloto/de fabricación. [Membrana 090824-E2-AR9]

1.3.3 Efecto de la concentración

La concentración de trehalosa es un factor crítico en el proceso de secado, ya que controla la cantidad de disacárido que la membrana puede recoger y, en consecuencia, dicta la estabilidad de la proteína A inmovilizada. Se examinaron tres concentraciones de trehalosa en condiciones normales y, como se esperaba, el proceso que empleó una mayor concentración (15 % en peso) dio como resultado los mejores resultados. [Membrana 090824-E2-AR9]. Ver la Figura 3.

Por otro lado, una baja concentración de trehalosa mostró claramente que la captación insuficiente de sacárido era perjudicial para la proteína A inmovilizada (Figura 3). Por lo tanto, cualquier cambio en el proceso (como reducir el tiempo de remojo) debe garantizar el suministro suficiente de azúcar a la membrana antes del secado; aumentar la concentración de azúcar se considera la opción más viable. Pueden encontrarse más detalles en la sección 1.3.5.

1.3.4 Fortaleza del tampón

Cambiar la fuerza iónica del tampón que se usó como disolvente para la trehalosa no afectó la actividad de la proteína A inmovilizada [Membrana 090824-E2-AR9]. Ver la Figura 4.

1.3.5 Experimentos de selección

Se llevaron a cabo experimentos limitados para seleccionar ciertas combinaciones de condiciones con el fin de optimizar el proceso de secado y hacerlo más conveniente para la línea de fabricación. Los resultados, como se muestra en la Figura 5, sugieren que es posible adoptar un tiempo de secado corto a expensas de la concentración de trehalosa. [Membrana 090824-E2-AR9]

1.3.6 Ganancia de masa y relación de azúcar/proteína

Las fórmulas comunes para proteínas secas/liofilizadas generalmente contienen azúcar que es aproximadamente el 50 % en peso de la proteína seca. Para asegurar la estabilidad de la proteína, debe cargarse una cantidad adecuada de azúcar en la membrana durante la etapa de secado. Para examinar la eficacia de los protocolos de secado actuales, se estimó la cantidad de trehalosa en las membranas secas tomando la diferencia entre la masa de la membrana antes y después del secado. La cantidad de azúcar se corrigió asumiendo una adsorción igual de sal de tampón y azúcar por la membrana, y la relación de trehalosa:proteína se calculó en base a la suposición de una inmovilización exitosa al 100 % de la proteína A en la membrana (15 mg de proteína/ml de membrana). Los resultados muestran que, en promedio, la relación de trehalosa con respecto a proteína es de aproximadamente 4,5. La ganancia total de masa es de ~ 19 %. Ver la Figura 6.

Ejemplo 2 - vida en anaquel de membrana con proteína A y precursores de membrana

Para determinar la estabilidad de la membrana con ProA y sus precursores (aldehído y epoxi), se elaboraron muestras manuales y se almacenaron tanto a temperatura ambiente como a temperatura elevada (envejecimiento acelerado), y se juzgó la estabilidad tanto por el flujo como por la capacidad de unión. Las membranas almacenadas a temperatura ambiente se examinarán durante un período de tiempo de dos años (envejecimiento en tiempo real), mientras que los experimentos a temperaturas elevadas se limitarán a las seis semanas.

2.1 Membrana con proteína A

Los datos disponibles mostraron que las membranas con ProA casi conservan sus capacidades de unión durante un período de 6 semanas cuando se almacenan a temperatura ambiente. Sin embargo, cuando la membrana se almacenó a 50 °C durante el mismo período de tiempo, la capacidad de unión disminuyó en un 33 %. Vale la pena señalar que casi no hubo cambios desde los 28 días a los 42 días, lo que puede sugerir que la membrana no puede sufrir más cambios en el rendimiento. Ver la Figura 7.

Para el flujo de agua, la membrana mostró un flujo estable ya sea almacenada a temperatura ambiente o en el horno (50 °C). Además, el examen del flujo del tampón a través de la membrana con ProA demostró que la membrana era insensible a la presencia de sal en la solución (datos no mostrados).

El examen de la membrana con ProA que se almacenó en el horno mostró un cambio interesante en la estructura, ya que se desarrollaron muchas ranuras y grietas menores justo después de 1 semana de almacenamiento a 50 °C. Ver la Figura 8.

2.2 Membrana con aldehído

Para examinar si las condiciones de secado pueden afectar el envejecimiento de la membrana con aldehído, se estudiaron dos series de membranas con aldehído. El primer conjunto incluye membranas con aldehído que se secaron a temperatura ambiente y después se acoplaron con proteína A. El segundo conjunto incluye membranas con aldehído que se secaron en el horno (1 hora) a 50 °C y posteriormente se usaron para el acoplamiento. La estabilidad/validez de las membranas se juzgó tanto por la capacidad de unión como por el flujo.

2.2.1 Membrana con aldehído secada a temperatura ambiente

El examen de la capacidad de unión de las membranas almacenadas indicó una capacidad de unión ligeramente mayor de la membrana almacenada a temperatura ambiente en comparación con la almacenada en el horno a 50 °C. Ver la Figura 9.

El examen del flujo también mostró que no se produjeron cambios drásticos; las diferencias en los flujos pueden atribuirse a la variabilidad de la muestra manual. Ver la Figura 10.

2.2.2 Membrana con aldehído secada al horno (50 °C, 1 h)

En general, los resultados de la capacidad de unión de las membranas con aldehído envejecidas que se secaron en el horno, independientemente de las condiciones de almacenamiento, fueron similares (si no mejores que) a la muestra de referencia (0 días). De hecho, las membranas con aldehído que se almacenaron en el horno mostraron un ligero aumento en la capacidad de unión, en comparación con las almacenadas a temperatura ambiente. Ver la Figura 11.

Curiosamente, se descubrió que el flujo de la membrana con aldehído almacenada en el horno disminuía a medida que la membrana envejecía, mientras que la que se almacenaba a temperatura ambiente apenas cambiaba. Es posible que el ligero aumento de la capacidad de unión de la membrana almacenada en el horno esté asociado con la disminución del flujo con el tiempo. Ver la Figura 12.

2.3 Membrana con epoxi

Los resultados demostraron que la capacidad de unión de ProA derivada de membranas con epoxi que se almacenaron a temperaturas elevadas aumentaba a medida que la membrana envejecía, mientras que la de las almacenadas a temperatura ambiente no cambiaba significativamente. Ver la Figura 13.

El examen del flujo, por otro lado, mostró que el flujo disminuyó a medida que la membrana envejeció en el horno (envejecimiento acelerado). El aumento en la capacidad de unión podría estar asociado con la disminución del flujo, y puede indicar un cambio estructural de la membrana que tiene lugar con el tiempo. Ver la Figura 14.

Ejemplo 3 - Condiciones de aplicación de la membrana con proteína A

Las membranas con ProA se diseñan para que capturen selectivamente IgG. Es imperativo asegurar la unión selectiva y la alta recuperación de IgG; por lo tanto, se trabajó en la optimización de las condiciones de unión y elución para determinar las mejores condiciones y los límites de parámetros tales como pH, tasa de flujo, etcétera.

3.1 Condiciones de unión

Las condiciones de unión regulares fueron las siguientes: tampón fosfato 20 mM con NaCl 0,15 M a pH 7,4, tasa de flujo = 1,0 ml/min.

3.1.1 Efecto de la tasa de flujo

La tasa de flujo controla la cantidad de tiempo que las moléculas de IgG pasan en contacto con la superficie de la membrana y, por lo tanto, la eficiencia de unión. Las tasas de flujo bajas no son deseables por razones de competencia y las altas tasas de flujo pueden disminuir la capacidad de unión.

Para examinar el efecto de la tasa de flujo, se llevaron a cabo experimentos regulares de unión a IgG a dos tasas de flujo diferentes y los resultados se muestran en la Figura 15 (barra izquierda = 2 ml/min; barra derecha = 1 ml/min) [Membrana 090824-E2-AR9].

El aumento de la tasa de flujo de 1,0 ml/min a 2,0 ml/min dio como resultado una disminución de la capacidad de unión a una baja penetración (10 %). Sin embargo, la diferencia en las capacidades de unión fue menor a una alta penetración (cerca de la saturación). La recuperación no se vio afectada por la tasa de flujo.

3.1.2 efecto del pH

Las fuerzas de unión entre la IgG y la proteína A están parcialmente controladas por el pH de la solución. Por lo tanto, es útil determinar la "ventana de pH" dentro de la cual funciona bien la membrana. El pH de las soluciones de unión varió de 6,5 a 8,0 y los resultados se muestran en la Figura 16 [Membrana 090824-E2-AR9] (barra izquierda = pH 7,4; barra central = pH 6,5; barra derecha = pH 8,0).

Es obvio que la unión fue eficaz en el intervalo de pH de 6,5 a 8,0. Por otro lado, la unión fue menor a pH 8,0, ya sea al 10 % de penetración o en la saturación.

3.2 Condiciones de elución

3.2.1 Elución regular con Glicina 0,1 M

Los primeros trabajos con membranas con ProA mostraron que la recuperación de IgG mediante el uso de la solución típica de glicina 0,1 M a pH 3,0 fue insuficiente (65-80 %). El aumento de la tasa de flujo mientras se eluía la IgG no mejoró la elución.

5 3.2.2 Elución con solución de acetato y citrato

Se probaron diferentes sales tampón para mejorar la recuperación. Los tampones comunes usados con resinas, tal como el citrato, se examinaron pero no mejoraron la recuperación. También se examinó el acetato (a pesar del hecho de que se alejó de su pKa) y también exhibió un pobre rendimiento (ver la Figura 17).

10

3.2.3 Elución con una mezcla de solución de Glicina/Glucosa/etanol

Después de muchos ensayos para mejorar la elución mediante el uso de diferentes sistemas de tampón/aditivo, una mezcla de glicina/glucosa (0,2 M cada uno) mezclada con etanol (8:2, V:V) mostró resultados muy prometedores. La recuperación fue superior al 90 %, en comparación con la solución de glicina 0,1 M original o la glicina 0,2 M. Ver la Figura 18.

15

3.2.4 Elución con solución de Glicina/NaCl

20

A pesar del éxito de esta mezcla en eluir IgG de la membrana con ProA, el uso de etanol puede constituir un desafío para los usuarios y puede ser incompatible con algunos procesos industriales. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una alternativa que elimine el uso de etanol.

25

Se examinaron nuevas soluciones de elución que usan altas concentraciones de glicina y sal y los resultados mostraron una recuperación muy alta (Figura 19). La concentración de glicina puede reducirse a 0,5 M en presencia de NaCl 0,5 M sin afectar la eficacia de la elución.

3.2.5 efecto del pH en la recuperación

30

Las condiciones ácidas pueden ser perjudiciales para la IgG. Dado que la etapa de elución se lleva a cabo típicamente a pH bajo (2,5-3), es útil explorar pH más altos que permitan una recuperación eficiente de una membrana con ProA y puedan ser más suaves en la IgG eluida.

35

Los experimentos de unión/elución se llevaron a cabo mediante el uso de soluciones de elución de pH 3,0, 3,5 y 4,0. Los resultados se muestran en la Figura 20 (barra izquierda = pH 3,0; barra central = pH 3,5; barra derecha = pH 4,0) y sugieren que el pH de la solución de elución no debe exceder el pH 3,5. [Membrana 090824-E2-AR9]

Ejemplo 4 - Propiedades mecánicas de la membrana con proteína A

40

4.1 Contracción durante el almacenamiento/fabricación

4.1.1 Cambios en la membrana con epoxi, aldehído y ProA en almacenamiento

45

Para examinar cualquier posible cambio que pueda ocurrirle a una membrana con ProA (o sus precursores) durante el almacenamiento, se cortó un área bien definida de la membrana seca (cupones) de 7,7 cm de diámetro cada una de cada tipo de la membrana y se almacenaron en el horno (50 °C). Los resultados (Figura 21) indicaron que se produjeron cambios mínimos después de 6 semanas de almacenamiento.

50

4.1.2 Cambio en las dimensiones de la membrana al pasar de membrana con aldehído a ProA

Es importante confirmar que las dimensiones de las membranas no van a cambiar significativamente durante la transición de una membrana con funcionalidad de aldehído a una membrana con funcionalidad de ProA.

55

Se hicieron dos piezas de área bien definida en forma de aldehído, después se acoplaron con proteína A. Se midió el área superficial antes y después del proceso de acoplamiento, y se calcularon los cambios. Los resultados indicaron cambios mínimos en el área como se muestra en la Figura 22.

4.2 Resistencia mecánica

60

Para probar la resistencia de la membrana y su capacidad para soportar las condiciones de manipulación, se rodó un trozo de la membrana con ProA alrededor de un cuerpo cilíndrico (1,35 cm de diámetro) en una cara. La membrana se desenvolvió después y rodó alrededor del cilindro en su cara opuesta.

65

Se examinó la capacidad de unión de la membrana envuelta (39,3 mg/ml) y fue similar a la muestra inicial no estresada (38,1 mg/ml). Sin embargo, el examen ESEM mostró que se desarrollaron algunas ranuras a lo largo de las fibras del

sustrato (Figura 23), lo que sugiere que el manejo excesivo de la membrana puede generar defectos estructurales. Por lo tanto, la membrana debe manejarse con cuidado para evitar la generación de defectos. [Membrana 090825-E2-AR14]

Ejemplo 5 - Inmovilización física de IgG en la membrana

Objetivo: Inmovilizar IgG en la membrana, después eluirla sin pérdida de actividad biológica.

Información General

1) Inmovilización

- Unir la proteína IgG en la membrana mediante el uso de condiciones de intercambio iónico
- Lavar la proteína no unida
- Determinar la cantidad de la proteína capturada en la membrana
- Hacer fluir el tampón con estabilizante (pase/remojo/pase)
- Secar a temperatura ambiente mediante el uso de secador de flujo de aire.

2) Elución

- Lavar la membrana con tampón de unión y determinar la lixiviación de proteínas en la solución de lavado
- Eluir la proteína en tampón de elución y determinar el contenido de proteína en la solución, después determinar el % de recuperación

3) Evaluación de la actividad

- Usar el kit de título de IgG [Thermo (Pierce) PI-23310] que se basa en la actividad de proteínas para determinar el contenido de proteína activa
- Determinar la relación de estimación de proteínas mediante el uso del kit con respecto a la determinada mediante el uso de la absorbancia UV. Esta relación representa el % de la proteína activa en la proteína eluida.

Parte experimental

Etapas de inmovilización: Se usó polvo liofilizado de IgG (Equitech Inc.) para preparar una solución de 0,5 mg/ml de IgG en tampón de unión (acetato de sodio 85 mM, pH 5). Se pasaron 30 ml de esa solución a una tasa de flujo de 2 ml/min a través de un disco de membrana de 25 mm, que se montó en un soporte de 25 mm. Posteriormente, para lavar la proteína no unida, se pasaron 14 ml de tampón de unión a través de la membrana a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se recolectaron las soluciones efluentes de las dos etapas (30 ml + 14 ml, unión y lavado), y se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la cantidad de proteína presente en las soluciones. A partir de la absorbancia, se calculó la cantidad de proteína capturada en la membrana.

Se preparó una solución estabilizante disolviendo 10 % en peso de estabilizante en tampón de unión (acetato de sodio 85 mM, pH 5), y se pasaron 6 ml de esa solución a través de la membrana a una tasa de flujo de 0,5 ml/min. El flujo se detuvo y la membrana se dejó en remojo durante 5 minutos en la solución estabilizante, después de lo cual se pasaron otros 6 ml de la solución estabilizante a través de la membrana a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se recolectó la solución total pasada (6 ml + 6 ml) y se midió la absorbancia UV (280 nm) para determinar cualquier proteína lixiviada durante esta etapa.

La celda de soporte se desarmó y el disco de membrana se retiró y se montó en un estante, después se secó a temperatura ambiente con la ayuda de un secador de flujo de aire (10-15 min).

Evaluación de la elución y la actividad: El disco de membrana seca se colocó sobre la celda del soporte y se humedeció con pocas gotas de solución de unión (acetato de sodio 85 mM, pH 5) para asegurar la colocación adecuada de la membrana. El soporte se volvió a ensamblar y se pasaron 12 ml de solución de unión a través de la celda para asegurar la eliminación completa de las burbujas de aire. Esta solución se recolectó para determinar si se lixivió alguna proteína durante la etapa de lavado. Después, se pasó una cantidad de 12-14 ml de solución de elución (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 1 M, pH 7,2) a través de la celda y se recolectó esta solución. Se midió la absorbancia UV (280 nm) para determinar la concentración de proteína, la cantidad total de la proteína eluida y el % de recuperación.

Mediante el uso de un kit de título de IgG (Thermo - Pierce PI-23310), que se basa en la interacción anticuerpo-antígeno para la detección, se determinó la concentración de proteína IgG en la solución de elución. El estándar fue polvo de IgG liofilizado en solución.

La relación de la concentración de IgG que se determinó mediante el ensayo de actividad, con respecto a la concentración basada en la absorbancia UV, representa la relación activa de la proteína IgG en la solución de elución.

Como una muestra de control, se disolvió un polvo de IgG en solución tampón (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2), después se secó sobre una placa de Petri de vidrio a temperatura ambiente con la ayuda de aire que fluía, y después se disolvió nuevamente en tampón. Después se evaluó la actividad.

Resultados

Si bien la naturaleza hidrofílica no cargada del estabilizante hace que sea poco probable que interfiera con las interacciones iónicas entre la membrana y las moléculas proteicas, es importante confirmar que no conducirá a ninguna lixiviación de proteínas durante la estabilización.

Las soluciones estabilizantes que habían pasado a través de la membrana no mostraron lixiviación de proteínas. Esto muestra que es posible aplicar la solución estabilizante sin desplazar la proteína adsorbida de la membrana.

Para eluir las proteínas en condiciones que favorezcan la estabilidad de la proteína, el pH de la solución de elución debe estar dentro del intervalo de 6,5-7,5. A tal pH, se espera que la elución sea más fácil porque tanto las moléculas de proteína como la membrana tendrán una carga más negativa.

La elución de IgG con solución de pH 7,2 fue altamente eficiente; por lo tanto, fue posible usar esta solución para eluir la IgG inmovilizada físicamente de la membrana en condiciones que son favorables para la estabilidad de la proteína y para mantener la actividad de la proteína.

Los resultados de la unión y la elución se muestran en la Figura 26.

Para determinar la estabilidad biológica de la proteína eluida, después de eluir la IgG de las membranas, se analizó como se describe en el procedimiento del kit y se determinó la concentración de moléculas de proteína activa. La relación de esta proteína activa con respecto a la cantidad total de proteína (indicada por la absorbancia UV) puede indicar la relación de actividad de la proteína eluida. El polvo liofilizado de IgG se usó como material estándar a partir del cual se construyó una curva de calibración.

Para demostrar el efecto tanto de la membrana como del estabilizante sobre el mantenimiento de la bioactividad de la proteína durante el proceso de secado, se realizó una muestra de control secando una solución de IgG sobre una placa de Petri de vidrio a temperatura ambiente, con la ayuda de aire fluido. La muestra seca se reconstituyó en tampón y la actividad se determinó de manera similar a otras muestras.

Los resultados sugieren que la IgG puede inmovilizarse físicamente en una membrana y permanecer biológicamente activa, especialmente cuando se incluye un estabilizante (tal como trehalosa o polietilenglicol) en el proceso de secado. Ver la Figura 27.

Conclusiones

La proteína IgG puede capturarse e inmovilizarse en una membrana y mantenerse en condiciones secas sin una pérdida importante en la actividad de la proteína. La presencia de estabilizantes hidrofílicos durante el proceso de secado puede conservar la estabilidad de la proteína. El agente estabilizante no interfiere con la modalidad física de la proteína. Es posible usar condiciones de elución a un pH diferente al usado en los procesos de unión sin afectar la recuperación de la proteína.

Apéndice

La Figura 28 representa la curva de calibración del ensayo de IgG. En la Figura 29 se muestran resultados adicionales y detallados para la elución mediante el uso de una solución tampón de pH 7,2.

REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto seco y estabilizado que comprende:
un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte;
un gel macroporoso reticulado, que comprende una pluralidad de macroporos;
una proteína unida covalentemente al gel macroporoso reticulado, en donde la proteína es proteína A; y
un agente estabilizante que comprende polietilenglicol, glucosa, glicerol o sacarosa;
en donde el gel macroporoso reticulado se localiza en los poros del miembro de soporte; y el diámetro promedio de poro de los macroporos es menor que el diámetro promedio de poro de los poros.
2. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante comprende polietilenglicol.
3. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante comprende polietilenglicol, glicerol o sacarosa.
4. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante comprende glicerol.
5. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una sal.
6. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con la reivindicación 5, en donde la sal es una sal de fosfato o una sal de acetato.
7. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el material compuesto es sustancialmente estable a 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C o 60 °C.
8. El material compuesto seco y estabilizado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la relación de masa del agente estabilizante con respecto a la proteína A es 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 o 1:4.

Figura 1

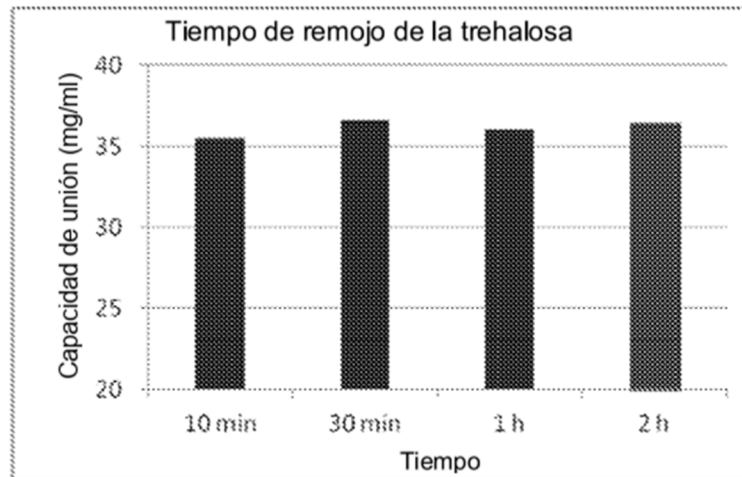


Figura 2

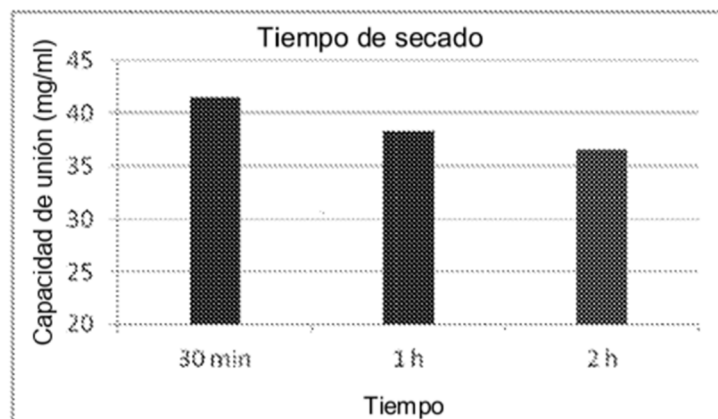


Figura 3

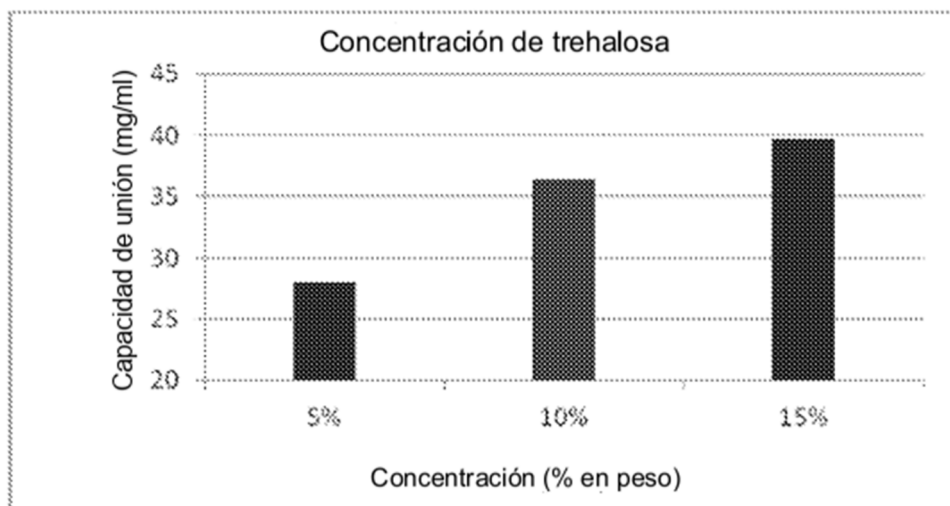


Figura 4

Conc. de tampón (mM)	Corrida 1	Corrida 2	Promedio
50	36,0	34,9	35,5
100	37,7	35,2	36,5
200	37,1	34,1	35,6

Figura 5

Exp. #	Conc. de trehalosa (% en peso)	Tiempo de remojo	Tiempo de secado	Capacidad de unión (mg/ml)
1	15	10 min	2 h	36,0
2	15	10 min	15 min	38,1
3	15	5 min	15 min	37,6

Figura 6

Muestra	Espesor (cm)	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Volumen (ml)	Peso después (g)	Peso antes (g)	Peso de trehalosa/ sal (g)	Ganancia de masa (% en peso)	Trehalosa en membrana (mg/ml)*	Relación de Trehalosa:Sr ProA**
090819-E2-AR5	0,0381	6,5	4	0,99	0,4923	0,4133	0,079	19,1	71,9	4,8
090819-E2-AR6	0,0351	6,5	3,7	0,84	0,3335	0,2778	0,0557	20,1	59,4	4,0
090824-E2-AR10	0,0389	6,5	3,7	0,94	0,4385	0,3707	0,0678	18,3	65,2	4,3
090824-E2-AR11	0,0345	6,5	3,5	0,78	0,4099	0,3431	0,0668	19,5	76,6	5,1

Figura 7

Membrana	Tipo	Condiciones de secado	Condiciones de almacenamiento	Periodo de tiempo	B.C. (mg/ml)	Flujo (kg/m2.h)
090819-E2-AR1A	ProA	Horno (2 h)	R.T	Inicial	38,9	811
090819-E2-AR1A	ProA	Horno (2 h)	R.T	14 días	36,7	-
090819-E2-AR3B					38,0	
090819-E2-AR1A				28 días	34,6	840
090819-E2-AR3B					35,4	
090819-E2-AR1A				42 días	34,6	845
090819-E2-AR3B					33,4	
090819-E2-AR2A	ProA	Horno (2 h)	Horno	1 día	33,4	-
090819-E2-AR2B					33,0	
090819-E2-AR2A				14 días	27,6	-
090819-E2-AR2A					28,7	
090819-E2-AR2B					28,8	
090819-E2-AR2A				28 días	25,8	859
090819-E2-AR2B					26,4	
090819-E2-AR2A				42 días	25,6	1042
090819-E2-AR2B					26,4	

Figura 8

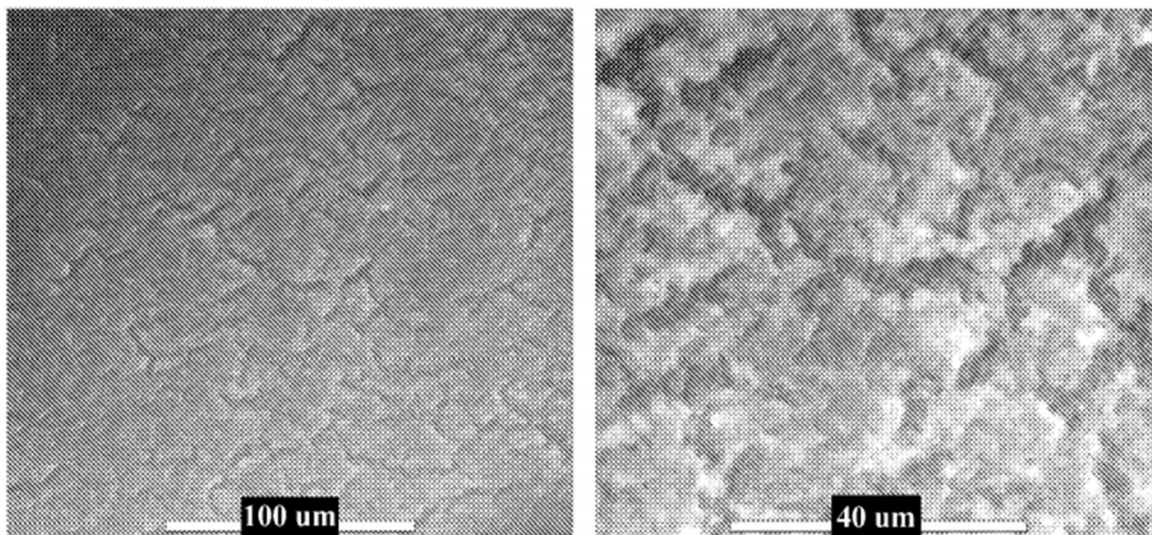


Figura 9

Membrana	Tipo de membrana almacenada	Condiciones de secado	Condiciones de almacenamiento	Periodo de tiempo	B.C. de ProA (mg/ml)
090819-E2-AR5A	Aldehído	R.T	R.T	Inicio	35,2
090819-E2-AR5A					35,5
090819-E2-AR5A	Aldehído	R.T	R.T	14 días	36,9
090819-E2-AR5A					40,5
090819-E2-AR6A			Horno	14 días	30,9
090819-E2-AR6A					34,8
090819-E2-AR5A	Aldehído	R.T	R.T	42 días	39,9
090819-E2-AR5A					36,0
090819-E2-AR6A			Horno	42 días	30,5
090819-E2-AR6A					35,8

Figura 10

Flujo de membrana con aldehído almacenado a RT (kg/m ² .h)				Flujo de membrana con aldehído almacenado en horno (50 °C) (kg/m ² .h)			
Membrana	Día	R.O.	Tampón	Membrana	Día	R.O.	Tampón
090819-E2-AR5A	0	1680	1721	090819-E2-AR5A	0	1680	1721
090819-E2-AR5A	28	1839	1802	090819-E2-AR6A	28	1907	1948
				090819-E2-AR6A	42	1873	1879

Figura 11

Membrana	Tipo de membrana almacenada	Condiciones de secado	Condiciones de almacenamiento	Periodo de tiempo	B.C. de ProA (mg/ml)
090824-E2-AR10	Aldehído	Horno (50 °C -1 h)	R.T	Inicio	44,3
090824-E2-AR10					41,0
090824-E2-AR10	Aldehído	Horno (50 °C -1 h)	R.T	14 días	44,1
090824-E2-AR10					41,3
090824-E2-AR11			Horno	14 días	43,3
090824-E2-AR11					44,5
090824-E2-AR10	Aldehído	Horno (50 °C -1 h)	R.T	42 días	44,9
090824-E2-AR10					40,4
090824-E2-AR11			Horno	42 días	45,5
090824-E2-AR11					44,7

Figura 12

Flujo de membrana con aldehído secado en horno y almacenado a RT (kg/m2.h)				Flujo de membrana con aldehído secado y almacenado en horno (50 °C) (kg/m2.h)			
Membrana	Día	R.O.	Tampón	Membrana	Día	R.O.	Tampón
090824-E2-AR10	0	1321	1297	090824-E2-AR10	0	1321	1297
090824-E2-AR10	28	1217	1204	090824-E2-AR11	28	1016	990
				090824-E2-AR11	42	953	956

Figura 13

Membrana	Tipo de membrana almacenada	Condiciones de secado	Condiciones de almacenamiento	Periodo de tiempo	B.C. de ProA (mg/ml)
090825-E2-AR14	Epoxi	R.T	R.T	Inicio	38,1
090825-E2-AR12	Epoxi	R.T	R.T	14 días	36,9
090825-E2-AR12					NA
090825-E2-AR13			Horno	14 días	41,5
090825-E2-AR13					40,5
090825-E2-AR12	Epoxi	R.T	R.T	42 días	36,5
090825-E2-AR12					33,8
090825-E2-AR13			Horno	42 días	45,3
090825-E2-AR13					43,4

Figura 14

Flujo de membrana con epoxi (kg/m2.h)		
Día	RT (Membrana:090825-E2-AR12)	Horno (50 °C) (Membrana:090825-E2-AR13)
0	2026	-
28	1812	1265
42	-	1218

Figura 15

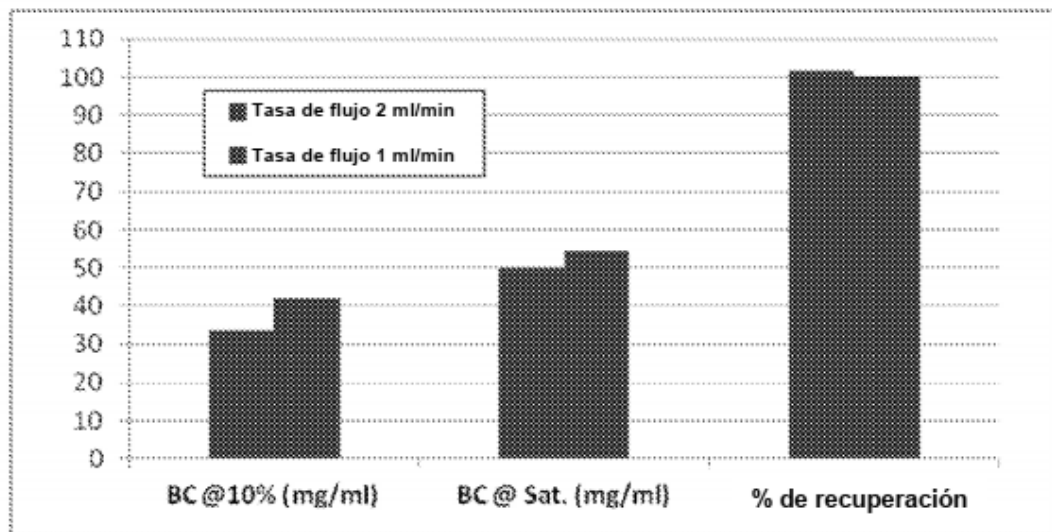


Figura 16

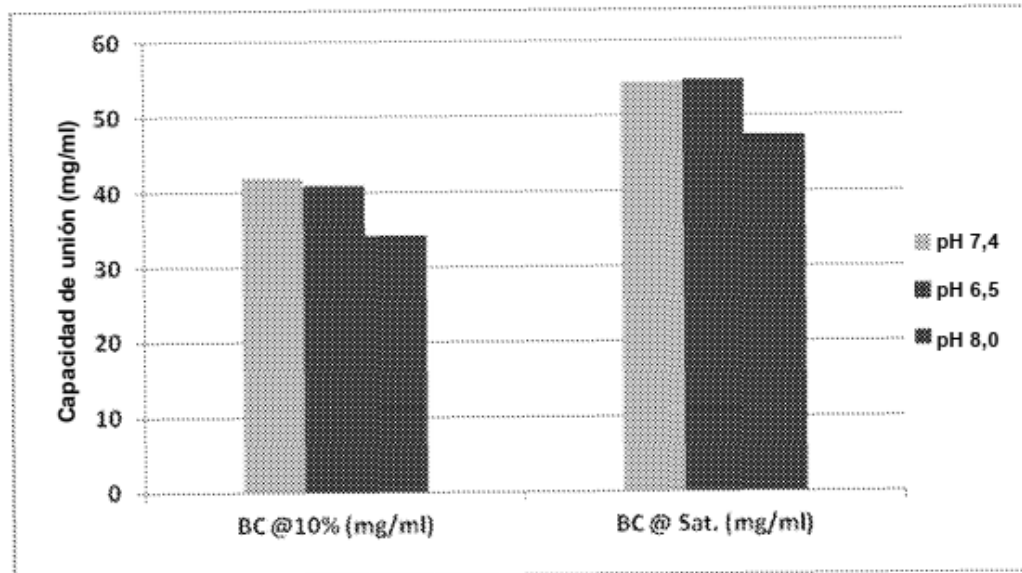


Figura 17

Membrana	Solución de elución	% de penetración	Unión (mg/ml) @ BT específico	% de recuperación
090714-Y1 Yin	Glicina 0,1 M, pH 2,9	86	51,1	58
090722-Y1-AR3	Citrato 0,1 M, pH 3	84	56,7	65
090722-Y1-AR3	Acetato 0,4 M, pH 3	78	49,5	62

Figura 18

Membrana	% de penetración	B.C. (mg/mL)	% de recuperación	Elución
090728-E2	85,9	60,0	65,0	Glicina 0,2 M
090728-E2	85,6	59,4	91,4	(Glicina 0,2 M, Glucosa 0,2 M) y EtOH [8:2 v:v]
090728-E2	86,4	62,6	90,3	
090728-E2	70,2	58,4	92,8	
090728-E2	46,8	58,4	92,0	
090728-E2	9,1	55,3	91,6	
090728-E2	9,6	55,2	93,1	

Figura 19

Membrana	B.C. (mg/mL)	% de B.T.	% de recuperación	Solución de elución
090819-E2-AR9-EI2	54,5	87,5	100,3	Glicina 1 M, NaCl 1 M, pH 3
090819-E2-AR5A-14d	50,9	88,2	91,1	Glicina 1 M, NaCl 1 M, pH 3
090819-E2-AR6A-14d	46,8	92,7	104,8	Glicina 1 M, NaCl 1 M, pH 3
090824-E2-AR11-14d	57,7	87,7	98,6	Glicina 1 M, NaCl 1 M, pH 3
090825-E2-AR12-14d	50,8	91,5	90,8	Glicina 1 M, NaCl 1 M, pH 3
090819-E2-AR5A-14d Rep	51,8	89,0	88,1	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090819-E2-AR6A-14d Rep	48,9	92,6	99,3	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090824-E2-AR11-14d Rep	58,5	91,6	98,1	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090825-E2-AR13-14d	54,8	89,8	94,8	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090825-E2-AR13-14d Rep	53,2	91,0	96,7	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090825-E2-AR10-14d Rep	52,2	90,7	97,9	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090819-E2-AR1A-28d	45,1	94,7	98,4	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3
090819-E2-AR3B-28d	46,1	94,5	95,5	Glicina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 3

Figura 20

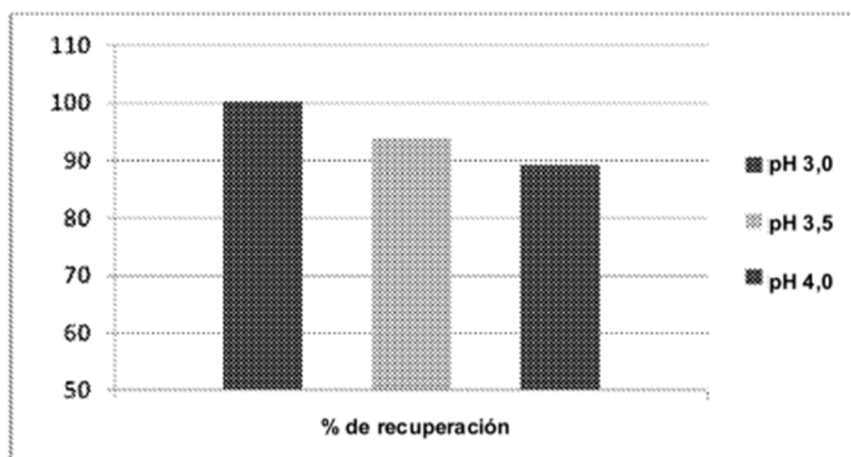


Figura 21

Membrana	Diámetro (cm)		Área (cm ²)		% de contracción
	día cero	día 42	día cero	día 42	
090825-E2-AR14-Epoxi	7,7	7,65	46,59	45,98	1,3
090825-E2-AR14-Aldehído	4,7	4,7	17,36	17,36	0,0
090825-E2-AR14-ProA	4,7	4,7	17,36	17,36	0,0

Figura 22

Membrana	Aldehído		ProA		Área (cm ²)		% de contracción
	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Aldehído	ProA	
090819-E2-AR-5A	4,5	7	4,5	6,95	31,5	31,28	0,7
090824-E2-AR-10A	4,5	7	4,5	6,95	31,5	31,28	0,7

Figura 23

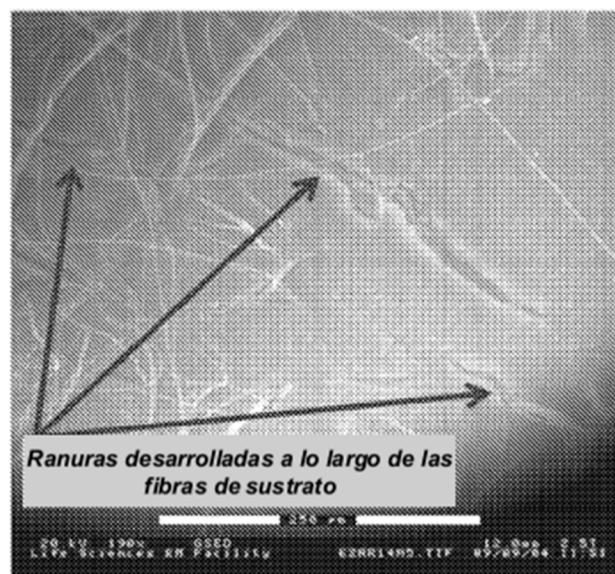
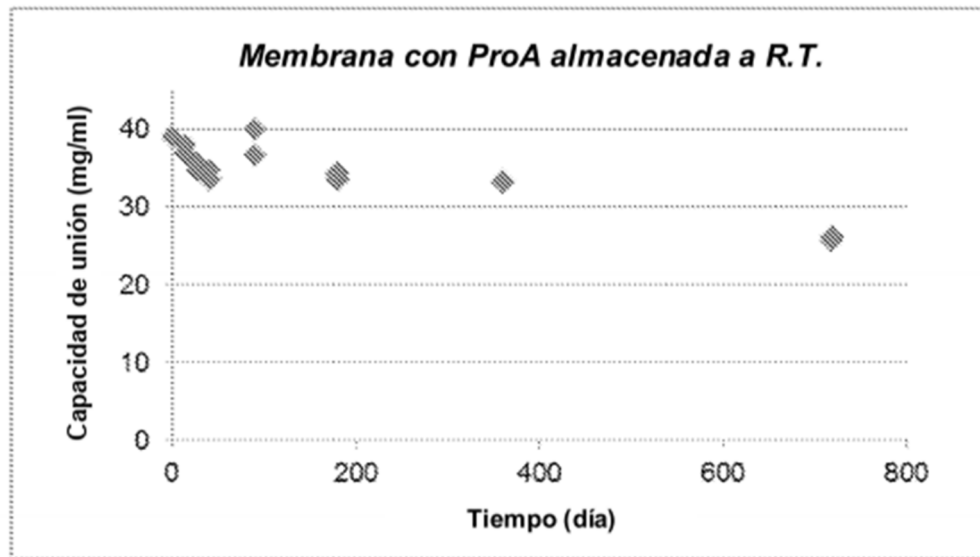


Figura 24

Membrana	Tipo	Condiciones de secado	Condiciones de almacenamiento	Periodo de tiempo	B.C. (mg/ml)
E2-AR1A	ProA	Horno (2 h)	R.T	Inicio	38,9
E2-AR1A	ProA	Horno (2 h)	R.T	14 d	36,7
E2-AR3B					38,0
E2-AR1A				28 d	34,6
E2-AR3B					35,4
E2-AR1A				42 d	34,6
E2-AR3B					33,4
E2-AR1A				90 d	33,9
E2-AR3B					36,6
E2-AR3A				180 d	33,5
E2-AR3B					34,3
E2-AR3A				360 d	33,1
E2-AR3B					33,3
E2-AR1A				720 d	25,5
E2-AR3B					26,1
E2-AR2A	ProA	Horno (2 h)	Horno	1 d	33,4
E2-AR2B					33,0
E2-AR2A				14 d	27,6
E2-AR2A Rep					28,7
E2-AR2B				28 d	28,8
E2-AR2A					25,6
E2-AR2B				42 d	26,4
E2-AR2A					25,6
E2-AR2B					26,4

Figura 25

(a)



(b)

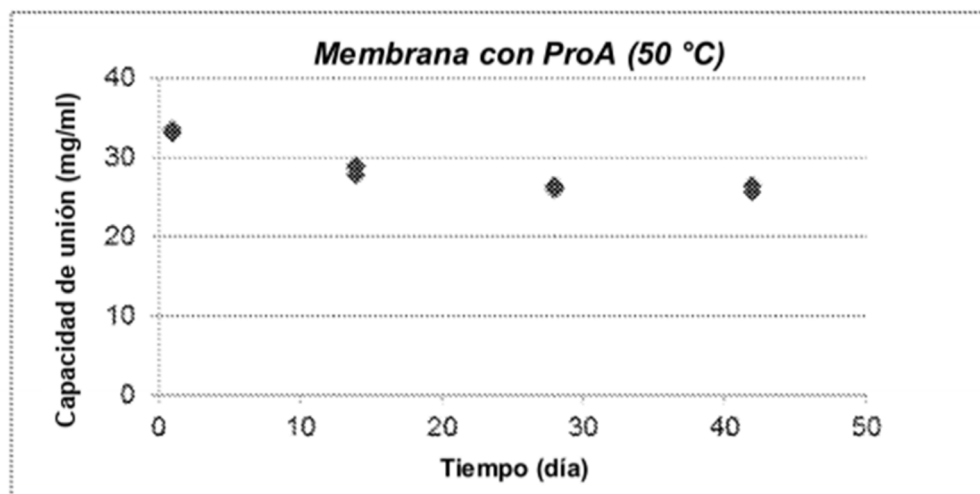


Figura 26

Muestra de prueba	Almacenamiento (días)	Estabilizante	Alimentación	Pase/Lavado	IgG unida (mg)	Lavado en tampón de unión (antes de la elución)		Elución	
			Cantidad de IgG (mg)	IgG pasada (mg)		IgG lavada (mg)	IgG lavada %	IgG eluida (mg)	Recuperación (%)
110301CAP-T7	1	Ninguno	15,187	0,632	14,455	0,023	0,2	13,367	91,8
110301CAP-T3	16	Ninguno	14,842	0,253	14,589	0,057	0,4	13,223	90,6
110301CAP-T1	1	Trehalosa	15,187	0,716	14,471	0,046	0,3	13,642	94,3
110301CAP-T1	16	Trehalosa	14,842	0,253	14,589	0,287	1,9	13,169	90,3
110301CAP-T2	16	Trehalosa	14,842	0,295	14,547	0,080	0,5	13,759	94,6
110301CAP-T5	1	PEG1000**	15,187	1,221	13,966	0,115	0,8	13,068	93,6

Figura 27

Estabilizante (10 % en peso en tampón de unión)	Días de almacenamiento excepto como se indica (2-8 °C)	% de IgG activa
IgG seca en vidrio sin estabilizante	< 60 mins	53,1
Ninguno	1	78,9
Ninguno	16	72,3
Trehalosa	1	92,1
Trehalosa	16	101,4
Trehalosa	16	80,5
PEG 1000	1	99,5

Figura 28

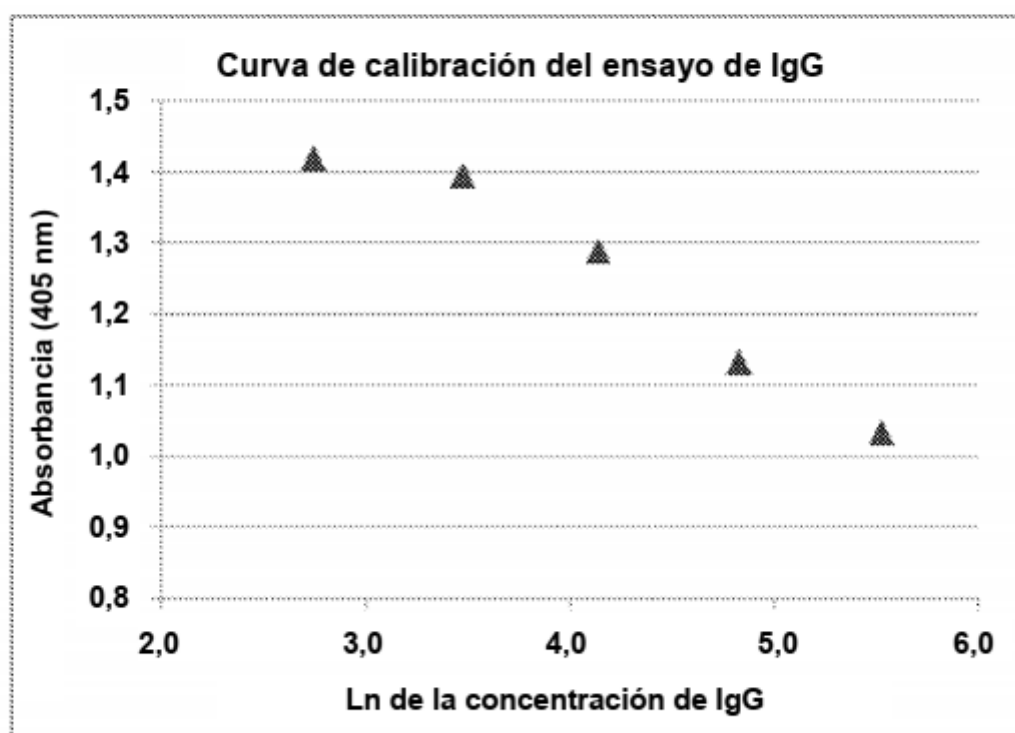


Figura 29

Muestra de prueba	Alimentación				Pase/Lavado				Elución				Volumen de lecho (ml)	Capacidad de unión (mg/ml)	Capacidad de unión a 10 % de B.T. (mg/ml)
	Factor de calib. de IgG	Abs. (Au)	Vol. (ml)	Cantidad de IgG (mg)	Abs	Vol. (ml)	IgG pasada (mg)	IgG unida (mg)	Abs	Vol. (ml)	IgG eluida (mg)	Recuperación (%)			
Elución de 110301CAP con pH 7,2 Ciclo 1	1,045	0,529	30	15,187	0,010	44	0,421	14,766	0,992	15	14,2392	96,4	0,105	140,6	115,8
Elución de 110301CAP con pH 7,2 Ciclo 2	1,045	0,529	30	15,187	0,010	44	0,421	14,766	0,993	15	14,2536	96,5	0,105	140,6	115,5