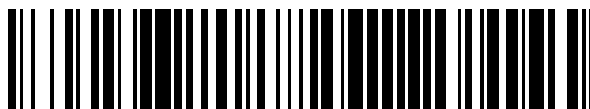


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 137**

51 Int. Cl.:

|                    |                             |           |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>B01D 69/12</b>  | (2006.01) <b>B01D 15/34</b> | (2006.01) |
| <b>B01D 67/00</b>  | (2006.01) <b>C07K 1/18</b>  | (2006.01) |
| <b>B01D 71/06</b>  | (2006.01) <b>C07K 1/22</b>  | (2006.01) |
| <b>B01J 20/26</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>B01J 20/30</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>C08J 3/24</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>C08J 5/12</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>C08L 81/02</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>B01J 20/28</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>B01J 20/291</b> | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2016 PCT/IB2016/000297**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16132224**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2016 E 16751984 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3259050**

54 Título: **Membranas para cromatografía formadas por reacciones de polimerización clic de tiol-eno o tiol-ino**

30 Prioridad:

**20.02.2015 US 201562118577 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.03.2021**

73 Titular/es:

**MERCK MILLIPORE LTD. (100.0%)**  
**Tullagreen, County Cork**  
**Carrigtwohill, IE**

72 Inventor/es:

**SKARJA, GARY y**  
**RAGHEB, AMRO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 811 137 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

Membranas para cromatografía formadas por reacciones de polimerización clic de tiol-eno o tiol-ino

## 5 Antecedentes

La "química clic" es la clase de reacciones que se asemejan a las reacciones bioquímicas naturales, con los siguientes atributos: reacciones altamente eficientes, "cargadas por resorte" que proceden rápidamente a un alto rendimiento; reacciones altamente selectivas que no producen (o producen pocos) productos secundarios y toleran múltiples grupos funcionales; y reacciones que se producen en condiciones de reacción moderadas, tales como a bajas temperaturas (por ejemplo, ambiente) o en soluciones acuosas.

La química clic creció para abarcar una gama de reacciones químicas, tales como reacciones de Diels-Alder, cicloadición de alqueno-azida catalizada por cobre (CuAAC), reacciones de adición de tiol-maleimida, y reacciones de adición de tiol-alqueno y tiol-alquino.

El término "tiol-eno" se usa en general para describir la adición por hidrotiolación de un tiol a cualquiera de una amplia variedad de grupos funcionales insaturados, tales como maleimidas, acrilatos, y norbornenos, además de los dobles enlaces carbono-carbono no activados. En algunos casos, la reacción puede tener lugar no solo a través del mecanismo clásico de adición de radicales, sino también con la adición nucleofílica tipo Michael. El término "tiol-ino" se usa para describir métodos de hidrotiolación de contrapartida mediante el uso de un alquino en lugar de un alqueno. En general, las reacciones de tiol-eno y tiol-ino se llevan a cabo bajo condiciones de radicales fotoiniciadas y proceden a través de un proceso típico de crecimiento de cadena con etapas de iniciación, propagación, y terminación.

Las reacciones clic de tiol-eno e -ino tienen muchas características atractivas para la síntesis de polímeros. Las reacciones son rápidas, estereoespecíficas, insensibles al agua, y pueden proporcionar una variedad de funcionalidades de polímeros mediante el uso de varios monómeros funcionalizados con tiol y/o alqueno/alquino. Mediante el uso de monómeros di-, tri- y tetrafuncionalizados de tiol y alqueno/alquino, es posible realizar reacciones clic de tiol-eno e -ino para construir nuevos materiales con una variedad de funcionalidades químicas. Estas reacciones también pueden dar como resultado redes poliméricas más altamente organizadas, en comparación con polímeros de acrilato similares.

El documento núm. US 2008/0264867 A1 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 un gel reticulado macroporoso que se encuentra en, y rellena, los poros del miembro de soporte, en el que el gel reticulado se atrapa en un polímero estabilizador. El reticulador del gel reticulado puede ser triacrilato de trimetilolpropano.

Existe la necesidad de medios de separación o cromatografía que puedan fabricarse fácilmente mediante reacciones de polimerización rápidas, eficientes, y fácilmente controlables, y que puedan modificarse fácilmente. Estos medios también deben mostrar alta selectividad y alta velocidad de flujo, baja contrapresión, ser económicos, y permitir una larga vida útil de la columna, tiempos de proceso cortos, y flexibilidad operativa general.

## Resumen

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un material compuesto que comprende:  
un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y  
un gel reticulado, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de un primer monómero, un segundo monómero, y un primer reticulador;  
en donde  
el gel reticulado se encuentra en los poros del miembro de soporte;  
el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol; y  
el segundo monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono; y  
el primer reticulador comprende (i) al menos tres grupos funcionales tiol, (ii) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (iii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iv) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para fabricar un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 11.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para fabricar un material compuesto, que comprende las etapas de:  
combinar un primer monómero, un segundo monómero, un primer reticulador, un fotoiniciador, y un solvente, en donde el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol; el segundo monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono; y el primer reticulador comprende (i) al menos tres grupos funcionales tiol, (ii) al menos tres dobles enlaces

- carbono-carbono, (iii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iv) al menos un triple enlace de carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono, formando de esta manera una mezcla monomérica; poner en contacto un miembro de soporte con la mezcla monomérica, formando de esta manera un miembro de soporte modificado; en donde el miembro de soporte comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte, y el diámetro promedio de poro de los poros es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ ;
- 5 recubrir el miembro de soporte modificado con una lámina polimérica, formando de esta manera un miembro de soporte recubierto; y irradiar el miembro de soporte recubierto por un período de tiempo, formando de esta manera un material compuesto.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla monomérica comprende además una pluralidad de precursores de grupos terminales; y los precursores de grupos terminales son moléculas que tienen un grupo funcional tiol o moléculas que tienen un enlace carbono-carbono insaturado.
- 15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además las etapas de: poner en contacto el material compuesto con una mezcla que comprende un fotoiniciador y una pluralidad de precursores de grupos terminales, en donde los precursores de grupos terminales son moléculas que tienen un grupo funcional tiol o moléculas que tienen un enlace carbono-carbono insaturado, formando de esta manera una mezcla de injerto; y irradiar la mezcla de injerto por un período de tiempo, formando de esta manera un material compuesto modificado.
- 20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende la etapa de: poner en contacto a un primer régimen de flujo un primer fluido que comprende una sustancia con cualquiera de los materiales compuestos descritos en la presente descripción, con lo que se adsorbe o absorbe de esta manera una porción de la sustancia sobre el material compuesto.
- 25 Breve descripción de las figuras
- La Figura 1 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos mediante el uso de TEGDV como comonómero.
- 30 La Figura 2 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con TEGDV como comonómero y cantidades variables de iniciador. La Figura 3 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con TEGDV y DATA como comonómeros.
- 35 La Figura 4A tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con DATA como comonómero. La Figura 4B tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con DATA como comonómero, a una concentración más alta con relación al experimento que es el sujeto de Figura 4A.
- 40 La Figura 5A representa una imagen ESEM de una membrana compuesta formulada con DATA como comonómero formulado con una relación de alqueno respecto a tiol (calculada por el número de grupos funcionales reactivos presentes, donde un alquino es equivalente a dos alquenos porque cada alquino puede reaccionar con dos tioles) de 0,96 (EN-149). La Figura 5B representa una imagen ESEM de una membrana compuesta formulada con DATA como comonómero formulado con una relación de alqueno respecto a tiol (calculada por el número de grupos funcionales reactivos presentes, donde un alquino es equivalente a dos alquenos porque cada alquino puede reaccionar con dos tioles) de 1,05 (EN-151).
- 45 La Figura 6 representa una imagen ESEM de una membrana compuesta (EN-124) formulada con DATA como comonómero; la relación de alqueno respecto a tiol en la mezcla de polimerización para fabricar esta membrana fue de 1,27. La Figura 7 tabula los componentes de reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) para las membranas formadas por reacciones clic de alquenos con octadiino como un reticulador adicional.
- 50 La Figura 8A representa una imagen ESEM de una membrana compuesta preparada con octadiino como un reticulador adicional preparado con una relación de alqueno respecto a tiol de 1,074 (EN-134). La Figura 8B representa una imagen ESEM de una membrana compuesta preparada con octadiino como un reticulador adicional preparado con una relación de alqueno respecto a tiol de 1,18 (EN-120).
- 55 La Figura 9 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alqueno e injertadas con restos de carboxilato a través de una segunda reacción clic después de la polimerización. La Figura 10 representa una representación gráfica del flujo de agua de varias membranas compuestas de la invención antes de injertarse con restos carboxilato (barra izquierda) y después de injertarse con restos carboxilato (segunda barra izquierda). Tras la exposición a pH 5, el flujo aumenta (segunda barra derecha). Tras la exposición a NaOH 0,1 M, el flujo disminuye nuevamente (barra derecha).
- 60 La Figura 11 representa una representación gráfica del flujo de agua de varias membranas compuestas de la invención antes de injertarse con restos carboxilato (barra izquierda), después de injertarse en agua con restos carboxilato (barra central), y después de injertarse en DMAc con restos carboxilato (barra derecha). La Figura 12 tabula la capacidad de unión de tres membranas modificadas con proteína A en ausencia de aditivos funcionalizados con tiol (A) y en presencia de aditivos funcionalizados con tiol (B y C).
- 65

- La Figura 13 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con DATA como un comonomero y un sistema de solvente que comprende, por ejemplo, trietilenglicol o tetraetilenglicol.
- La Figura 14 representa una imagen SEM de la membrana CLK-EN-298.
- La Figura 15 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con PETM como un correticulador.
- La Figura 16 representa una imagen SEM de la membrana EN-325 fabricada mediante el uso de un reticulador de tetratiol (PETM).
- La Figura 17 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas formadas por reacciones clic de alquenos con octadiino como un correticulador.
- La Figura 18 representa una imagen SEM de la membrana CLK-EN-361.
- La Figura 19 tabula los componentes de reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en la preparación de membranas de HIC formadas por polimerización y funcionalización en una etapa.
- La Figura 20 representa una representación esquemática de un proceso de extensión de injerto de dos etapas que comienza con una membrana funcionalizada con alquenos.
- La Figura 21 tabula los componentes de la reacción (% en peso) y los solventes (% en peso) usados en una reacción de doble polimerización.
- La Figura 22 tabula los componentes de la reacción (% en moles) usados en una reacción de polimerización doble, y las propiedades de las membranas resultantes.
- Descripción detallada
- Información general
- Si bien el trabajo reciente se centró en el uso de la química clic de tiol-eno e -ino para producir varias redes poliméricas funcionalizadas, principalmente para aplicaciones de películas, recubrimientos, y dendrímeros, el enfoque no se aplicó a la producción de membranas poliméricas de red macroporosa útiles para procesos de separación líquidos. En ciertas modalidades, la invención se refiere al uso de química clic de tiol-eno e -ino para la generación de membranas poliméricas reticuladas adecuadas para aplicaciones de cromatografía líquida. En ciertas modalidades, las membranas reticuladas se injertan adicionalmente con grupos funcionales químicos o especies moleculares. En ciertas modalidades, la generación de la membrana reticulada por polimerización, y la modificación de la membrana reticulada por injerto, se llevan a cabo a través de reacciones clic altamente eficientes de tiol-eno e/o -ino (procedimiento en una o dos etapas).
- En ciertas modalidades, la química clic de tiol-eno e -ino se emplea para hacer un polímero reticulado que se soporta por un sustrato fibroso, formando de esta manera una membrana compuesta. En ciertas modalidades, los polímeros reticulados en las membranas compuestas contienen grupos reactivos residuales, tales como tioles o enlaces carbono-carbono insaturados, que pueden usarse para unir diversos compuestos químicos o especies moleculares mediante reacciones clic adicionales.
- En ciertas modalidades, el polímero reticulado es macroporoso. La porosidad dentro de los polímeros puede promoverse durante la polimerización mediante el grado de reticulación, la exclusión del solvente de la cadena polimérica durante la formación de la red polimérica, o alguna combinación de ambos.
- El grado de reticulación en el polímero puede ajustarse mediante el ajuste de la relación de monómero. Específicamente, se considera que la relación de alqueno respecto a tiol asegura una porosidad adecuada. La longitud de la cadena de los polímeros en la red polimérica y, por lo tanto, el grado de reticulación también pueden controlarse mediante el uso de monómeros específicos que imparten propiedades fisicoquímicas específicas al polímero y la membrana finales. Estos monómeros de "ajuste" pueden afectar la interacción de la cadena de polímero con el sistema de solvente. Además, la hidrofiliidad/hidrofobicidad de estos monómeros puede afectar las propiedades finales de hinchamiento acuoso del gel resultante y las propiedades de superficie hidrófilas/hidrófobas de la red polimérica.
- El control de la porosidad de la red de polímeros requiere cuidado cuando se usa la química clic porque la reacción de tiol-eno es muy rápida. Como resultado, el movimiento de la cadena en crecimiento puede restringirse de formar poros. Para minimizar este resultado indeseable, el sistema de solvente y el monómero se seleccionan para asegurar que exista una fuerza impulsora adecuada para excluir las cadenas de polímero en crecimiento de la solución en un cierto punto, formando de esta manera macroporos. Específicamente, la mezcla de solventes y no solventes se ajusta para proporcionar un sistema de reacción adecuado que puede disolver inicialmente todos los reactivos pero que sirve como un solvente pobre para las cadenas de polímeros reticulados a medida que crecen hasta ser más grandes que un cierto peso molecular. Un sistema de solvente con una proporción demasiado alta de solvente pobre (para las cadenas de polímeros) puede conducir a una precipitación rápida de las cadenas de polímeros en crecimiento, lo que disminuye la porosidad.
- En general, muchos materiales poliméricos altamente porosos y no rígidos son relativamente débiles y no pueden soportar las presiones generadas durante los procesos de separación por membrana típicos (por ejemplo, cromatografía líquida). Por lo tanto, para fabricar membranas que sean mecánicamente adecuadas, en ciertas modalidades se produce un material compuesto que comprende tanto un sustrato poroso (tal como un sustrato tejido fabricado de polipropileno

químicamente inerte) como un polímero poroso reticulado mediante la síntesis del polímero directamente dentro de los poros del sustrato.

En ciertas modalidades, cuando se examinan mediante el uso microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), los materiales compuestos mostraron una red de gel bien conectada que se incorpora dentro de las fibras del sustrato.

En ciertas modalidades, los materiales compuestos de la invención pueden usarse efectivamente en los modos "unir-eluir" y de "flujo continuo".

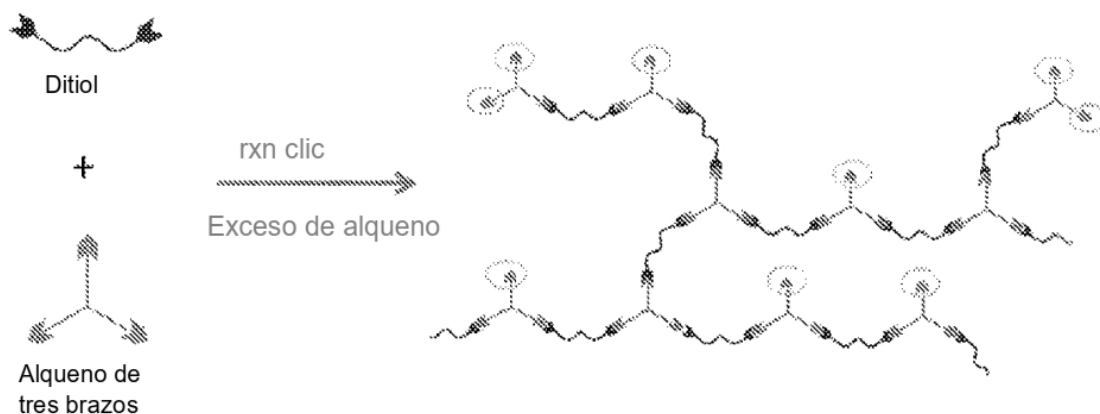
"Modo de unión-elución", como se usa en la presente descripción, se refiere a un enfoque operativo para la cromatografía en el que las condiciones del tampón se establecen de manera que tanto la proteína objetivo como los contaminantes no deseados se unan al soporte cromatográfico o al material compuesto. El fraccionamiento de la proteína objetivo de los otros componentes se logra subsecuentemente mediante el cambio de las condiciones de manera que la proteína objetivo y los contaminantes se eluyan por separado. En ciertas modalidades, las membranas descritas en la presente descripción pueden usarse en "modo de unión-elución" que presenta altas capacidades de unión dinámica a alta conductividad, alto procesamiento de volumen y selectividad. En ciertas modalidades, la cantidad de proteína objetivo en el eluyente se reduce en de aproximadamente 50 % a aproximadamente 99 %. En ciertas modalidades, el eluyente se reduce en agregados de la proteína objetivo en aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 %.

Como se usa en la presente descripción, el término "modo de flujo continuo" se refiere a un enfoque operativo para la cromatografía en el que las condiciones del tampón se establecen de manera que la proteína objetivo intacta fluya a través de la membrana tras la aplicación mientras los contaminantes se retienen selectivamente. En ciertas modalidades, las membranas descritas en la presente descripción pueden usarse en "modo de flujo continuo" en un proceso de purificación posterior a la proteína A para eliminar contaminantes clave, tales como ADN, proteínas de la célula huésped (HCP), proteína A lixiviada, agregados indeseables, y virus en una sola etapa.

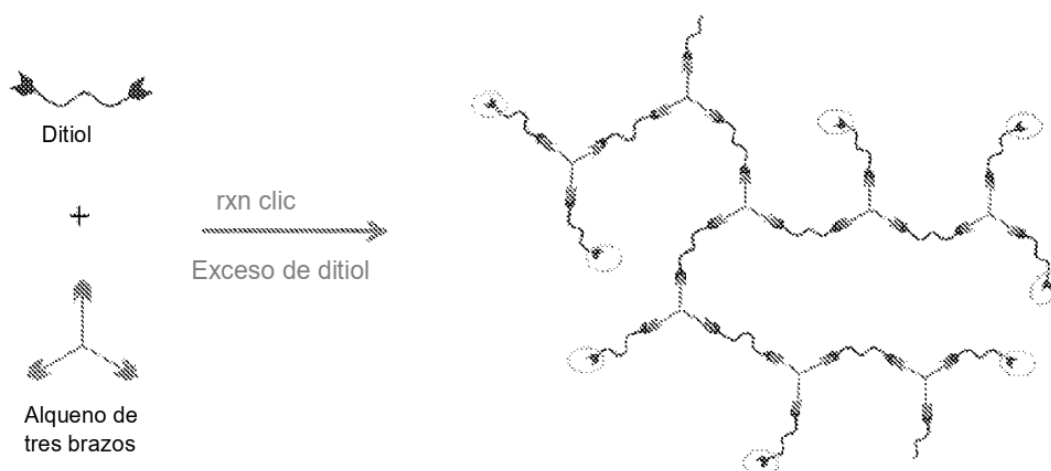
Diversas características de los materiales compuestos ilustrativos

Composición de los geles

En cierta modalidad, los polímeros reticulados pueden formarse por la reacción entre un monómero de ditiol y un monómero de trivinilo o monómero de alquino, que sirven como reticuladores. Ver Esquema 1A y Esquema 1B. En ciertas modalidades, pueden añadirse monómeros adicionales para ajustar las propiedades químicas, físicas, y mecánicas finales del polímero. En ciertas modalidades, los polímeros reticulados pueden formarse por la reacción entre un monómero de dieno y un monómero de tri-tiol, que sirve como un reticulador.

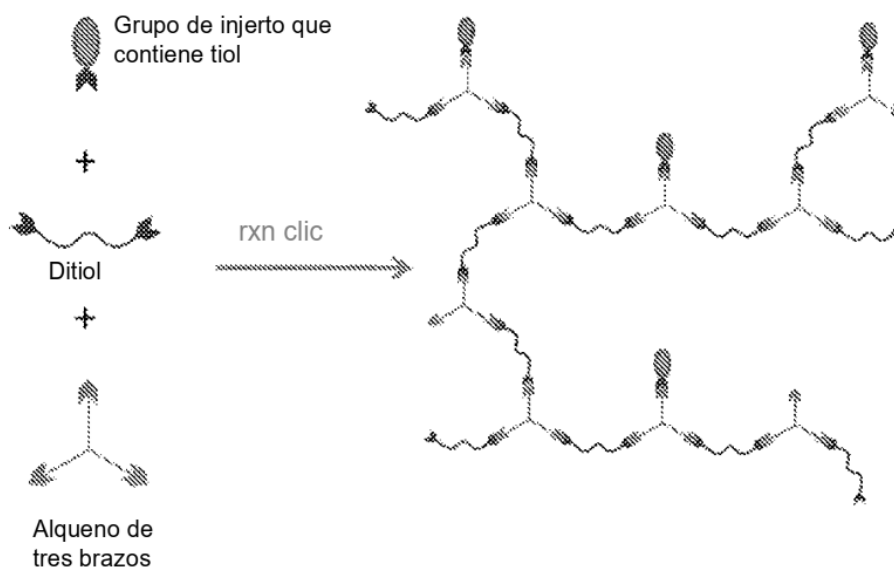


Esquema 1A – Red de polímero producida por la reacción clic de tiol-eno que contiene grupos funcionales "clicqueables" adicionales (alqueno).



Esquema 1B – Red de polímero producida por la reacción clic de tior-eno que contiene grupos funcionales "clicables" adicionales (tiol).

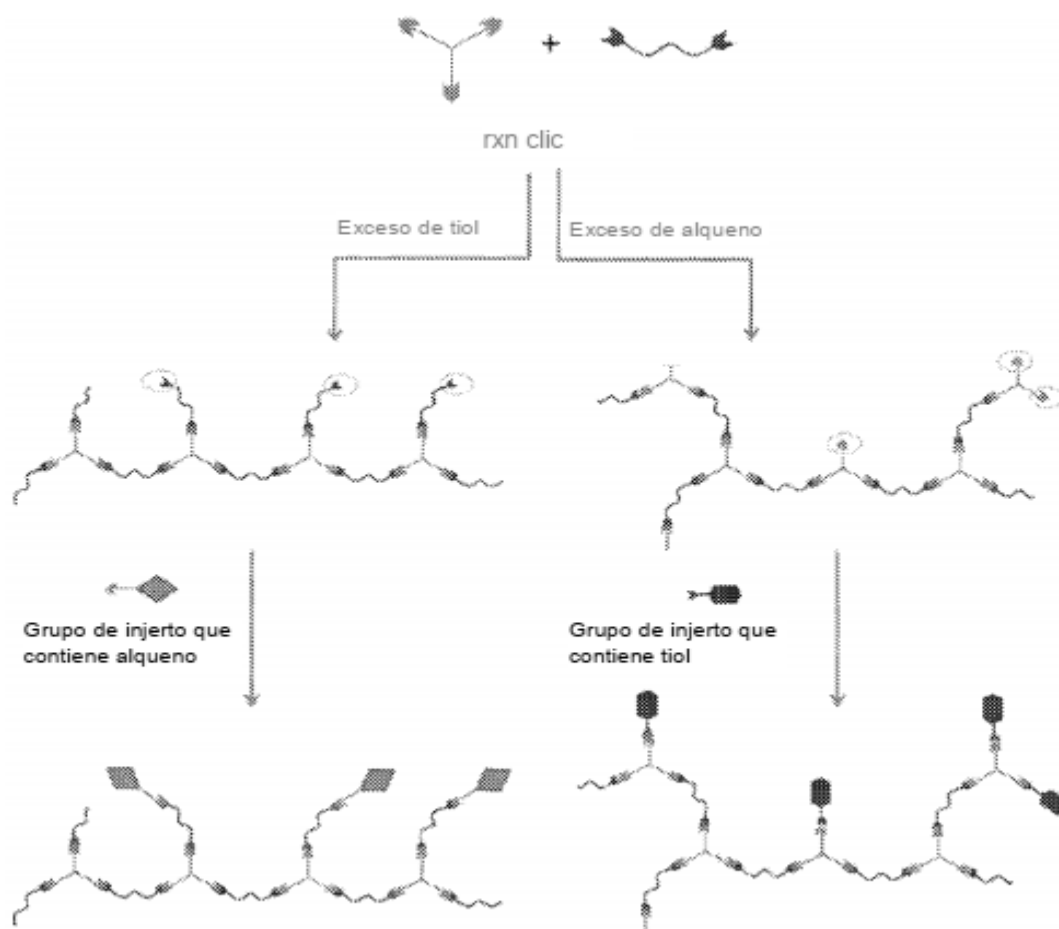
En ciertas modalidades, los polímeros reticulados pueden funcionalizarse adicionalmente mediante el injerto de las cadenas reticuladas con un resto de injerto. En ciertas modalidades, el resto de injerto es un tiol o un alqueno que también tiene funcionalidades químicas adicionales. En ciertas modalidades, el polímero reticulado se forma y se injerta en una sola etapa (enfoque de "un recipiente", Esquema 2). Por ejemplo, la inclusión de ácido mercaptosuccínico en la mezcla de polimerización dará como resultado un polímero con funcionalidad de ácido carboxílico. La inclusión de cisteamina (o alternativamente alilamina) dará como resultado un polímero con funcionalidad de amina. El uso de ácido mercaptoetanosulfónico (o alternativamente alilsulfonato de sodio) incorporará grupos de ácido sulfónico y cargas negativas a la red de polímeros.



Esquema 2 – Esquema de reacción en un recipiente mediante el uso de química clic de tior-eno para producir la red de polímero y las moléculas o grupos funcionales injertados

En ciertas modalidades, el polímero reticulado puede funcionalizarse mediante modificación posterior a la polimerización. En este método de dos etapas, el exceso de grupos tiol o alqueno generados durante la polimerización de tior-alqueno se modifica durante una etapa de injerto separada (Esquema 3). Al controlar la relación de alimentación de monómero de tiol respecto a alqueno, los polímeros finales pueden tener un exceso de grupos alqueno o tiol. Cualquier grupo funcional puede usarse subsecuentemente en una reacción de injerto, tal como una reacción clic, para modificar aún más la química o funcionalidad final del polímero. En ciertas modalidades, este enfoque es útil para fabricar membranas poliméricas que contengan varios ligandos útiles para la separación cromatográfica de biomoléculas (por ejemplo, proteínas). Por ejemplo, este enfoque puede usarse para introducir en la membrana funcionalidades de intercambio iónico (carboxilato, sulfonato, amonio cuaternario, amina), restos de interacción hidrófobos (tales como el grupo octilo mediante el uso de 1-octanotiol

o 1-octeno) y biomoléculas para de cromatografía de bioafinidad (tal como la cisteína-proteína A para la purificación de anticuerpos monoclonales).



Esquema 3 – Método de producción de dos etapas para producir polímeros clic de tior-eno injertados

En ciertas modalidades, el injerto de tior-eno es una opción atractiva para unir biomoléculas al polímero reticulado de la membrana. La reacción es rápida, puede llevarse a cabo eficientemente en medios acuosos, funciona bien a temperatura ambiente, y puede fotoiniciarse mediante el uso de una luz de longitud de onda relativamente larga (365 nm), que tiene un efecto muy limitado sobre la bioactividad de la proteína. Además, puede permitir la unión controlada de la biomolécula, lo que puede ser ventajoso en términos de preservar la bioactividad y la estructura 3D de la biomolécula.

En ciertas modalidades, es posible inmovilizar sobre los materiales compuestos descritos en la presente descripción cualquier biomolécula que tenga funcionalidad tior libre. Esto puede ser muy útil en la fabricación de membranas de bioafinidad para membranas de bioseparación o biocatálisis (mediante la inmovilización de enzima(s)). En ciertas modalidades, los materiales compuestos pueden funcionalizarse con sondas de oligonucleótidos para la detección de ADN.

Miembro de soporte poroso

En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso contiene poros de diámetro promedio de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ .

En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

En ciertas modalidades, el soporte poroso es plano.

En ciertas modalidades, el soporte poroso tiene forma de disco.

Pueden usarse muchos sustratos o membranas porosas como el miembro de soporte. En algunas modalidades, el miembro de soporte poroso se fabrica de 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 solvente. 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 nailon, membranas de ésteres de celulosa, fibra de vidrio, 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  $\mu\text{m}$ . 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. El miembro de soporte poroso puede tomar varias formas y tamaños.

En algunas modalidades, el miembro de soporte tiene la forma de una membrana.

En algunas modalidades, el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .

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 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 y el miembro de soporte

El gel puede anclarse 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 mantenerse por la restricción física impuesta al enredarlo y entrelazarlo con elementos estructurales del miembro de soporte, sin que realmente se injerte químicamente en el miembro de soporte, aunque en algunas modalidades, el gel puede injertarse en la superficie de los poros del miembro de soporte.

De acuerdo con la invención, los geles reticulados son macroporosos. Por tanto, 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, 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, solvente de reacción, y porógeno, si se usa. Las propiedades del material compuesto están determinadas parcialmente, si no completamente, por las propiedades del gel. 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.

Cuando están presentes, 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 en general 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.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es relativamente no tóxico.

Preparación de materiales compuestos

En ciertas modalidades, los materiales compuestos de la invención pueden prepararse mediante métodos de una sola etapa. En ciertas modalidades, estos métodos pueden usar agua u otros solventes beneficiosos para el medio ambiente como solvente de reacción. En ciertas modalidades, los métodos pueden ser rápidos y, por lo tanto, pueden conducir a

procesos de fabricación simples y/o rápidos. En ciertas modalidades, la preparación de los materiales compuestos puede ser económica.

5 En ciertas modalidades, los materiales compuestos pueden prepararse mediante la mezcla de un monómero o monómeros, un agente o agentes de reticulación, un iniciador o iniciadores, y opcionalmente uno o más porógenos, en uno o más solventes 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.

10 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 puede seleccionarse del grupo que consiste en solventes pobres termodinámicamente y polímeros extraíbles, (por ejemplo, poli(etilenglicol), surfactantes, y sales.

15 En algunas 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 exposición a radiación UV. En ciertas modalidades, la reacción puede iniciarse mediante radiación UV en presencia de un fotoiniciador. En ciertas modalidades, el fotoiniciador puede seleccionarse del grupo que consiste en 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléico) (ACVA), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA),  
20 benzofenona, benzoína y éteres de benzoína, tales como etil éter de benzoína y éter metílico de benzoína, dialcoxiacetofenonas, hidroxialquilfenonas, y ésteres sulfónicos de  $\alpha$ -hidroximetil benzoína. La activación térmica puede requerir la adición de un iniciador térmico. En ciertas modalidades, el iniciador térmico puede seleccionarse 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.

25 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  
30 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 puede 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,  
35 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 velocidad 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  
40 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 velocidad de polimerización.

En ciertas modalidades, una vez que se preparan los materiales compuestos, estos pueden lavarse con varios solventes para eliminar cualquiera de los componentes sin reaccionar y cualquier polímero u oligómero que no esté anclado dentro  
45 del soporte. En ciertas modalidades, los solventes adecuados para el lavado del material compuesto incluyen agua, solución acuosa ácida (por ejemplo, HCl) o básica (por ejemplo, NaOH), soluciones salinas acuosas (por ejemplo, NaCl), acetona, metanol, etanol, propanol, y DMF.

50 Usos ilustrativos de los materiales compuestos

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, en donde se pasa un fluido a través del gel reticulado de cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente. Al adaptar las condiciones de unión o  
55 fraccionamiento, puede obtenerse una buena selectividad.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para separar biomoléculas, tales como proteínas o inmunoglobulinas, de la solución. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para purificar biomoléculas, tales como proteínas o inmunoglobulinas. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para purificar  
60 proteínas o anticuerpos monoclonales con alta selectividad. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, en donde la molécula biológica o el ion biológico retiene su estructura terciaria o cuaternaria, que puede ser importante para retener la actividad biológica. En ciertas modalidades, las moléculas biológicas o iones biológicos que pueden separarse o purificarse incluyen proteínas, tales como albúminas, por ejemplo, albúmina de suero bovino, y lisozima. En ciertas modalidades, las moléculas biológicas o iones biológicos que pueden separarse incluyen  $\gamma$ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas tales como IgG, IgM, o IgE de origen humano y animal, proteínas de origen  
65 recombinante y natural que incluyen proteína A, fitocromo, proteasa halofílica, poli(3-hidroxibutirato) despolimerasa, aculaecina-A acilasa, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas tales como fosfatasa,

deshidrogenasa, ribonucleasa A, etc., anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, tripsina y su inhibidor, albúminas de diferentes orígenes, por ejemplo,  $\alpha$ -lactalbúmina, albúmina de suero humano, albúmina de huevo de gallina, ovoalbúmina, etc., citocromo C, inmunoglobulinas, mioglobulina, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, productos derivados de ácido nucleico, ADN y ARN de origen sintético y natural, plásmidos de ADN, lectina,  $\alpha$ -quimotripsinógeno, y productos naturales que incluyen moléculas pequeñas. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para recuperar un fragmento de anticuerpo a partir de variantes, impurezas, o contaminantes asociados con este. En ciertas modalidades, la separación o purificación de biomoléculas puede ocurrir sustancialmente en el gel reticulado. En ciertas modalidades, la separación o purificación de biomoléculas puede ocurrir sustancialmente en los macroporos del gel reticulado, cuando el gel reticulado tiene macroporos.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de adsorción reversible de una sustancia. En ciertas modalidades, puede liberarse una sustancia adsorbida mediante el cambio del líquido que fluye a través del gel. En ciertas modalidades, la captación y liberación de sustancias pueden controlarse mediante variaciones en la composición del gel reticulado.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, en donde la sustancia puede aplicarse al material compuesto a partir de una solución tamponada.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, en donde la sustancia puede eluirse mediante el uso de concentraciones y pH variables de soluciones salinas acuosas.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método que exhibe altas capacidades de unión. En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método que exhibe capacidades de unión de aproximadamente 1 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 2 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 3 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 4 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 5 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 6 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 7 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 8 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 9 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 10 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 12 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 14 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 16 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 18 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 20 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 30 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 40 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 50 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 60 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 70 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 80 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 90 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 100 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 110 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 120 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 130 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 140 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 150 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 160 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 170 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 180 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 190 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 200 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 210 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 220 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 230 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 240 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 250 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 260 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 270 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 280 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 290 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 300 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 320 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 340 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 360 mg/mL<sub>membrana</sub>, aproximadamente 380 mg/mL<sub>membrana</sub>, o aproximadamente 400 mg/mL<sub>membrana</sub> al 10 % de avance.

El flujo de agua,  $Q_{H_2O}$  (kg/m<sup>2</sup>h), se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$Q_{H_2O} = \frac{(m_1 - m_2)}{A \cdot t}$$

dónde  $m_1$  es la masa de agua transferida a través de la membrana en  $t_1$ ,  $m_2$  es la masa de agua transferida a través de la membrana en  $t_2$ ,  $A$  es el área de la sección transversal de la membrana y  $t$  es el tiempo (donde  $t_1 > t_2$ ).

En ciertas modalidades, puede añadirse un aditivo a la solución de sal eluyente (el segundo fluido, o el tercer fluido o posterior). En ciertas modalidades, el aditivo se añade en una concentración baja (por ejemplo, menos de aproximadamente 2 M, aproximadamente 1 M, aproximadamente 0,5 M, o aproximadamente 0,2 M). En ciertas modalidades, el aditivo es un alcohol miscible con agua, un detergente, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, o una solución acuosa de una sal caotrópica.

En ciertas modalidades, cambiar el pH es una herramienta de elución efectiva para la elución de proteínas con o sin cambiar la conductividad de la fase móvil.

Determinación del tamaño de poro

SEM y ESEM

Como se mencionó anteriormente, en ciertas modalidades, el gel reticulado es un gel reticulado macroporoso. 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:

| <b>Humedad relativa a 10 torr (%)</b> | <b>T (°C)</b>       |
|---------------------------------------|---------------------|
| 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.

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.

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.

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.

5 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.

10 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.

15 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 el régimen 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:

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

25 D = diámetro de poro  
 $\gamma$  = tensión superficial del líquido  
 $\theta$  = ángulo de contacto del líquido  
P = presión de gas diferencial

30 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.

35 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.

40 Este método puede realizarse en pequeñas muestras de membrana (por ejemplo, de 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

50 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), permporometría (página 179) y desplazamiento de líquidos (página 181).

55 Materiales compuestos ilustrativos

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

60 En ciertas modalidades, la invención se refiere a un material compuesto que comprende:  
un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y  
un gel reticulado, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de un primer monómero, un segundo monómero, y un primer reticulador;  
en donde  
el gel reticulado se encuentra en los poros del miembro de soporte;  
65 el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol;  
el segundo monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono; y

el primer reticulador comprende (i) al menos tres grupos funcionales tiol, (ii) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (iii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iv) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.

5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado es macroporoso.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol terminales.

10

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

15

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero es 2,2'-(etilendioxi)dietanotiol (EDDET), 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol, PEG ditiol (tal como PEG lineal ditiol), 1,6-hexanoditiol, 2,2'-tiodietanotiol, etano-1,2-diil bis(3-mercaptopropanoato), hexa(etilenglicol) ditiol, tetra(etilenglicol) ditiol, 1,16-hexadecanoditiol, benceno-1,2-ditiol, benceno-1,3-ditiol, benceno-1,4-ditiol, bifenil-4,4'-ditiol, *p*-terfenil-4,4"-ditiol, clorhidrato de (*S*)-2-aminobutano-1,4-ditiol, 4-fenil-4H-(1,2,4)triazol-3,5-ditiol, 5-(4-clorofenil)-pirimidina-4,6-ditiol, 1,4-bencenodimetanotiol, 2-mercaptoetil éter, o L-(-)-ditiotreitil.

20

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono terminales.

25

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo monómero es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

30

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo monómero es tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV), 1,9-decadieno, 1,4-bis(viniloxi)butano, dialilftalato, dialil diglicol carbonato, poli(etilenglicol) divinil éter, divinil glicol, o divinilbenceno, divinil sulfona, 1,4-butanodiol divinil éter, alil éter, alil sulfuro, 1,4-bis(4-vinilfenoxi)butano, 1,5-hexadieno, dipenteno, (*R*)-(+)-limoneno, (*S*)-(-)-limoneno, N,N'-metilenbis(acrilamida), o N,N'-etilenbis(acrilamida).

35

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la relación molar de primer monómero respecto al segundo monómero es mayor que 1:1, por ejemplo, aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 2,5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 3,5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 4,5:1, o aproximadamente 5:1.

40

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende además un tercer monómero, en donde el tercer monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el tercer monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono terminales.

45

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el tercer monómero es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

50

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el tercer monómero es (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DATA), dialil disulfuro, dialil carbonato, dialil maleato, dialil succinato, trimetilolpropano dialil éter, 1,1-dialil-1-docosanól, 1,1-dialil-3-(1-naftil)urea, 1,1-dialil-3-(2-etilfenil)urea, 1,2-dialil-1,2-ciclohexanodiol, 2,6-dialil-meta-cresol, *N,N'*-dialil-2-hidroxiopropanamida, 1,4-pentadien-3-ol, trimetil(propargil)silano, o propargilamina.

55

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la relación molar de primer monómero respecto al tercer monómero es mayor que 1:1, por ejemplo, aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 2,5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 3,5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 4,5:1, o aproximadamente 5:1.

60

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador comprende al menos tres dobles enlaces carbono-carbono.

65

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador comprende tres dobles enlaces carbono-carbono. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador comprende tres dobles enlaces carbono-carbono terminales.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono terminales.

5

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

10

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador es 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO), 1,6-heptadiino, 1,7-octadiino, 1,8-nonadiino, 1,9-decadiino, acrilato de propargilo, PEG norborneno de 4 brazos (Fairbanks, B. D., y otros Adv. Mater. 2009, 21 (48), 5005-5010), triacrilato de trimetilolpropano, tetraalquino poli(etilenglicol) (por ejemplo, Daniele, M.A. y otros Biomaterials 2014, 35, 1845-1856), 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina, trialilamina, trialil borato, trialilfosfina, dialil fumarato, 3-(aliloxi)-1-propino, glioxal bis(dialil acetal), tetraalilsilano, propargil éter, o escualeno.

15

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador es trimetilolpropanotri(3-mercaptopropionato), pentaeritritol tetra(3-mercaptopropionato), poli(etilenglicol) tetra-tiol (por ejemplo, Daniele, M.A., y otros Biomaterials 2014, 35, 1845-1856), tris[2(3-mercaptopropioniloxi)etil]isocianurato, pentaeritritol tetraquis(2-mercaptoacetato), ácido tritiocianúrico, o 1-tiohexitol.

20

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende además un segundo reticulador; y el segundo reticulador comprende (i) al menos tres grupos funcionales tiol, (ii) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (iii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iv) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.

25

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo reticulador comprende al menos dos triples enlaces carbono-carbono.

30

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono terminales.

35

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo reticulador es diferente del primer reticulador.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo reticulador es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

40

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el segundo reticulador es 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO), 1,6-heptadiino, 1,7-octadiino, 1,8-nonadiino, 1,9-decadiino, acrilato de propargilo, 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina, trialilamina, trialil borato, trialilfosfina, dialil fumarato, 3-(aliloxi)-1-propino, dipropargilamina, 5,6-dimetil-5-decen-1,9-diino, glioxal bis(dialil acetal), tetraalilsilano, propargil éter, escualeno, trimetilolpropanotri(3-mercaptopropionato), pentaeritritol tetra(3-mercaptopropionato), poli(etilenglicol) tetra-tiol, tris[2(3-mercaptopropioniloxi)etil]isocianurato, ácido pentaeritritol tetraquis(2-mercaptoacetato) tritiocianúrico, o 1-tiohexitol.

45

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un material compuesto que comprende:  
un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y  
un gel reticulado, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de un primer monómero y un primer reticulador;  
en donde  
el gel reticulado se encuentra en los poros del miembro de soporte;  
el primer monómero comprende (i) dos dobles enlaces carbono-carbono, o (ii) un triple enlace carbono-carbono; y  
el primer reticulador comprende al menos tres grupos funcionales tiol.

55

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado es macroporoso.

60

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono terminales.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

65

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero es tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV), 1,9-decadieno, 1,4-bis(vinilo)butano, dialilftalato, dialil diglicol carbonato, poli(etilenglicol) divinil éter, divinil glicol, o divinilbenceno, divinil sulfona, 1,4-butanodiol divinil éter, alil éter, alil sulfuro, 1,4-bis(4-vinilfenoxi)butano, 1,5-hexadieno, dipenteno, (*R*)-(+)-limoneno, o (*S*)-(-)-limoneno.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la relación molar de primer monómero respecto al segundo monómero es mayor que 1:1, por ejemplo, aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 2,5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 3,5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 4,5:1, o aproximadamente 5:1.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador es trimetilolpropanotri(3-mercaptopropionato), pentaeritritol tetra(3-mercaptopropionato), poli(etilenglicol) tetra-tiol (por ejemplo, Daniele, M.A., y otros Biomaterials 2014, 35, 1845-1856), tris[2(3-mercaptopropionilo)etil]isocianurato, pentaeritritol tetraquis(2-mercptoacetato), ácido tritocianúrico, o 1-tiohexitol.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende además una pluralidad de grupos terminales injertados. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los grupos terminales injertados se derivan de una molécula que tiene un grupo funcional tiol o una molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los grupos terminales injertados se derivan de una molécula que tiene un grupo funcional tiol o una molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado; y la molécula que tiene un grupo funcional tiol o la molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado tiene un log P de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8,0. En ciertas modalidades, los materiales compuestos que tienen grupos terminales injertados hidrófobos son útiles para la cromatografía de interacción hidrófoba.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde la molécula que tiene un grupo funcional tiol y la molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado son sustancialmente solubles en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los grupos terminales injertados se derivan de una molécula que tiene un grupo funcional tiol; y la molécula que tiene un grupo funcional tiol es ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 1-mercaptosuccínico, un péptido que tiene un residuo de cisteína, una proteína que tiene un residuo de cisteína (ya sea un residuo de cisteína de origen natural o un residuo de cisteína modificado genéticamente, por ejemplo, proteína A), cisteamina, 1-tiohexitol, poli(etilenglicol) 2-ácido mercaptoetil éter acético, poli(etilenglicol) metil éter tiol, 1-tioglicerol, 2-naftalenotiol, bifenil-4-tiol, 3-amino-1,2,4-triazol-5-tiol, 5-(trifluorometil)piridin-2-tiol, 1-[2-(dimetilamin)etil]-1H-tetrazol-5-tiol, 1-propanotiol, 1-butanotiol, 1-pentanotiol, 1-hexanotiol, 1-octanotiol, clorhidrato de 8-amino-1-octanotiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoro-1-octanotiol, 8-mercpto-1-octanol, o  $\gamma$ -Glu-Cys.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde los grupos terminales injertados se derivan de una molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado; y la molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado es 1-octeno, 1-hexeno, 4-bromo-1-buteno, alildifenilfosfina, alilamina, alcohol alílico, 3,4-dihidroxi-1-buteno, 7-octeno-1,2-diol, 3-alilo-1,2-propanodiol, ácido 3-butenico, 3,4-deshidro-L-prolina, laurato de vinilo, 1-vinil-2-pirrolidinona, cinamato de vinilo, una acilamida, o un acrilato.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el gel reticulado comprende macroporos; y los macroporos tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 3000 nm. En ciertas modalidades, el diámetro de los macroporos se estima mediante una de las técnicas descritas en la presente descripción. En ciertas modalidades, el diámetro de los macroporos se calcula mediante porometría de flujo capilar.

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 1500 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 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, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 200 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 300 nm,

aproximadamente 350 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 450 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 650 nm, o aproximadamente 700 nm.

5 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 300 nm a aproximadamente 400 nm.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es una membrana.

10 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.

15 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 grosor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ ; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . En ciertas modalidades, el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ . En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte tiene un grosor de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ .

30 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  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 6  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 9  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 11  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 13  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 14  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ .

40 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 %.

45 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 %.

50 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.

55 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 grosor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2000  $\mu\text{m}$ ; los poros del miembro de soporte tienen un diámetro promedio de poro de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ ; y el miembro de soporte tiene una porosidad en volumen de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %.

60

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto tiene un ángulo de contacto con el agua de aproximadamente 50° a aproximadamente 120°.

65 Métodos de uso ilustrativos

- En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende la etapa de: poner en contacto a un primer régimen de flujo un primer fluido que comprende una sustancia con cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, con lo que se adsorbe o absorbe de esta manera una porción de la sustancia sobre el material compuesto.
- 5 En ciertas modalidades, el primer fluido comprende además un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina, o un virus.
- 10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente perpendicular a los macroporos del material compuesto.
- 15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de:  
poner en contacto a un segundo régimen de flujo un segundo fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, para liberar de esta manera una primera porción de la sustancia del material compuesto.
- 20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la ruta del flujo de fluido del segundo fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del segundo fluido es sustancialmente perpendicular a los macroporos del material compuesto.
- 25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de:  
poner en contacto a un tercer régimen de flujo un tercer fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, lo que libera de esta manera una segunda porción de la sustancia del material compuesto.
- 30 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sustancia es una molécula biológica, ion biológico, virus, o partícula biológica.
- 35 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sustancia es una molécula biológica o ion biológico seleccionado del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células,  $\gamma$ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen humano y animal, proteínas de origen recombinante y natural, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobina, mioglobulina,  $\alpha$ -quimotripsinógeno, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético y natural, y ARN de origen sintético y natural.
- 40 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o ion biológico es lisozima, hlgG, mioglobina, albúmina de suero humano, inhibidor de la tripsina de soja, transferrina, enolasa, ovoalbúmina, ribonucleasa, inhibidor de la tripsina de huevo, citocromo c, anexina V, o  $\alpha$ -quimotripsinógeno.
- 45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido es un tampón. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración del tampón en el primer fluido es aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,11 M, aproximadamente 0,12 M, aproximadamente 0,13 M, aproximadamente 0,14 M, aproximadamente 0,15 M, aproximadamente 0,16 M, aproximadamente 0,17 M, aproximadamente 0,18 M, aproximadamente 0,19 M o aproximadamente 0,2 M. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del primer fluido es de aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, o aproximadamente 9.
- 50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende fosfato de sodio.
- 60 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido comprende una sal. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados
- 65

- anteriormente, en donde la concentración de la sal en el primer fluido es de aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,11 M, aproximadamente 0,12 M, aproximadamente 0,13 M, aproximadamente 0,14 M, aproximadamente 0,15 M, aproximadamente 0,16 M, aproximadamente 0,17 M, aproximadamente 0,18 M, aproximadamente 0,19 M, aproximadamente 0,2 M, aproximadamente 0,25 M, o aproximadamente 0,3 M. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sal es cloruro de sodio.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sustancia en el primer fluido es de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la concentración de la sustancia en el primer fluido es de aproximadamente 0,2 mg/mL, aproximadamente 0,3 mg/mL, aproximadamente 0,4 mg/mL, aproximadamente 0,5 mg/mL, aproximadamente 0,6 mg/mL, aproximadamente 0,7 mg/mL, aproximadamente 0,8 mg/mL, aproximadamente 0,9 mg/mL, aproximadamente 1 mg/mL, aproximadamente 1,2 mg/mL, aproximadamente 1,4 mg/mL, aproximadamente 1,6 mg/mL, aproximadamente 1,8 mg/mL, aproximadamente 2 mg/mL, aproximadamente 3 mg/mL, aproximadamente 4 mg/mL, aproximadamente 5 mg/mL, aproximadamente 6 mg/mL, aproximadamente 7 mg/mL, aproximadamente 8 mg/mL, aproximadamente 9 mg/mL, o aproximadamente 10 mg/mL.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 3 volúmenes de membrana (MV)/min a aproximadamente 70 MV/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 5 MV/min a aproximadamente 30 MV/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 10 MV/min a aproximadamente 20 MV/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 10 MV/min, aproximadamente 11 MV/min, aproximadamente 12 MV/min, aproximadamente 13 MV/min, aproximadamente 14 MV/min, aproximadamente 15 MV/min, aproximadamente 16 MV/min, aproximadamente 17 MV/min, aproximadamente 18 MV/min, aproximadamente 19 MV/min, o aproximadamente 20 MV/min.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 50 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 25 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 10 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 1 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 0,5 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 100 mL/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 10 mL/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 0,5 mL/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min, aproximadamente 0,6 mL/min, aproximadamente 0,7 mL/min, aproximadamente 0,8 mL/min, aproximadamente 0,9 mL/min, aproximadamente 1 mL/min, aproximadamente 1,1 mL/min, aproximadamente 1,2 mL/min, aproximadamente 1,3 mL/min, aproximadamente 1,4 mL/min, aproximadamente 1,5 mL/min, aproximadamente 1,6 mL/min, aproximadamente 1,7 mL/min, o aproximadamente 1,8 mL/min.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido es un tampón. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende glicina-HCl o citrato de sodio. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende glicina-HCl o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 2 M. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo fluido comprende glicina-HCl o citrato de sodio en aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, 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 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 400 mM.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del segundo fluido es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH del segundo fluido es aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3,

- aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,8, aproximadamente 4, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,8, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 3 volúmenes de membrana (MV)/min a aproximadamente 70 MV/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 5 MV/min a aproximadamente 30 MV/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 10 MV/min a aproximadamente 20 MV/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 10 MV/min, aproximadamente 11 MV/min, aproximadamente 12 MV/min, aproximadamente 13 MV/min, aproximadamente 14 MV/min, aproximadamente 15 MV/min, aproximadamente 16 MV/min, aproximadamente 17 MV/min, aproximadamente 18 MV/min, aproximadamente 19 MV/min, o aproximadamente 20 MV/min.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 50 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 25 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 10 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 1 L/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 0,5 L/min.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 100 mL/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 10 mL/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 2 mL/min. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo régimen de flujo es de aproximadamente 0,5 mL/min, aproximadamente 0,6 mL/min, aproximadamente 0,7 mL/min, aproximadamente 0,8 mL/min, aproximadamente 0,9 mL/min, aproximadamente 1 mL/min, aproximadamente 1,1 mL/min, aproximadamente 1,2 mL/min, aproximadamente 1,3 mL/min, aproximadamente 1,4 mL/min, aproximadamente 1,5 mL/min, aproximadamente 1,6 mL/min, aproximadamente 1,7 mL/min, o aproximadamente 1,8 mL/min.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además las etapas de:  
limpiar el material compuesto; y  
repetir las etapas mencionadas anteriormente.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto se limpia con una solución básica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto se limpia con un cuarto fluido; y el cuarto fluido comprende hidróxido de sodio.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde sustancialmente la totalidad de la sustancia se adsorbe o absorbe en el material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método, que comprende la etapa de:  
poner en contacto a un primer régimen de flujo un primer fluido que comprende una sustancia y un material no deseado con cualquiera de los materiales compuestos mencionados anteriormente, con lo que se adsorbe o absorbe de esta manera una porción del material no deseado sobre el material compuesto.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material no deseado comprende un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina, o un virus.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde sustancialmente la totalidad del material no deseado se adsorbe o absorbe en el material compuesto.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es sustancialmente a través de los macroporos del material compuesto.

5 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la sustancia es una molécula biológica o ion biológico.

10 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o ion biológico se selecciona del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células,  $\gamma$ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen humano y animal, proteínas de origen recombinante o natural, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobina, mioglobulina,  $\alpha$ -quimotripsinógeno, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético y natural, y ARN de origen sintético y natural.

15 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la molécula biológica o ion biológico es lisozima, hIgG, mioglobina, albúmina de suero humano, inhibidor de la tripsina de soja, transferrina, enolasa, ovoalbúmina, ribonucleasa, inhibidor de la tripsina de huevo, citocromo c, anexina V, o  $\alpha$ -quimotripsinógeno.

20 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer fluido es un sobrenadante de cultivo celular clarificado.

#### Métodos de fabricación ilustrativos

25 En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para fabricar un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 11.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método para fabricar un material compuesto, que comprende las etapas de:

30 combinar un primer monómero, un segundo monómero, un primer reticulador, un fotoiniciador, y un primer solvente, formando de esta manera una mezcla monomérica; en donde el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol; el segundo monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono; y el primer reticulador comprende (i) al menos tres grupos funcionales tiol, (ii) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (iii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iv) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono;

35 poner en contacto un miembro de soporte con la mezcla monomérica, formando de esta manera un miembro de soporte modificado; en donde el miembro de soporte comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte, y el diámetro promedio de poro de los poros es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ ;

40 recubrir el miembro de soporte modificado con una lámina polimérica, formando de esta manera un miembro de soporte recubierto; y

irradiar el miembro de soporte recubierto por un período de tiempo, formando de esta manera un material compuesto.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de lavar el material compuesto con un segundo solvente, formando de esta manera un material compuesto lavado. En ciertas modalidades, el segundo solvente es agua.

45 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además la etapa de eliminar cualquier exceso de mezcla monomérica del miembro de soporte recubierto.

50 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto es cualquiera de los materiales compuesto mencionados anteriormente.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la mezcla monomérica comprende además una pluralidad de precursores de grupos terminales; y los precursores de grupos terminales son moléculas que tienen un grupo funcional tiol o moléculas que tienen un enlace carbono-carbono insaturado.

55 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además las etapas de:

60 poner en contacto el material compuesto con una mezcla que comprende un fotoiniciador y una pluralidad de precursores de grupos finales, formando de esta manera una mezcla de injerto; en donde los precursores de grupos finales son moléculas que tienen un grupo funcional tiol o moléculas que tienen un enlace carbono-carbono insaturado; e irradiar la mezcla de injerto por un período de tiempo, formando de esta manera un material compuesto modificado.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el precursor del grupo final tiene un log P de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8,0.

65 En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el precursor del grupo final es sustancialmente soluble en DMAc o DPMA, o una mezcla de estos.

- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el precursor del grupo final es una molécula que tiene un grupo funcional tiol; y la molécula que tiene un grupo funcional tiol es ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 1-mercaptosuccínico, un péptido que tiene un residuo de cisteína, una proteína que tiene un residuo de cisteína, cisteamina, 1-tiohexitol, poli(etilenglicol) 2-ácido mercaptoetil éter acético, poli(etilenglicol) metil éter tiol, 1-tioglicerol, 2-naftalenotiol, bifenil-4-tiol, 3-amino-1,2,4-triazol-5-tiol, 5-(trifluorometil)piridin-2-tiol, 1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-tetrazol-5-tiol, 1-propanotiol, 1-butanotiol, 1-pentanotiol, 1-hexanotiol, 1-octanotiol, clorhidrato de 8-amino-1-octanotiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoro-1-octanotiol, 8-mercapto-1-octanol, o  $\gamma$ -Glu-Cys.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el precursor del grupo final se deriva de una molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado; y la molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado es 1-octeno, 1-hexeno, 4-bromo-1-butenol, alildifenilfosfina, alilamina, alcohol alílico, 3,4-dihidroxi-1-butenol, 7-octeno-1,2-diol, 3-aliloxi-1,2-propanodiol, ácido 3-butenolico, 3,4-deshidro-L-prolina, laurato de vinilo, 1-vinil-2-pirrolidinona, cinamato de vinilo, una acilamida, o un acrilato.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la relación de grupos tiol reactivos respecto a los grupos alqueno reactivos (donde un grupo alqueno es equivalente a dos grupos alqueno) en la mezcla monomérica es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 2:1, por ejemplo, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 2:1.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % en peso de la mezcla monomérica.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el segundo monómero está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % en peso de la mezcla monomérica.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer reticulador está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % en peso de la mezcla monomérica.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el fotoiniciador está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 % en peso de la mezcla monomérica.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el fotoiniciador es benzoína o un éter benzoínico, benzofenona, una dialcoxiacetofenona, 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, óxido de difenil(2,4,6-trimetilbenzoilo)fosfina, una hidroxialquilfenona, 1-hidroxi-ciclohexil-fenil-cetona, 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona, 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona, 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona, un éster sulfónico de  $\alpha$ -hidroximetil benzoína, 2-hidroxi-2-metilpropiofenona, acilfosfinato de litio o 2-metil-1-[4-(metiltio)fenil]-2-(4-morfolinil)-1-propanona, 4,4'-azobis(ácido 4-cianovalérico) (ACVA), o una mezcla de estos.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el primer solvente comprende *N,N*-dimetilacetamida (DMAc), ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol)metil éter (DPMA), agua, di(propilenglicol) dimetil éter (DPM), di(propilenglicol) propil éter (DPGPE), di(propilenglicol) metil éter (DPGME), tri(propilenglicol) butil éter (TPGBE), 3-metil-1,3-butanodiol, 3,3-dimetil-1,2-butanodiol, 3-metoxi-1-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, di(etilenglicol), tri(etilenglicol), tetra(etilenglicol), hexilenglicol, dodecilsulfato de sodio, o *N,N*-dimetilformamida (DMF), o una mezcla de estos.
- En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la *N,N*-dimetilacetamida (DMAc) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 70 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 50 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la *N, N'*-dimetilacetamida (DMAc) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 70 % en peso de los solventes totales. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde la *N,N*-dimetilacetamida (DMAc) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 50 % en peso de los solventes totales.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (Budiol) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 50 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (Budiol) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 50 % en peso del total solventes.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el acetato de di(propilenglicol)metil éter (DPMA) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 60 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el acetato de di(propilenglicol)metil éter (DPMA) está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 60 % en peso de los solventes totales.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agua está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 50 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agua está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 30 % en peso de la mezcla monomérica. En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el agua está presente en la mezcla monomérica en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 30 % en peso de los solventes totales.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el miembro de soporte recubierto se irradia a aproximadamente 350 nm.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el periodo de tiempo es de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente 1 hora.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el material compuesto comprende macroporos.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el diámetro promedio de poro de los macroporos es menor que el diámetro promedio de poro de los poros.

#### Ejemplificación

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

#### Materiales y métodos generales

##### Compuestos químicos:

2,2'-(etilendioxi)dietanotiol (EDDET), 1,4-ditioeritritol (DTT), pentaeritritol tetraquis(3-mercaptopropionato) (PETM), 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO), tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV), 1,7-octadiino (OctDi), (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DATA), 1-tioglicerol (TG), 1-octanotiol, *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol)metil éter (DPMA), etilenglicol (EG), dietilenglicol (DEG), trietilenglicol (TEG), tetraetilenglicol (TetEG), hexilenglicol, isopropanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959), 4,4'-azobis(ácido 4-cianovalérico) (ACVA), clorhidrato de cisteamina, 2-mercaptoetanol, ácido mercaptosuccínico, fosfato de sodio monobásico monohidrato, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, trihidratos de acetato de sodio, ácido acético glacial, gránulos de hidróxido de sodio, glicina, ácido cítrico, y D-(+)-trehalosa deshidratada se obtuvieron de Aldrich.

##### Proteínas:

rProteína A-cys se obtuvo de Biomedal SL (Sevilla, España). La inmunoglobulina policlonal IgG se obtuvo de Equitech-Bio Inc. (Kerrville, TX, EE. UU.).

##### Preparación de la membrana:

El(Los) reticulador(es) y los monómeros (excepto los monómeros funcionalizados con tiol, que se añadieron 10 min antes del moldeo) se añadieron con el fotoiniciador (Irgacure 2959) a una mezcla de solvente, y la mezcla se agitó el tiempo suficiente para disolver todos los componentes. Se colocó una lámina de sustrato de soporte poroso de 7" x 8" previamente

- pesada (malla de polipropileno no tejida) sobre una lámina de polietileno, después se vertieron -15 g de la solución de polímero en la lámina de sustrato. El sustrato impregnado se recubrió subsecuentemente con otra lámina de polietileno. La lámina se presionó suavemente con un movimiento circular a mano para eliminar el exceso de solución y cualquier burbuja de aire atrapada. El proceso de polimerización se inició al irradiar con luz UV (~350 nm) la solución de polímero/sustrato intercalado entre láminas de polietileno en una cámara cerrada por 10 min. La membrana resultante se retiró después de entre las láminas de polietileno y se sometió a ciclos de lavado extensos que implicaron periodos de remojo de 20-30 minutos en agua purificada (RO) (2-3 veces) con agitación. Las membranas limpias se secaron al colgarlas libremente en el aire a temperatura ambiente durante ~ 16 horas.
- 5 Ganancia de masa, humectación, y permeabilidad de membranas compuestas
- Se midió el peso de la membrana seca y se usó para calcular la ganancia de masa. La humectación de la membrana también se determinó mediante la distribución de una gota de 50 µL de agua destilada en la superficie de la membrana y mediante la medición del tiempo requerido para que la gota sea absorbida dentro de la membrana. Para estimar la permeabilidad de la membrana, se determinó el flujo de cada membrana mediante el uso de agua RO (o tampón de acetato pH 5) y una muestra de membrana de 7,7 cm de diámetro, mediante el uso de una presión aplicada de 100 kPa.
- 15 Para estimar la permeabilidad de la membrana, se determinó el flujo de agua RO (o tampón acetato 132 mM pH 5) como fase móvil a través de cada membrana. Las membranas se remojaron previamente en el fluido de prueba durante al menos 10 minutos antes de la prueba, se purgaron con ~300 mL de líquido de prueba, después se determinó la cantidad de líquido de prueba que pasa bajo una presión aplicada de 100 kPa a través de un cupón de membrana circular de 7,7 cm de diámetro (con 7,3 cm de diámetro real disponible). El flujo se expresa en la cantidad de líquido por área de superficie por tiempo (kg/m<sup>2</sup>h).
- 20 Imagen de estructura porosa:
- Para probar la estructura del gel y la porosidad, se usó microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) para obtener imágenes de la membrana en estado húmedo. Un pequeño cupón (~7x5 mm) se humedeció mediante la inmersión en agua destilada durante 10-15 minutos y después se examinó mediante el uso de un instrumento de ESEM (FEI Quanta FEG 250 ESEM). La muestra se colocó en una etapa de enfriamiento para ajustar la temperatura a 5 °C, y la imagen se examinó a un nivel de baja presión (4,5-5,5 torr) y 50-55 % de humedad relativa.
- 25 Para probar la estructura de la membrana en estado seco, se usó el microscopio electrónico de barrido Tescan Vega II LSU (SEM) (Tescan, PA, EE. UU.) para obtener imágenes de membranas recubiertas de oro con un voltaje establecido de 10-20 kV.
- 30 Mediciones del tamaño de poro:
- El tamaño de poro de la membrana (diámetro) se midió mediante el uso de un porómetro de flujo capilar CFP-1500-AE (Porous Materials Inc., Ithaca, NY), operado por el software CapWin (V.6).
- 35 Se remojó un pequeño disco de membrana (2,5 cm de diámetro) en líquido humectante Galwick® (Porous Materials Inc., tensión superficial = 15,9 dinas/cm) durante 10 min, después se apretó suavemente entre dos discos de papel de filtro previamente humedecidos (Whatman 5 - 70 mm) para eliminar el exceso de solución, y el grosor de la membrana humedecida se determinó mediante el uso de un micrómetro. El disco de membrana se colocó después sobre un disco de soporte de malla de acero inoxidable de 2,5 cm. El disco de soporte cargado con la membrana de prueba se colocó en el soporte designado, con la membrana hacia arriba. El recubrimiento de metal se colocó después suavemente sobre el soporte y la prueba se realizó dentro del intervalo de presión de 0-200 psi.
- 40 Protocolo de acoplamiento para conjugar el ligando de proteína A a la membrana clic de alqueno:
- Para examinar la viabilidad de unir químicamente biomoléculas (con funcionalidad tiol) a las membranas de alqueno mediante una reacción de clic de hidrotiolación, un ligando de proteína A diseñado que contiene un residuo de cisteína se acopló a la(s) membrana(s) de alqueno (de diferentes fórmulas químicas) y se examinó la bioactividad del ligando inmovilizado.
- 45 El polvo liofilizado de ligando de proteína A (r-proteína A-cys) se disolvió en PBS (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) para preparar una solución madre de 50 mg/mL. Para preparar una solución de acoplamiento para cada membrana, se transfirieron 0,4 mL de solución madre de ligando a una pequeña bolsa de plástico con cierre de cremallera (5x8 cm), a la que se añadieron 1,6 mL de tampón fosfato 2 M (pH 7,2) y después 50 µL de iniciador (se añadió 4,4'-azobis(ácido 4-cianovalérico), ACVA) en DMAc (150 mg/mL). La solución de reacción se mezcló bien. La solución de reacción final tenía un volumen de ~2,0 mL y contenía aproximadamente 20 mg de ligando y aproximadamente 7,5 mg de iniciador.
- 50 Alternativamente, se disolvió ACVA en el tampón de reacción (fosfato 2 M, pH 7,2) a una concentración de 5 mg/mL para evitar el uso de DMAc. Para el experimento con bajo contenido de sal, el iniciador se disolvió en fosfato 0,5 M a una concentración de 7,5 mg/mL.
- 55

- 5 A la bolsa cargada con reactivos de acoplamiento, se añadió un cupón de membrana de 4x7 cm (previamente humedecido en agua). La bolsa se agitó durante un minuto, después se irradió con luz UV (~365 nm) por 10 minutos. Una vez completada la irradiación, la solución de acoplamiento se decantó, después se añadieron 15-20 mL de solución tampón de lavado (fosfato 0,1 M, pH 7,2) y la membrana se colocó en el agitador durante 10-15 minutos. El ciclo de lavado se repitió tres veces, después de lo cual la membrana: (i) se transfirió a 8 mL de solución de trehalosa (10 % en peso), se agitó durante 10-15 minutos, y se secó en un horno (50 °C) durante 20-30 minutos; o (ii) se almacenaron en tampón fosfato 0,1 M.
- 10 Para el acoplamiento en presencia de aditivos, el ACVA se disolvió en fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,2) para obtener una solución con una concentración de 7,5 mg/mL. El ligando de proteína A se disolvió en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,2) para fabricar una solución madre de 50 mg/mL. En cada una de las tres bolsas pequeñas (5x8 cm), se mezclaron 0,25 mL de solución madre de ligando con 0,25 mL de solución de iniciador y se añadieron 50 µL de un aditivo (cisteamina-HCl a la bolsa de reacción B, y 1-mercaptoetanol a la bolsa de reacción C).
- 15 Después de mezclar bien las soluciones de reacción, se colocó un disco de membrana de 25 mm de diámetro en cada bolsa y las bolsas de reacción se agitaron bien, después se irradiaron con luz UV por 10 minutos. La solución de reacción se decantó, después los cupones de membrana se lavaron tres veces mediante el uso de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,2) y se agitó durante 10-15 minutos. Los cupones de membranas compuestas se almacenaron en tampón (fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2) y se probó su bioafinidad con la proteína IgG, como se describió anteriormente.
- 20 Densidad de ligando de proteína A en membranas compuestas:
- 25 Para medir la densidad del ligando de proteína A en la membrana acoplada, se determinó la cantidad de proteína no acoplada, que permaneció después de la reacción de acoplamiento, y se restó de la cantidad total de ligando para obtener la cantidad de ligando acoplado, después se dividió por el volumen de la membrana (mL) para expresar la densidad en mg de ligando por mL de membrana.
- 30 Para determinar la cantidad de proteína A en solución, se hicieron una serie de soluciones de proteína en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,2), se midió la absorbancia a 280 nm para cada una, y se construyó una curva de calibración a partir de la cual se determinó la pendiente.
- 35 Para fórmulas de membranas seleccionadas, se cortaron cupones de 4 cm x 7 cm y se midieron sus grosores, a partir de los cuales se calculó el volumen. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo como se describe anteriormente, y se cargaron 20 mg a cada reacción de acoplamiento en la membrana, individualmente. Cuando se completó la reacción UV, la solución de reacción se recolectó en un tubo, después se añadieron 3-5 mL de tampón fosfato 0,1 M a la bolsa de reacción y se usaron para lavar la membrana con agitación por 20-25 minutos, después la solución resultante se añadió al tubo de recolección.
- 40 El ciclo de lavado se repitió dos veces más, después se midió la absorbancia de la solución final y se calculó la cantidad de proteína no acoplada mediante el uso de la pendiente de la curva de calibración. La cantidad de ligando acoplado se determinó al tomar la diferencia entre las cantidades totales reaccionadas y no acopladas.
- 45 Modificación química pospolimerización con grupos carboxilato:
- Se sintetizaron membranas adicionales y después se modificaron mediante la explotación de la reacción clic para injertar ácido 1-mercaptopuccínico con membranas de alquenos para introducir grupos carboxilato en la cadena principal del polímero.
- 50 Por ejemplo, se cortó un cupón que tenía un diámetro de 7,7 cm de una membrana que comprendía una pluralidad de grupos alquenos funcionales y se midió el flujo (flujo inicial). El cupón se transfirió después a una bolsa de plástico.
- 55 Para estas membranas, la reacción de injerto se realizó en condiciones acuosas. El ácido mercaptopuccínico se disolvió en 6 mL de agua desionizada, después se añadieron 0,3 mL de solución iniciadora de ACVA (150 mg/mL en DMAc). La solución de reacción se mezcló bien, después se añadió a la bolsa y se mezcló con el cupón de membrana. Esta mezcla se irradió después en una cámara de UV (aprox. 350 nm) por 10 minutos.
- 60 Después de la exposición a la luz UV, los cupones de membrana se retiraron de la bolsa y cada cupón se enjuagó dos veces con 20 mL de agua, después dos veces con 20 mL de solución de NaOH 0,1 M, y finalmente se enjuagó dos veces con 20 mL de agua. Se determinó el flujo de agua RO y el flujo de la solución tampón de acetato de la membrana, después se cortó un disco pequeño (25 mm de diámetro) y se usó para determinar la capacidad de unión de IgG por intercambio catiónico (CEX).
- 65 Modificación química pospolimerización con ligandos hidrófobos para generar membranas de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

- Se fabricaron membranas representativas que contenían alqueno como se describió anteriormente, después se colocaron cupones pequeños (4 x 7 cm cada uno) individualmente en pequeñas bolsas de plástico con cremallera, cada una cargada con 3 mL de dimetilacetamida (DMAc) que contenían 120 mg de 1-octanotiol y 10 mg de fotoiniciador (ACVA). Las bolsas de reacción (con cupones de membrana) se transfirieron a una cámara de UV cerrada y se irradiaron con luz UV por 10 minutos. Las membranas se enjuagaron dos veces con 10 mL de DMAc, después se enjuagaron una vez con 10 mL de isopropanol al 30 % en agua, después se enjuagaron dos veces con 10 mL de agua. Los cupones de membrana se retiraron y se secaron en el horno (40 °C) por 10-15 minutos.
- Medición de la capacidad de unión:
- Capacidad de unión de IgG por bioafinidad
- Se colocó un disco de membrana de 25 mm de diámetro en un soporte de acero inoxidable Natrix (SS) de 25 mm. Se pasaron 20 mL de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) para equilibrar (~ 160-200 volumen de lecho/min). En la etapa de unión, se pasaron 0,5 mg/mL de IgG policlonal en tampón de unión a una velocidad de flujo de 1 mL/min hasta que la absorbancia a UV del efluente excedió el 10 % de la solución de alimentación, y después se pasaron 10-15 mL de tampón para eliminar la proteína no unida a una velocidad de flujo de 2 mL/min. En la etapa de elución, la IgG unida se eluyó mediante el pase de 10-14 mL de tampón de elución (glicina-HCl 0,1 M o citrato de sodio 0,1 M, ambos a pH 3) a un régimen de flujo de 2 mL/min.
- Capacidad de unión de IgG por intercambio catiónico
- Se colocó un disco de membrana de 25 mm en un soporte Natrix-SS de 25 mm y se pasaron 20 mL de tampón de unión (acetato de sodio 132 mM, pH 5,0) para lograr el equilibrio. Después se pasó la solución de proteína (0,5 mg/mL de IgG policlonal humana (Equitech-Bio Inc.) en tampón de unión) hasta que la absorbancia a UV del efluente excedió el 10 % de la solución de alimentación, y después se pasaron 10-15 mL de tampón a través de la celda para lavar la proteína no unida. En la etapa de elución, la IgG unida se eluyó mediante el pase de 10 mL de tampón de elución (acetato de sodio 132 mM, NaCl 1 M, pH 5,0; o Tris 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,5).
- Capacidad de unión de IgG en modo de interacción hidrófoba
- Se colocó un disco de membrana de 25 mm en un soporte Natrix-SS de 25 mm y se pasaron 20 mL de tampón de unión (fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 6,5) para lograr el equilibrio. Después, se pasó una solución de proteína (0,5 mg/mL de IgG policlonal humana (Equitech-Bio Inc.) en tampón de unión) hasta que la absorbancia a UV del efluente excedió el 10 % de la solución de alimentación. Posteriormente, se pasaron 15-20 mL de tampón a través de la celda para lavar la proteína no unida. En la etapa de elución, la IgG unida se eluyó mediante el pase de 10 mL de tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0).
- Modificación química pospolimerización con grupos carboxilato:
- Las membranas seleccionadas se modificaron mediante la explotación de la reacción clic para injertar ácido 1-mercaptopuccínico con membranas de alquenos para introducir grupos carboxilato en la cadena principal del polímero. Para cada membrana, se cortó un cupón que tenía un diámetro de 7,7 cm y se midió el flujo (flujo inicial). El cupón se transfirió después a una bolsa de plástico.
- Para la modificación en *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), se preparó una solución de reacción mediante la disolución de 0,3 g de ácido 1-mercaptopuccínico en 6 mL de DMAc. Después, se añadieron 0,3 mL de solución de iniciador de ACVA (150 mg/mL en DMAc) a la solución de tiol. Finalmente, la solución de reacción completa se añadió a la bolsa de reacción que contiene la membrana.
- Para las condiciones de reacción acuosas, se usaron 6 mL de agua desionizada en lugar de DMAc para disolver el ácido mercaptopuccínico y se añadieron 0,3 mL de solución de iniciador de ACVA (150 mg/mL en DMAc).
- La bolsa se agitó bien para garantizar la impregnación completa de la membrana con la solución de reacción, después se irradió con luz (~365 nm) por 10 minutos, después de lo cual se desechó la solución de reacción. Se añadieron 20 mL de agua a la bolsa y la membrana se lavó con agitación por 10 minutos. La solución de lavado se desechó y se añadieron otros 20 mL de agua y se repitió el ciclo. La membrana se lavó dos veces más con NaOH 0,1 M (20 mL, 10 min cada uno). Finalmente, la membrana se lavó dos veces más con agua, y se determinó el flujo de la membrana (después del flujo).
- Ejemplo 1 - Formulación con comonomero de TEGDV
- En ciertas modalidades, se incluye un comonomero hidrófilo para ayudar a ajustar la permeabilidad de la membrana.
- En esta clase de formulación de membrana, el monómero de 2,2'-(etilendioxo)diectanotiol (EDDET) y el tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV), como comonomero, se usaron como monómeros de construcción y la 1,3,5-trialilil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) como reticulador. El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), ( $\pm$ )-

1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol) metil éter (DPMA) y agua en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) como fotoiniciador para iniciar la reacción de radicales de polimerización.

Las mezclas de reacción a base de estos ingredientes se formularon de acuerdo con los datos tabulados y todos los componentes se añadieron y se mezclaron bien, excepto el ditiol que se añadió 10-15 minutos antes del moldeo (para evitar cualquier polimerización prematura iniciada por la luz ambiental). Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa y el tiempo de humectación y se midió el flujo inicial del cupón de cada membrana (7,7 cm de diámetro) mediante el uso de agua RO.

Los resultados (como se muestra en la Figura 1) muestran que es posible fabricar membranas de diversas relaciones de alqueno/tiol y permeabilidad versátil, como lo indica el flujo de agua. Los resultados también muestran que el sistema de solvente puede usarse para ayudar a ajustar la porosidad de la membrana y, como resultado, la permeabilidad de la membrana. Por ejemplo, aumentar el contenido de 1,3-butanodiol al tiempo que disminuye el contenido de acetato de di(propilenglicol) metil éter (DPMA) en la fórmula aumentó el flujo de membrana (Fórmulas CLK-EN-12 vs. CLK-EN-17 y CLK-EN-90 vs. CLK-EN-81). Los resultados también muestran que la sustitución del reticulador (TATATO) con el extensor divinil trietilenglicol disminuyó el flujo de membrana (Fórmulas CLK-EN-12 vs. CLK-EN-16).

Si bien no se desea estar sujeto a ninguna teoría en particular, el 1,3-butanodiol puede considerarse no solvente para la cadena polimérica y, por lo tanto, tiende a aumentar la porosidad del gel durante la etapa de polimerización. Como resultado, aumenta la permeabilidad (expresada en flujo de agua). El DPMA puede desempeñar la misma función.

#### Ejemplo 2 - Formulación con comonomero de TEGDV - Efecto de la concentración de iniciador

En este ejemplo, se examinaron los efectos de la concentración de fotoiniciador en el proceso de polimerización y las propiedades de membrana resultantes. Similar a la clase anterior, se usaron el monómero de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET), y el comonomero de tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV), y el reticulador 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO). El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol) metil éter (DPMA), y agua en cantidades variables.

La cantidad del fotoiniciador 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) se varió, de acuerdo con la Figura 2 para dos conjuntos de reacciones de polimerización, uno a 10 minutos de tiempo de polimerización (CLK-EN-27 y CLK-EN-45) y el otro (CLK-EN-137 a 140) a los 6 minutos de tiempo de polimerización. Se examinó el tiempo de polimerización más corto para permitir una mejor discriminación, basada en la cantidad de iniciador, de las propiedades de membrana resultantes porque la reacción clic de hidrotiolación es una reacción rápida.

Los resultados, como se muestra en la Figura 2, sugieren que la cantidad de iniciador tiene un efecto sobre la permeabilidad de la membrana. El flujo tiende a disminuir a medida que aumenta la cantidad de iniciador. Este efecto se demostró tanto a los 10 como a los 6 minutos de tiempo de polimerización. Si bien no se desea estar sujeto a ninguna teoría en particular, más iniciador significa que la polimerización avanza a una mayor velocidad de conversión; el resultado probable es una red polimérica más densa.

#### Ejemplo 3 - Formulación con TEGDV y DATA como comonomeros

En este ejemplo, se examinó otro comonomero hidrófilo (*N,N'*-dialiltartramida (DATA)). Si bien no se desea estar sujeto a ninguna teoría en particular, los dos grupos hidroxilo en esta molécula aumentan la naturaleza anfífila del polímero, lo que puede mejorar la separación de fases a medida que crecen las cadenas de polímero, y mejoran de esta manera la porosidad del gel final.

En esta clase de formulación de membrana, se usaron el monómero de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET) y los comonomeros de tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV) y (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DATA), como monómeros de construcción con la 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) como reticulador.

El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (budiol), acetato de di(propilenglicol) metil éter (DPMA), y agua en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) como fotoiniciador para iniciar la reacción de polimerización.

Los componentes de la reacción se mezclaron bien juntos, excepto el ditiol que se añadió 10-15 minutos antes del moldeo. Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa y el tiempo de humectación, después se midió el flujo inicial de cada cupón de membrana (7,7 cm de diámetro) mediante el uso de agua RO.

Los resultados para este ejemplo demuestran nuevamente el efecto del sistema de solvente sobre la permeabilidad de la membrana. Como se ve al comparar la fórmula CLK-EN-99 con CLK-EN-104 (Figura 3), la reducción de la cantidad de 1,3-butanodiol y el aumento de la cantidad de *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc) da como resultado una reducción notable de la permeabilidad (el flujo de agua disminuyó de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 1700 kg/m<sup>2</sup>h).

En general, el 1,3-butanodiol y el agua se consideran no solventes o poco solventes para la cadena polimérica; por lo tanto, se incrementa la porosidad de las membranas formadas en estos solventes. Por el contrario, DMAc se considera un buen solvente que ayuda a solvatar la cadena polimérica a medida que se forma; como resultado, se reducen la

#### Ejemplo 4 - Formulación con DATA como comonomero

En este ejemplo, se examinó el uso de *N,N'*-dialiltartramida (DATA) como el único comonomero. Las moléculas de DATA tienen enlaces amida internos (que las moléculas de TEGDV no tienen); estos pueden añadir algo de resistencia mecánica a la membrana resultante.

En esta clase de formulación de membrana, se usaron el monómero de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET), (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DATA) como comonomero, y 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) como reticulador para fabricar las membranas. El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), (±)-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol) metil éter (DPMA), y agua en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) como el fotoiniciador.

Los componentes de la reacción (Figura 4) se mezclaron bien juntos, excepto el ditiol que se añadió 10-15 minutos antes del moldeo. Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa y el tiempo de humectación de las membranas secas, después se midió el flujo inicial del cupón de cada membrana (7,7 cm de diámetro) mediante el uso de agua R.O.

Los resultados (Figura 4) muestran que el aumento del contenido de DATA (del 3,3 % al 7,6 %), con la disminución concomitante del contenido de reticulador (del 16,3 % al 9,9 %), redujo el flujo de membrana.

La reducción del contenido de ditiol (EDDET) en este sistema conduce a un aumento en el flujo de membrana (CLK-EN-149 a -151). Si bien no se desea estar sujeto a ninguna teoría en particular, es posible que un mayor contenido de ditiol ayude a conectar cadenas poliméricas en crecimiento más pequeñas, lo que resulta en un gel más denso con mayor ganancia de masa y menor flujo.

Estas membranas se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), que mostró la porosidad del gel (Figura 6).

#### Ejemplo 5 - Formulación con reticulador de dialquino

En este ejemplo, se examinó la molécula de dialquino (1,7-octadiino) como un reticulador adicional que puede aumentar la población de enlaces carbono-carbono insaturados dentro de la membrana formulada. Esto puede ser beneficioso ya que aumenta la posibilidad de injertar el gel con (bio)moléculas funcionales de tiol.

En esta clase de formulación de membrana, se usaron monómeros de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET) y comonomero de tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV) como monómeros de construcción, mientras que se usaron 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) y 1,7-octadiino (OctDi) como reticuladores. El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), (±)-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol)metil éter (DPMA) y agua, todo en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) como fotoiniciador.

Los componentes de la reacción (Figura 7), excepto el ditiol (EDDET), se mezclaron hasta que todos se disolvieron. Después, se añadió EDDET 10-15 min antes del moldeo. Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa, el tiempo de humectación, y el flujo inicial de cada cupón de membrana (7,7 cm de diámetro, mediante el uso de agua R.O.).

Los resultados mostrados en la Figura 7 demuestran que es posible formular membranas con octadiino como un correticulador. La disminución de la cantidad de reticuladores (TATATO y OctDi) da como resultado una membrana compuesta que tiene una permeabilidad más baja. La ESEM muestra la estructura porosa de estas membranas (Figura 8).

#### Ejemplo 6 - Injerto pospolimerización de membrana de alqueno/ino con grupos carboxilato por hidrotiolación

Los grupos carboxilatos son de naturaleza hidrófila y se sabe que aumentan la hinchazón del gel debido a la fuerte hidratación de la forma ionizada (por ejemplo, polimetacrilatos). El aumento del contenido del grupo carboxilato en el gel aumenta la hinchazón del gel, lo que a su vez disminuye el flujo. Por otro lado, los grupos de ácido carboxílico (es decir, forma ácida) se consideran relativamente hidrófobos; un gel que tiene restos de ácido carboxílico en su forma no ionizada no se hincha tanto, y aumenta el flujo. Este fenómeno se conoce como sensibilidad al pH del hidrogel.

Para demostrar la capacidad de injertar un polímero clic de alqueno con una nueva funcionalidad mediante el uso de una reacción clic pospolimerización, se fabricaron membranas de alqueno/ino que tenían un alto flujo de agua (Figura 9). Estas

membranas estaban sujetas a funcionalización clic por hidrotiolación con una molécula de tiol-ácido. Se determinó la permeabilidad de la membrana modificada, expresada en flujo, y se comparó con el flujo inicial antes de la reacción de injerto.

5 La reacción clic de injerto pospolimerización se llevó a cabo en DMAc o agua. El flujo de cada membrana modificada se midió mediante el uso de agua RO. Para probar la sensibilidad al pH de las membranas modificadas, se usó tampón de acetato (acetato 132 mM, pH 5).

10 El flujo de las membranas modificadas disminuyó en comparación con su flujo antes del injerto (Tabla 1). Cuando se determinó el flujo mediante el uso de tampón acetato a pH 5, el flujo aumentó porque el grupo carboxilato se convirtió en la forma hidrófoba (ácido carboxílico), lo que disminuyó la hinchazón del gel. Además, cuando la membrana se purgó con solución de NaOH 0,1 M, el flujo de R.O. disminuyó lo que confirma la sensibilidad al pH de la membrana debido a la desprotonación de los grupos de ácido carboxílico para formar grupos carboxilato a pH básicos. *Ver también* la Figura 10.

15 Tabla 1 - Flujo de membrana (kg/m<sup>2</sup>h) en solventes con pH variable

| Fórmula    | Flujo de RO inicial | Flujo de RO después del injerto | Flujo de RO acetato pH 5 después del injerto | Flujo de RO NaOH después del injerto | Relación alqueno/tiol |
|------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| CLK-EN-015 | 21 917              | 3806                            | 21 333                                       | 3318                                 | 1,35                  |
| CLK-EN-042 | 27 143              | 6138                            | 22 399                                       | 5405                                 | 1,44                  |
| CLK-EN-046 | 23 509              | 14 676                          | 21 896                                       | 13 650                               | 1,44                  |

25 Para examinar el efecto que tiene el medio de reacción sobre las propiedades de la membrana modificada, la reacción de hidrotiolación de injerto se llevó a cabo en una membrana en DMAc y separadamente en agua, y se evaluó el flujo de las membranas modificadas en diferentes medios. Como se muestra más abajo (Tabla 2), las membranas injertadas en agua tienen un flujo menor que las membranas equivalentes que se modificaron en DMAc. Esto coincide con la comprensión general de que la reacción de hidrotiolación es más reactiva en solventes polares, y en medios acuosos en particular. *Ver también* la Figura 11.

35 Tabla 2 - Efecto del solvente durante la reacción de injerto sobre el flujo de membrana (kg/m<sup>2</sup>h)

| Fórmula | Flujo de RO inicial | Flujo de RO después de la modificación en H <sub>2</sub> O | Flujo de RO después de la modificación en DMAc | Relación alqueno/tiol |
|---------|---------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|
| EN-112  | 15 758              | 92                                                         | 3141                                           | 1,23                  |
| EN-113  | 13 612              | 0                                                          | 833                                            | 1,21                  |
| EN-133  | 15 531              | 5980                                                       | 13 103                                         | 1,08                  |

#### Ejemplo 7 - Injerto pospolimerización de membrana de alqueno/ino con proteína A por hidrotiolación

45 Para demostrar que las membranas de alqueno de clic pueden injertarse con un ligando biológico, la proteína A que tiene una funcionalidad terminal de cisteína (rProteína A-cys) se acopló a membranas clic de alqueno seleccionadas como se describió anteriormente. La capacidad de unión de la membrana con restos de proteína A injertados se determinó mediante el examen de su bioafinidad por la proteína IgG, mediante el seguimiento del protocolo de unión/elución, como se describió anteriormente.

50 Los resultados de la capacidad de unión (Tabla 3) demuestran que las membranas modificadas con proteína A son capaces de unirse a la IgG. Esto no sería posible si el ligando no estuviera acoplado a la membrana de gel o estuviera inactivo. La solución de elución para EN-151 fue una solución de tampón citrato (0,1 M, pH 3), mientras que la solución de tampón hidrocloreto de glicina (0,1 M, pH 3) se usó en la etapa de elución para EN-134 y EN-152.

55 Es interesante observar que la reacción de acoplamiento tuvo lugar incluso cuando la relación de alqueno respecto a tiol fue inferior a 1, lo que sugiere que la reacción de polimerización original no consumió todos los grupos alqueno. Debido a que el crecimiento de la cadena polimérica puede impedir la movilidad de la cadena durante las etapas finales de la reacción de polimerización, esto no es inesperado. Por lo tanto, es posible que cualquier exceso de tiol se acople a los grupos alquenos residuales en el polímero.

60 Los resultados también muestran que la relación de alqueno respecto a tiol no es el único factor para controlar la reacción de acoplamiento. Por ejemplo, una relación más alta no resultó en un mayor acoplamiento y bioactividad concomitante. Otros factores tales como la porosidad, área de superficie y naturaleza hidrófila/hidrófoba de la superficie, contribuyen a la accesibilidad de los grupos alquenos, lo que afecta la reacción de acoplamiento.

Tabla 3 - Capacidad de unión a IgG de la membrana de proteína A injertada clic

| Fórmula    | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Capacidad de unión a IgG <sub>10</sub> % B.T (mg/mL) |
|------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|
| CLK-EN-016 | 1,363                 | 2189                              | 1,4                                                  |
| CLK-EN-027 | 1,238                 | 1468                              | 1,3                                                  |
| CLK-EN-134 | 1,074                 | 6979                              | 3,7                                                  |
| CLK-EN-118 | 1,278                 | 11 509                            | 1,6                                                  |
| CLK-EN-124 | 1,273                 | 14 895                            | 2,8                                                  |
| CLK-EN-143 | 0,963                 | 9007                              | 4,9                                                  |
| CLK-EN-149 | 0,963                 | 3804                              | 5,0                                                  |
| CLK-EN-150 | 1,015                 | 6700                              | 5,5                                                  |
| CLK-EN-151 | 1,052                 | 7808                              | 6,2                                                  |
| CLK-EN-152 | 0,963                 | 7674                              | 5,6                                                  |

Ejemplo 8 - Efecto del tiempo de la reacción de injerto y de la cantidad de ligando sobre las propiedades de las membranas modificadas

Para usar la reacción de hidrotiolización de radicales (tiol-eno) para injertar la proteína A a las membranas de alqueno, la reacción debe iniciarse mediante radiación UV. Por lo tanto, fue necesario investigar los efectos de esta exposición sobre la bioactividad del ligando injertado.

Una fórmula de membrana se sometió a experimentos de acoplamiento de proteína A durante los cuales se varió la dosis de luz (a 365 nm), medida por el tiempo de exposición y se examinó el efecto sobre la bioactividad (como se refleja por la capacidad de unión) (Tabla 4).

Los resultados sugieren que variar el tiempo de exposición de 10 a 20 minutos no afecta la capacidad de unión de la membrana modificada final, independientemente de la cantidad o concentración de ligando en la solución de reacción. Los resultados también muestran que aumentar la cantidad de proteína mejoró la bioactividad.

Tabla 4 - Efectos de la cantidad de luz y ligando sobre la reacción de acoplamiento

| Experimento | Volumen de reacción (mL) | Conc. (mg/mL) | Cantidad total de ligando (mg) | Tiempo de exposición (min) | Capacidad de unión (mg/mL) |
|-------------|--------------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| A           | 1                        | 10            | 10                             | 10                         | 0,7                        |
| B           | 1                        | 10            | 10                             | 20                         | 0,7                        |
| C           | 2                        | 5             | 10                             | 10                         | 0,9                        |
| D           | 2                        | 5             | 10                             | 20                         | 0,8                        |
| E           | 2                        | 10            | 20                             | 10                         | 1,3                        |
| F           | 2                        | 10            | 20                             | 20                         | 1,3                        |

Ejemplo 9: efecto de la presencia de aditivos competidores en las propiedades de las membranas modificadas

Para demostrar que una reacción de hidrotiolación es responsable de unir el ligando de cys-proteína A a la membrana de alqueno, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo en pequeños discos de 25 mm de diámetro de la misma membrana (CLK-EN-143) en presencia y ausencia de moléculas funcionalizadas con tiol, que pueden competir con el ligando por los grupos alqueno disponibles y, por lo tanto, limitan el alcance de la reacción de acoplamiento del ligando. De hecho, la reacción de acoplamiento de ligando en presencia de moléculas de tiol competidoras resultó en membranas que tenían una bioactividad reducida, en comparación con la membrana modificada formada en ausencia de aditivos funcionalizados con tiol. Figura 12.

## Ejemplo 10 - Formulación con DATA como comonomero

En este ejemplo, se examinó el uso de *N,N'*-dialiltartramida (DATA) como el único comonomero. Las moléculas de DATA tienen enlaces amida internos (que las moléculas de TEGDV no tienen); estos pueden añadir algo de resistencia mecánica a la membrana resultante.

En esta clase de formulación de membrana, se usaron el monómero de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET), (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DATA) como comonomero, y 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) como reticulador para fabricar las membranas. El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), (±)-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol)metil éter (DPMA), y agua en cantidades variables, o *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), (±)-1,3-butanodiol (Budiol), di(etilenglicol), tri(etilenglicol), y agua en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxipropil)cetona (IRGACURE 2959) como el fotoiniciador.

Los componentes de la reacción (Figura 4B y Figura 13) se mezclaron bien juntos, excepto el ditiol que se añadió 10-15 minutos antes del moldeo. Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa y el tiempo de humectación de las membranas secas, después se midió el flujo inicial del cupón de cada membrana (7,7 cm de diámetro) mediante el uso de agua RO.

Los resultados (Figura 4B y Figura 13) muestran que es posible alimentar el comonomero DATA en un amplio intervalo mediante el uso de diferentes sistemas de solventes para obtener un amplio intervalo de permeabilidades de membrana, como lo indican las mediciones del flujo de agua de la membrana. Cuando estas membranas se injertaron con ligando de proteína A, mostraron un intervalo correspondiente de capacidades de unión a IgG (ver injerto pospolimerización con la sección de proteína A).

Estas membranas se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), que reveló redes porosas uniformes, altamente interconectadas (Figura 14).

## Ejemplo 11 - Formulación con molécula de tetratiol como correticulador

En ciertas modalidades, se usó pentaeritritol tetraquis(3-mercaptopropionato) (PETM) como un reticulador adicional para modificar la estructura y la permeabilidad de la membrana resultante.

En esta serie de formulaciones de membrana, el monómero de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET), y comonomeros de (+)-*N,N'*-dialiltartramida (DATA), se usaron como monómeros y 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) y pentaeritritol tetraquis(3-mercaptopropionato) (PETM) como un reticulador adicional. El sistema de solvente incluyó *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), (±)-1,3-butanodiol (Budiol), hexilenglicol, etilenglicol (EG), tetra(etilenglicol) (TetEG) y agua en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxipropil)cetona (IRGACURE 2959) como fotoiniciador para iniciar la reacción de radicales de polimerización.

Se formularon mezclas de reacción a base de estos ingredientes (Figura 8) y todos los componentes se añadieron y se mezclaron bien, excepto el ditiol que se añadió 10-15 minutos antes del moldeo (para evitar cualquier polimerización prematura iniciada por la luz ambiental). Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa y el tiempo de humectación y se midió el flujo inicial del cupón de cada membrana (7,7 cm de diámetro) mediante el uso de agua RO.

Los resultados (como se muestra en la Figura 15) muestran que es posible usar tiol de múltiples brazos (PETM) como un segundo reticulador para producir membranas de varias relaciones de alqueno/tiol con permeabilidad variable, como lo indica el flujo de agua. Es posible aumentar la permeabilidad mediante el aumento del contenido general de reticuladores en el gel, como se demuestra en la Tabla 5. La SEM muestra la estructura porosa de una formulación de membrana representativa (Figura 16).

Tabla 5. Efecto del reticulador PETM sobre la permeabilidad de la membrana.

| Fórmula    | % en moles (% en moles) |       |        |       | % en moles de reticulador total | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) |
|------------|-------------------------|-------|--------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
|            | EDDET                   | PETM  | TATATO | DATA  | PETM+TATATO                     |                                   |
| CLK-EN-314 | 45,62                   | 7,26  | 23,94  | 22,78 | 31,2                            | 6781                              |
| CLK-EN-317 | 45,22                   | 7,07  | 26,17  | 21,14 | 33,24                           | 7995                              |
| CLK-EN-323 | 40,68                   | 12,16 | 25,50  | 21,42 | 37,66                           | 14 788                            |
| CLK-EN-325 | 40,81                   | 12,28 | 25,75  | 20,83 | 38,02                           | 11 812                            |

## Ejemplo 12 - Formulaciones adicionales con reticulador dialquino

En este conjunto de ejemplos adicionales, se incluyó una molécula de dialquino (1,7-octadiino) en la fórmula como un reticulador adicional para aumentar la población de enlaces carbono-carbono insaturados dentro de la membrana polimerizada.

En esta clase de formulación de membrana, monómeros de 2,2'-(etilendioxo)dietanol (EDDET), y comonómeros de (+)-N,N'-dialiltartramida (DATA) se usaron como monómeros y 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) y 1,7-octadiino (OctDi) se usaron como reticuladores. El sistema de solvente incluyó N,N'-dimetilacetamida (DMAc), dodecilsulfato de sodio (SDS), etilenglicol (EG), tetra(etilenglicol) (TetEG), y agua, todo en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) como fotoiniciador.

Los componentes de la reacción (Figura 17), excepto el ditiol (EDDET), se mezclaron en la mezcla de solventes hasta que se disolvieron por completo. Después, se añadió EDDET 10-15 min antes del moldeo. Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa, el tiempo de humectación y el flujo inicial de cada cupón de membrana (7,7 cm de diámetro, mediante el uso de agua RO).

Los resultados mostrados en la Figura 17 demuestran que es posible formular membranas con octadiino como un correticulador que varían ampliamente en su permeabilidad. La imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una membrana representativa (CLK-EN-361) muestra una estructura porosa uniforme e interconectada que contiene poros pequeños (Figura 18).

## Ejemplo 13: unión de IgG por intercambio catiónico mediante el uso de membranas funcionalizadas con grupos carboxilato

Los grupos carboxilatos son de naturaleza hidrófila y se sabe que aumentan la hinchazón del polímero debido a la fuerte hidratación de la forma ionizada (por ejemplo, polimetacrilatos). El aumento del contenido del grupo carboxilato en el polímero poroso aumenta la hinchazón, lo que a su vez disminuye el flujo. Ver el Ejemplo 6.

Se examinó la capacidad de unión por intercambio catiónico para la proteína IgG (que tiene carga positiva neta a pH 5) para cada membrana injertada para proporcionar soporte adicional para la incorporación de los ligandos de intercambio catiónico cargados en la membrana. La capacidad de unión dinámica de las membranas a IgG aumenta con el aumento de la relación alqueno/tiol. Ver la Tabla 6.

Tabla 6 - Efecto de la unión de grupos carboxilato en el flujo de membrana (kg/m<sup>2</sup>h) y la capacidad de unión a IgG

| Fórmula    | Flujo de RO inicial (kg/m <sup>2</sup> h) | Flujo de RO después del injerto (kg/m <sup>2</sup> h) | Flujo de acetato pH 5 después del injerto (kg/m <sup>2</sup> h) | Capacidad de unión a IgG por CEX <sub>10</sub> % B.T (mg/mL) | Relación alqueno/tiol |
|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|
| CLK-EN-237 | 15 432                                    | 1725                                                  | 13 353                                                          | 19,5                                                         | 1,101                 |
| CLK-EN-227 | 13 664                                    | 705                                                   | 11 848                                                          | 22,2                                                         | 1,101                 |
| CLK-EN-224 | 17 189                                    | 773                                                   | 14 375                                                          | 28,1                                                         | 1,129                 |
| CLK-EN-287 | 6972                                      | 20                                                    | 5198                                                            | 37,5                                                         | 1,135                 |
| CLK-EN-235 | 12 243                                    | 34                                                    | 10 041                                                          | 37,3                                                         | 1,142                 |
| CLK-EN-291 | 10 172                                    | 24                                                    | 7539                                                            | 37,9                                                         | 1,159                 |
| CLK-EN-298 | 6918                                      | 0                                                     | 5533                                                            | 44,2                                                         | 1,159                 |
| CLK-EN-301 | 13 841                                    | 15                                                    | 10 684                                                          | 54,7                                                         | 1,211                 |
| CLK-EN-256 | 16 246                                    | 7                                                     | 15 777                                                          | 50,6                                                         | 1,222                 |

## Ejemplo 14 - Injerto pospolimerización de la membrana de alqueno/ino (fabricada con comonómero de DATA) con proteína A por hidrotiolación

Para demostrar que las membranas de alqueno clic pueden injertarse con un ligando biológico, se unió un ligando de proteína A diseñado por ingeniería genética que contenía un residuo de cisteína C-terminal (rProteína A-cys) a membranas de alqueno clic seleccionadas que se fabricaron como se describió anteriormente. Se determinó la capacidad de unión a IgG de la membrana con el ligando de proteína A injertado, como se describió anteriormente.

Los resultados de capacidad de unión a IgG (Tabla 7) de la membrana con mayor contenido de DATA (es decir, > 8 % en peso en la mezcla de polimerización) demuestran que las membranas modificadas con proteína A son capaces de unir más IgG que las membranas que tienen una concentración relativa más baja de monómero DATA (es decir, < 8 % en peso en la mezcla de polimerización).

Los resultados también sugieren que la relación de alqueno respecto a tiol no es la única variable correlacionada con el rendimiento de la capacidad de unión a IgG de la membrana. Es probable que otros factores, tales como la porosidad, área superficial y naturaleza hidrófila/hidrófoba superficial, también desempeñen funciones importantes, ya que contribuyen a la accesibilidad de los grupos alqueno, lo que afecta de esta manera la reacción de acoplamiento del ligando de proteína A.

Tabla 7 - Capacidad de unión a IgG de las membranas injertadas con proteína A (con un comonomero DATA aumentado en la solución de reacción)

| Fórmula    | % en peso de DATA | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Capacidad de unión a IgG <sub>10 % B.T</sub> (mg/mL) | Densidad de ligando en membrana ProA (mg/mL) |
|------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| CLK-EN-301 | 8,26              | 1,211                 | 13 841                            | 9,6                                                  | 6,9                                          |
| CLK-EN-227 | 8,47              | 1,101                 | 13 664                            | 7,3                                                  | 5,9                                          |
| CLK-EN-237 | 8,48              | 1,101                 | 15 432                            | 8,3                                                  |                                              |
| CLK-EN-256 | 8,52              | 1,222                 | 16 246                            | 9,2                                                  | 6,4                                          |
| CLK-EN-298 | 8,52              | 1,159                 | 6918                              | 10                                                   | 5,7                                          |
| CLK-EN-291 | 8,54              | 1,159                 | 10 172                            | 9,8                                                  | 7,0                                          |
| CLK-EN-235 | 8,67              | 1,142                 | 12 243                            | 10,8                                                 |                                              |
| CLK-EN-287 | 8,96              | 1,135                 | 6972                              | 10,2                                                 |                                              |
| CLK-EN-224 | 9,10              | 1,129                 | 17 189                            | 6                                                    | 5,3                                          |

Ejemplo 15 - Injerto pospolimerización de la membrana de alqueno/ino (fabricada con correticulador PETM) con proteína A por hidrotiolación

En esta clase de membrana, el reticulador de tetratiol PETM se usó como un reticulador adicional para proporcionar otra herramienta para ajustar el grado de reticulación y permeabilidad de las membranas. La presencia y densidad de superficie de los grupos funcionales de alqueno pospolimerización se probaron mediante el injerto primero del ligando de proteína A en estas membranas mediante el uso de la reacción de hidrotiolación de radicales (tiol-eno). Después se evaluó la capacidad de unión a IgG de las membranas injertadas con proteína A como se describió previamente.

Como se muestra más abajo (Tabla 8), los resultados sugieren que las membranas fabricadas con este correticulador poseen grupos alquenos residuales que son funcionales y accesibles para la reacción de hidrotiolación de rProteína A-cys (tiol-eno) en la superficie de la membrana.

Tabla 8 - Capacidad de unión a IgG de membranas injertadas con proteína A (fabricadas con correticulador PETM)

| Fórmula    | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Capacidad de unión a IgG <sub>10 % B.T</sub> (mg/mL) |
|------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|
| CLK-EN-314 | 1,128                 | 6781                              | 10,3                                                 |
| CLK-EN-317 | 1,176                 | 7995                              | 10,7                                                 |
| CLK-EN-323 | 1,183                 | 14 788                            | 8,9                                                  |
| CLK-EN-325 | 1,174                 | 11 812                            | 11,8                                                 |

Ejemplo 16 - Injerto pospolimerización de una membrana de alqueno/ino con ligando hidrófobo para generar medios de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

Una molécula hidrófoba terminada en tiol se injertó en membranas que contenían grupos funcionales alquenos residuales mediante el uso de una reacción clic de hidrotiolación (tiol-eno) fotoiniciada. Se prepararon tres membranas (EN-224, EN-291, y EN-301) (como se describe anteriormente en la sección de métodos experimentales) para su uso en reacciones

de injerto subsecuentes, específicamente para introducir 1-octanotiol en la membrana, como se describe en la sección de métodos generales.

Se esperaba que la unión del tiol hidrófobo a las membranas disminuyera significativamente la hidrofiliidad de la superficie de la membrana injertada versus la membrana no injertada. De hecho, el tiempo de humectación aumentó consistentemente después del injerto para todas las formulaciones de membrana probadas (Tabla 9).

Se anticipó que las membranas hidrófobas modificadas con ligando servirían como medios efectivos de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), al unir IgG a altas concentraciones de sal. Este fenómeno constituye la base de la cromatografía de interacción hidrófoba, una técnica bien conocida usada en el proceso de bioseparación para la purificación biológica.

Los resultados (Tabla 9) demuestran que la membrana modificada de hecho puede unirse a proteínas en condiciones de alta salinidad.

Tabla 9 - Propiedades de las membranas alqueno/ino injertadas con ligando hidrófobo

| Fórmula    | Relación alqueno/tiol | Tiempo de humectación |         | Capacidad de unión por HIC <sub>10 BT</sub> % (mg/mL) |
|------------|-----------------------|-----------------------|---------|-------------------------------------------------------|
|            |                       | Antes                 | Después |                                                       |
| CLK-EN-224 | 1,129                 | 1 Seg                 | 6 Seg   | 10,6                                                  |
| CLK-EN-291 | 1,159                 | 1 Seg                 | 20 Seg  | 12,4                                                  |
| CLK-EN-301 | 1,211                 | 1 Seg                 | 20 Seg  | 10,8                                                  |

Ejemplo 17 - Reacción de polimerización de una etapa para fabricar membranas clic-HIC funcionalizadas mediante el uso de la reacción de hidrotiolación

En este ejemplo, se demuestra la flexibilidad de la química clic como se demuestra una membrana clic funcionalizada con un ligando hidrófobo; una sola etapa de polimerización forma la red de polímero de membrana con un ligando hidrófobo (1-octano tiol) incluido en su red. Al controlar la relación tiol/alqueno en la mezcla de polimerización, la población de alqueno residual puede variarse y, en principio, puede usarse en etapas posteriores para anclar moléculas o ligandos adicionales que tienen las mismas o diferentes propiedades químicas o físicas.

En esta clase de formulación de membrana, monómeros de 2,2'-(etilendioxi)dietanotiol (EDDET) y comonómeros de tanto 1,4-ditioeritritol (DDT) como (+)-N,N'-dialiltartramida (DATA), se usaron como monómeros de construcción, mientras que 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO) y 1,7-octadiino (OctDi) se usaron como reticuladores. Se incluyó 1-octano tiol en la fórmula para añadir un colgante hidrófobo o un grupo final al polímero. El sistema de solvente incluyó N,N'-dimetilacetamida (DMAc), dodecilsulfato de sodio (SDS), etilenglicol (EG), tetra(etilenglicol) (TetEG), y agua, todo en cantidades variables. Se usó 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona (IRGACURE 2959) como fotoiniciador.

Los componentes de la reacción (Figura 19), excepto el ditiol (EDDET), se mezclaron en la mezcla de solventes hasta que se disolvieron por completo. Después, se añadió EDDET 10-15 min antes del moldeo. Las membranas se moldearon y polimerizaron como se describió anteriormente. Se determinó la ganancia de masa, el tiempo de humectación, y el flujo inicial de cada cupón de membrana (7,7 cm de diámetro, mediante el uso de agua R.O.).

Como se muestra en la Figura 19, es posible fabricar membranas con capacidad de unión a IgG y permeabilidad variable a través de una única etapa de polimerización que incluye un ligando hidrófobo en la mezcla de reacción. Ver la Tabla 10.

Tabla 10 - Uso de la membrana clic-funcionalizada por HIC en bioseparación

| Fórmula    | Relación alqueno/tiol | Flujo de agua RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Capacidad de unión a IgG en modo HIC <sub>10 BT</sub> % (mg/mL) |
|------------|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| CLK-EN-411 | 1,237                 | 4835                                   | 7,9                                                             |
| CLK-EN-417 | 1,093                 | 13 635                                 | 8,4                                                             |

Ejemplo 18: proceso de injerto por etapas pospolimerización para arquitectura de injerto controlado o extendido mediante hidrotiolación

Una ventaja importante de usar hidrotiolación para la funcionalización del gel es la capacidad de usar la misma química de reacción para introducir otros monómeros en etapas posteriores. Además, debido a la especificidad que caracteriza a

la química clic, es posible realizar procesos de injerto de varias etapas, que pueden introducir bloques de construcción colgantes y grupos funcionales de una manera muy controlada.

Para demostrar esta capacidad, membranas seleccionadas que contienen grupos funcionales alquenos residuales se sometieron a procesos de injerto por etapas. El resultado neto de este proceso de injerto de dos etapas es construir un brazo que se extienda fuera de la superficie que tenga una estructura y longitud definidas, como se muestra en la Figura 20.

En la primera etapa, se usó un monómero de ditiol (EDDET) en exceso para convertir la funcionalidad de la superficie del gel de alqueno a grupos tiol. Los cupones de membrana de 7,7 cm de diámetro se pesaron y después se humedecieron con agua, después de lo cual los cupones se transfirieron individualmente a bolsas de plástico con cremallera cargadas con 4 mL de 10 % en peso de ditiol (EDDET) en DMAc y 18 mg de fotoiniciador (ACVA). Cada bolsa de reacción se agitó y después se expuso a la luz UV por 7 minutos, después los cupones se enjuagaron con 10 mL de DMAc.

En la segunda etapa, se hizo reaccionar un exceso de monómero de di-alqueno (DATA) con la membrana enriquecida con tiol mediante una reacción de injerto de hidrotiolación para hacer una membrana final que contiene grupos funcionales alqueno extendidos desde la superficie. Los cupones de membrana se transfirieron individualmente a nuevas bolsas de plástico con cremallera cargadas con 4 mL de 10 % en peso de monómero de di-alqueno (DATA) en DMAc con 18 mg de fotoiniciador (ACVA). Las bolsas de reacción se expusieron a luz UV por otros 7 minutos, después los cupones de membrana se enjuagaron con DMAc, seguido de varios lavados en agua, después se secaron a temperatura ambiente. Se registró el peso final de la membrana.

Los resultados, como se muestran más abajo en la Tabla 11, demuestran que la ganancia de masa de la membrana aumentó ligeramente, mientras que la permeabilidad (medida por el flujo de agua) disminuyó significativamente después de la reacción de injerto de dos etapas. Las membranas injertadas con permeabilidades > 1000 kg/m<sup>2</sup>h se usaron para la posterior unión del ligando de proteína A para ayudar a probar la incorporación exitosa de grupos alquenos reactivos a través de este proceso y el efecto sobre la capacidad de unión de proteínas a la membrana. De hecho, la capacidad de unión a IgG medible indica un injerto de ligando exitoso en la superficie de la membrana (Tabla 11). Además, solo se observa un aumento en la capacidad de unión a IgG, posinjerto, para CLK-EN-224 donde la ganancia de masa fue la mayor, lo que sugiere el mayor rendimiento del injerto.

Este enfoque tiene un gran potencial para modificar y optimizar la estructura del injerto ya que proporciona una herramienta eficiente para construir injertos (o ramas) de unidades múltiples bien definidos que se extienden desde la superficie para modificar las propiedades de la superficie de la membrana, la densidad del grupo reactivo y/o la permeabilidad.

Tabla 11 - Rendimiento de la membrana después de una reacción de injerto de dos etapas

| Membrana   | Relación alqueno/tiol | Ganancia de masa en % en peso |                        | Capacidad de unión a IgG <sub>10 % B.T</sub> (mg/mL) |                        | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) |                        |
|------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
|            |                       | Inicial                       | Después de la reacción | Inicial                                              | Después de la reacción | Inicial                           | Después de la reacción |
| CLK-EN-224 | 1,129                 | 238                           | 251                    | 6                                                    | 11,1                   | 17 189                            | 3996                   |
| CLK-EN-287 | 1,135                 | 267                           | 270                    | 10,2                                                 | NA                     | 6972                              | 170                    |
| CLK-EN-291 | 1,159                 | 264                           | 266                    | 9,8                                                  | NA                     | 10 172                            | 250                    |
| CLK-EN-301 | 1,211                 | 243                           | 249                    | 9,6                                                  | 8,7                    | 13 841                            | 4151                   |

Ejemplo 19 - Proceso de doble polimerización para construir membranas "de dos fases" conectadas covalentemente

Otro enfoque para explotar la capacidad de las membranas que contienen alqueno para experimentar reacciones clic de hidrotiolación implica realizar una polimerización de monómeros/reticuladores de hidrotiolación in situ que formará una segunda fase polimérica dentro de los poros, y simultáneamente la unirá covalentemente al gel subyacente.

Se seleccionó una fórmula de membrana que tiene alta permeabilidad (CLK-EN-224) para hacer cuatro láminas de la membrana base (primera fase) en una lámina de sustrato de soporte poroso de 7" x 8" previamente pesada (malla de polipropileno no tejido), como se describió anteriormente. Cada lámina de la membrana CLK-EN-224 se colocó individualmente en una lámina de polietileno y se impregnó con 12 g de solución de polimerización descrita en la Figura 21 - A/B/C/D. La membrana impregnada se cubrió posteriormente con otra lámina de polietileno y se presionó suavemente con un movimiento circular a mano para eliminar el exceso de solución y las burbujas de aire atrapadas. El proceso de

polimerización se inició mediante la irradiación con luz UV (~350 nm) en una cámara cerrada por 10 minutos, después se lavó y se secó como se describió anteriormente (Métodos generales - sección de preparación de membranas).

5 Se determinó el peso final y la ganancia de masa de cada membrana, después se calculó el aumento de la ganancia de masa debido a la polimerización de la segunda fase injertada para cada fórmula. Las membranas de doble polimerización se injertaron después con ácido mercaptosuccínico para introducir grupos carboxilato en el gel de la membrana (ver sección de métodos generales), que permiten que la membrana funcione como un medio de intercambio catiónico para la bioseparación de proteínas. Además, las membranas también se injertaron con ligandos de proteína A, que permiten que la membrana funcione como medio de separación por bioafinidad (consulte la sección de métodos generales para los protocolos de injerto y prueba).

10 El examen de las membranas resultantes (Figura 22, CLK-EN-224 A/B/C/D) en cuanto a su ganancia de masa, permeabilidad (flujo) y capacidad de unión (tanto en los modos de intercambio catiónico como de bioafinidad) demuestra que es posible construir un gel polimérico de segunda fase dentro de la primera fase de gel, y como resultado, hacer un compuesto final con propiedades únicas.

15 Las ganancias en masa de las membranas "bifásicas" fueron más altas que las de la membrana base, y los valores de flujo fueron más bajos (Figura 22). Las capacidades de unión de las membranas "bifásicas" fueron diferentes a las membranas base. Las capacidades de unión a IgG por CEX parecen estar inversamente correlacionadas con la ganancia de masa, pero directamente correlacionadas con el flujo de agua.

## REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto, que comprende:  
un miembro de soporte, que comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte;  
y  
un gel reticulado macroporoso, en donde el gel reticulado comprende un polímero derivado de un primer monómero y un primer reticulador;  
en donde  
el gel reticulado macroporoso se encuentra en los poros del miembro de soporte;  
el gel reticulado macroporoso tiene macroporos que son más pequeños que los poros del miembro de soporte;  
el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol; y  
el primer reticulador comprende (i) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (ii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iii) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.
2. El material compuesto de la reivindicación 1, en donde el gel reticulado comprende una característica seleccionada de A a H:  
A) el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol terminales; y  
B) el primer monómero es 2,2'-(etilendioxi)dietanotiol (EDDET), 1,2-etanoditio, 1,4-butanoditio, poli(etilenglicol) (PEG) ditiol (tal como el PEG ditiol lineal), 1,6-hexanoditio, 2,2'-tiodietanotiol, etano-1,2-diil bis(3-mercaptopropionato), hexa(etilenglicol) ditiol, tetra(etilenglicol) ditiol, 1,16-hexadecanoditio, benceno-1,2-ditiol, benceno-1,3-ditiol, benceno-1,4-ditiol, bifenil-4,4'-ditiol, p-terfenil-4,4"-ditiol, clorhidrato de (S)-2-aminobutano-1,4-ditiol, 4-fenil-4H-(1,2,4)triazol-3,5-ditiol, 5-(4-clorofenil)-pirimidina-4,6-ditiol, 1,4-benzenodimetanotiol, 2-mercaptopetil éter, o L-(-)-ditiotreitio; o  
C) el primer reticulador comprende al menos tres dobles enlaces carbono-carbono; o  
D) el primer reticulador comprende tres dobles enlaces carbono-carbono; o  
E) el primer reticulador comprende tres dobles enlaces carbono-carbono terminales; o  
F) el primer reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono; o  
G) el primer reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono terminales; o  
H) el primer reticulador es 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO), 1,6-heptadiino, 1,7-octadiino, 1,8-nonadiino, 1,9-decadiino, acrilato de propargilo, poli(etilenglicol) (PEG) norborneno de 4 brazos, triacrilato de trimetilolpropano, tetra-alquino poli(etilenglicol), 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina, trialilamina, trialil borato, trialilfosfina, dialil fumarato, 3-(aliloxi)-1-propino, glioxal bis(dialil acetal), tetraalilsilano, propargil éter, o escualeno.
3. El material compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el polímero se deriva del primer monómero, el primer reticulador, y un segundo monómero, en donde el segundo monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono terminales; opcionalmente, en donde el segundo monómero es tri(etilenglicol) divinil éter (TEGDV), 1,9-decadieno, 1,4-bis(viniloxi)butano, dialilftalato, dialil diglicol carbonato, poli(etilenglicol) divinil éter, divinilglicol, divinilbenceno, divinil sulfona, 1,4-butanodiol divinil éter, alil éter, alil sulfuro, 1,4-bis(4-vinilfenoxi)butano, 1,5-hexadieno, dipenteno, (R)-(+)-limoneno, (S)-(-)-limoneno, N,N'-metilenbis(acrilamida), o N,N'-etilenbis(acrilamida).
4. El material compuesto de la reivindicación 3, en donde el polímero se deriva del primer monómero, el primer reticulador, el segundo monómero, y un tercer monómero, en donde el tercer monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono; opcionalmente, en donde  
(a) el tercer monómero comprende dos dobles enlaces carbono-carbono terminales o  
(b) el tercer monómero es (+)-N,N'-dialiltartramida (DATA), dialil disulfuro, dialil carbonato, dialil maleato, dialil succinato, trimetilolpropano dialil éter, 1,1-dialil-1-docosanol, 1,1-dialil-3-(1-naftil)urea, 1,1-dialil-3-(2-etilfenil)urea, 1,2-dialil-1,2-ciclohexanodiol, 2,6-dialil-meta-cresol, N,N'-dialil-2-hidroxiopropanamida, 1,4-pentadien-3-ol, trimetil(propargil)silano, o propargilamina.
5. El material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polímero se deriva del primer monómero, el primer reticulador, y un segundo reticulador; y el segundo reticulador comprende (i) al menos tres grupos funcionales tiol, (ii) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (iii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iv) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono; opcionalmente en donde el segundo reticulador es diferente del primer reticulador y/o el segundo reticulador comprende una característica seleccionada de A a D;  
A) el segundo reticulador comprende al menos dos triples enlaces carbono-carbono; o  
B) el segundo reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono; o  
C) el segundo reticulador comprende dos triples enlaces carbono-carbono terminales; o  
D) el segundo reticulador es 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (TATATO), 1,6-heptadiino, 1,7-octadiino, 1,8-nonadiino, 1,9-decadiino, acrilato de propargilo, 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina, trialilamina, trialil borato, trialilfosfina, dialil fumarato, 3-(aliloxi)-1-propino, dipropargilamina, 5,6-dimetil-5-decen-1,9-diino, glioxal bis(dialil acetal), tetraalilsilano, propargil éter, escualeno, trimetilolpropanotri(3-mercaptopropionato), pentaeritritol tetra(3-mercaptopropionato), poli(etilenglicol) tetra-tiol, tris[2(3-mercaptopropioniloxi)etil]isocianurato, ácido pentaeritritol tetraquis(2-mercptoacetato) tritiocianúrico, o 1-tiohexitol.

6. El material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el gel reticulado comprende además una pluralidad de grupos terminales injertados.
7. El material compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde
  - a) los grupos terminales injertados se derivan de una molécula que tiene un grupo funcional tiol o una molécula que tiene un enlace carbono-carbono insaturado; o
  - b) los grupos terminales injertados se derivan de una molécula que tiene un grupo funcional tiol, opcionalmente, en donde la molécula que tiene un grupo funcional tiol es ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 1-mercaptosuccínico, un péptido que tiene un residuo de cisteína, una proteína que tiene un residuo de cisteína, cisteamina, 1-tiohexitol, poli(etilenglicol) 2-ácido mercaptoetil éter acético, poli(etilenglicol) metil éter tiol, 1-tioglicerol, 2-naftalenotiol, bifenil-4-tiol, 3-amino-1,2,4-triazol-5-tiol, 5-(trifluorometil)piridin-2-tiol, 1-[2-(dimetilamino)etil]-1H-tetrazol-5-tiol, 1-propanotiol, 1-butanotiol, 1-pentanotiol, 1-hexanotiol, 1-octanotiol, hidrocloreto de 8-amino-1-octanotiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoro-1-octanotiol, 8-mercapto-1-octanol, o  $\gamma$ -Glu-Cys.
8. El material compuesto de la reivindicación 1 o 3, en donde el gel reticulado macroporoso comprende: un ligando, en donde el ligando comprende:
  - una funcionalidad de intercambio iónico, un resto de interacción hidrófoba, o una biomolécula para cromatografía de bioafinidad; y
  - al menos un grupo de injerto; y
 en donde el material compuesto es una membrana.
9. El material compuesto de la reivindicación 8, en donde el gel reticulado macroporoso comprende el ligando que es una biomolécula para cromatografía de bioafinidad, opcionalmente en donde la biomolécula para cromatografía de bioafinidad es la proteína A-cisteína.
10. El material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el material compuesto es una membrana.
11. Un método para fabricar un material compuesto, que comprende las etapas de:
  - combinar un primer monómero, un primer reticulador, un fotoiniciador, y un solvente, formando de esta manera una mezcla monomérica; en donde el primer monómero comprende dos grupos funcionales tiol; y el primer reticulador comprende (i) al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, (ii) al menos dos triples enlaces carbono-carbono, o (iii) al menos un triple enlace carbono-carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono;
  - poner en contacto un miembro de soporte con la mezcla monomérica, formando de esta manera un miembro de soporte modificado; en donde el miembro de soporte comprende una pluralidad de poros que se extienden a través del miembro de soporte; y el diámetro promedio de poro de los poros es de 0,1 a 25  $\mu\text{m}$ ;
  - recubrir el miembro de soporte modificado con una lámina polimérica, formando de esta manera un miembro de soporte recubierto; e
  - irradiar el miembro de soporte recubierto por un período de tiempo, formando de esta manera el material compuesto.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el material compuesto es un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y/o el método comprende una característica seleccionada de A a D;
  - A) que comprende además las etapas de:
    - poner en contacto el material compuesto con una mezcla que comprende un fotoiniciador y una pluralidad de precursores de grupos finales, formando de esta manera una mezcla de injerto; en donde los precursores de grupos finales son moléculas que tienen un grupo funcional tiol o moléculas que tienen un enlace carbono-carbono insaturado; e
    - irradiar la mezcla de injerto por un período de tiempo, formando de esta manera un material compuesto modificado; y/o
  - B) el fotoiniciador es benzoina o un éter benzoinico, benzofenona, una dialcoxiacetofenona, 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, óxido de difenil(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina, una hidroxialquilfenona, 1-hidroxi-ciclohexil-fenil-cetona, 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona, 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona, 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona, un éster  $\alpha$ -hidroximetilbenzoina sulfónico, 2-hidroxi-2-metilpropiofenona, acilfosfínato de litio, o 2-metil-1-[4-(metiltio)fenil]-2-(4-morfolinil)-1-propanona, 4,4'-azobis(ácido 4-cianovalérico) (ACVA), o una mezcla de estos; y/o
  - C) el solvente comprende *N,N*-dimetilacetamida (DMAc), ( $\pm$ )-1,3-butanodiol (Budiol), acetato de di(propilenglicol)metiléter (DPMA), agua, di(propilenglicol) dimetiléter (DPM), di(propilenglicol) propil éter (DPGPE), di(propilenglicol) metil éter (DPGME), tri(propilenglicol) butil éter (TPGBE), 3-metil-1,3-butanodiol, 3,3-dimetil-1,2-butanodiol, 3-metoxi-1-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), o *N,N*-dimetilformamida (DMF), etilenglicol, di(etilenglicol), tri(etilenglicol), tetra(etilenglicol), hexilenglicol, dodecil sulfato de sodio, o una mezcla de estos; y/o
  - D) el período de tiempo es de 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, o 1 hora.
13. Un método, que comprende la etapa de: poner en contacto a un primer régimen de flujo, opcionalmente, en donde el primer régimen de flujo es de 3 volúmenes de membrana (MV)/min a 70 MV/min, un primer fluido que comprende

una sustancia, opcionalmente, en donde la concentración de la sustancia en el primer fluido es de 0,2 mg/mL a 10 mg/mL, con un material compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, con lo que se adsorbe o absorbe de esta manera una porción de la sustancia en el material compuesto y/o el método comprende una característica seleccionada de A a F:

- 5 A) el primer fluido además comprende un anticuerpo fragmentado, anticuerpos agregados, una proteína de la célula huésped, un polinucleótido, una endotoxina, o un virus; y/o
- B) la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es a través de los macroporos del material compuesto: y/o
- 10 C) la trayectoria del flujo de fluido del primer fluido es perpendicular a los macroporos del material compuesto: y/o
- D) que comprende además la etapa de:
- 10 poner en contacto a un segundo régimen de flujo un segundo fluido con la sustancia adsorbida o absorbida sobre el material compuesto, liberando de esta manera una porción de la sustancia del material compuesto, opcionalmente en donde
- la trayectoria del flujo de fluido del segundo fluido es a través de los macroporos del material compuesto; o
- 15 la trayectoria del flujo de fluido del segundo fluido es perpendicular a los macroporos del material compuesto; y/o
- E) la sustancia es una molécula biológica, ion biológico, virus, o partícula viral, opcionalmente en donde la molécula biológica o ion biológico se selecciona de a) o b):
- 20 a) la molécula biológica o el ion biológico se selecciona del grupo que consiste en albúminas, lisozima, virus, células,  $\gamma$ -globulinas de origen humano y animal, inmunoglobulinas de origen humano y animal, proteínas de origen recombinante o natural, polipéptidos de origen sintético y natural, interleucina-2 y su receptor, enzimas, anticuerpos monoclonales, tripsina y su inhibidor, citocromo C, mioglobina, mioglobulina,  $\alpha$ -quimotripsinógeno, interleucina humana recombinante, proteína de fusión recombinante, productos derivados de ácidos nucleicos, ADN de origen sintético y natural, y ARN de origen sintético y natural; o
- 25 b) la molécula biológica o ion biológico es lisozima, hIgG, mioglobina, albúmina de suero humano, inhibidor de tripsina de soja, transferrina, enolasa, ovoalbúmina, ribonucleasa, inhibidor de tripsina de huevo, citocromo c, Anexina V, o  $\alpha$ -quimotripsinógeno.

Figura 1

| Fórmula    | % en peso |        |       |      |      |            |         | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|--------|-------|------|------|------------|---------|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            | EDDET     | TATATO | TEGDV | DMAc | DPMA | 1,3-budiol | Agua DI |                        |                                         |                            |                           |
| CLK-EN-016 | 15,3      | 14,6   | 5,3   | 25,2 | 18,9 | 15,8       | 4,4     | 1,36                   | 2189                                    | 240                        | 40                        |
| CLK-EN-012 | 15,3      | 13,3   | 6,6   | 25,2 | 18,9 | 15,8       | 4,4     | 1,35                   | 432                                     | 239                        | 40                        |
| CLK-EN-017 | 15,3      | 13,3   | 6,6   | 25,3 | 16,6 | 18,0       | 4,5     | 1,35                   | 2119                                    | 236                        | 40                        |
| CLK-EN-040 | 15,3      | 13,3   | 7,3   | 23,9 | 16,6 | 18,6       | 4,5     | 1,39                   | 4002                                    | 248                        | 15                        |
| CLK-EN-090 | 15,8      | 6,3    | 11,5  | 26,4 | 19,8 | 16,5       | 3,3     | 1,10                   | 931                                     | 219                        | 110                       |
| CLK-EN-081 | 15,8      | 6,3    | 11,5  | 26,4 | 13,2 | 23,1       | 3,3     | 1,10                   | 7307                                    | 230                        | 25                        |
| CLK-EN-083 | 15,9      | 7,3    | 10,3  | 26,5 | 16,6 | 19,9       | 3,3     | 1,08                   | 1154                                    | 231                        | >120                      |
| CLK-EN-084 | 15,9      | 7,3    | 10,3  | 26,5 | 23,2 | 13,2       | 3,3     | 1,08                   | 711                                     | 223                        | 60                        |
| CLK-EN-092 | 16,6      | 5,3    | 13,3  | 23,3 | 21,3 | 17,9       | 2,0     | 1,07                   | 1116                                    | 231                        | 25                        |
| CLK-EN-108 | 16,6      | 5,3    | 13,3  | 23,3 | 20,6 | 18,6       | 2,0     | 1,07                   | 1296                                    | 231                        | 20                        |

Figura 2

| Fórmula              | % en peso |        |       |      |      |            |         | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|----------------------|-----------|--------|-------|------|------|------------|---------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                      | EDDET     | TATATO | TEGDV | DMAC | DPMA | 1,3-budiol | Agua DI |                        |                                   |                            |                           |
| CLK-EN-045<br>10 min | 16,6      | 13,3   | 6,7   | 24,0 | 17,3 | 20,0       | 2,0     | 1,24                   | 3753                              | 238                        | 16                        |
| CLK-EN-027<br>10 min | 16,6      | 13,3   | 6,6   | 23,9 | 17,3 | 19,9       | 2,0     | 1,24                   | 1468                              | 243                        | 10                        |
| CLK-EN-137<br>6 min  | 16,2      | 12,3   | 7,4   | 27,0 | 13,5 | 20,2       | 3,4     | 1,25                   | 6435                              | 241                        | 50                        |
| CLK-EN-138<br>6 min  | 16,2      | 12,3   | 7,4   | 26,9 | 13,5 | 20,2       | 3,4     | 1,25                   | 4499                              | 247                        | 15                        |
| CLK-EN-139<br>6 min  | 16,1      | 12,3   | 7,4   | 26,9 | 13,4 | 20,1       | 3,4     | 1,25                   | 3858                              | 246                        | 20                        |
| CLK-EN-140<br>6 min  | 16,1      | 12,2   | 7,4   | 26,8 | 13,4 | 20,1       | 3,4     | 1,25                   | 3392                              | 242                        | 15                        |

Figura 3

| Fórmula    | % en peso |        |       |      |      |      |            |         | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|--------|-------|------|------|------|------------|---------|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            | EDDET     | TATATO | TEGDV | DATA | DMAc | DPMA | 1,3-budiol | Agua DI | IRGA-CURE              |                                         |                            |                           |
| CLK-EN-099 | 15,8      | 7,9    | 7,9   | 3,3  | 26,4 | 15,2 | 19,8       | 3,3     | 0,33                   | 10 091                                  | 232                        | 6                         |
| CLK-EN-104 | 15,8      | 7,9    | 7,9   | 3,3  | 27,7 | 15,2 | 18,5       | 3,3     | 0,33                   | 1696                                    | 235                        | 15                        |
| CLK-EN-105 | 15,8      | 7,9    | 7,9   | 3,3  | 26,4 | 17,8 | 18,5       | 2,0     | 0,33                   | 1537                                    | 230                        | 15                        |
| CLK-EN-106 | 15,9      | 7,9    | 7,9   | 3,3  | 27,8 | 16,6 | 17,9       | 2,3     | 0,33                   | 930                                     | 230                        | 15                        |

Figura 4A

| Fórmula    | % en peso |        |      |      |      |            |         | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|--------|------|------|------|------------|---------|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            | EDDET     | TATATO | DATA | DMAC | DPMA | 1,3-Budiol | Agua DI |                       |                                         |                            |                           |
| CLK-EN-118 | 14,6      | 14,6   | 3,3  | 25,2 | 17,3 | 19,9       | 4,8     | 1,28                  | 11 509                                  | 223                        | 15                        |
| CLK-EN-124 | 16,3      | 16,5   | 3,3  | 24,6 | 16,6 | 18,6       | 4,0     | 1,27                  | 14 895                                  | 241                        | 10                        |
| CLK-EN-143 | 17,3      | 9,8    | 7,5  | 32,1 | 12,0 | 14,2       | 7,1     | 0,963                 | 9007                                    | 272                        | 1                         |
| CLK-EN-149 | 17,4      | 9,8    | 7,5  | 32,3 | 12,0 | 13,6       | 7,1     | 0,96                  | 3804                                    | 253                        | 1                         |
| CLK-EN-150 | 16,7      | 9,9    | 7,5  | 32,7 | 12,1 | 13,7       | 7,1     | 1,01                  | 6700                                    | 245                        | 1                         |
| CLK-EN-151 | 16,2      | 9,9    | 7,6  | 33,0 | 12,2 | 13,7       | 7,2     | 1,05                  | 7808                                    | 237                        | 1                         |
| CLK-EN-152 | 18,0      | 10,1   | 7,8  | 32,0 | 11,4 | 12,9       | 7,5     | 0,963                 | 7674                                    | 260,3                      | 1                         |

Figura 4B

| Fórmula    | % en peso |        |      |       |       |            |         | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|--------|------|-------|-------|------------|---------|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            | EDDET     | TATATO | DATA | DMAC  | DPMA  | 1,3-Budiol | Agua DI |                       |                                         |                            |                           |
| CLK-EN-276 | 17,25     | 11,94  | 8,29 | 36,48 | 13,27 | 5,97       | 6,63    | 1,143                 | 1254                                    | 243                        | 10                        |

Figura 5A

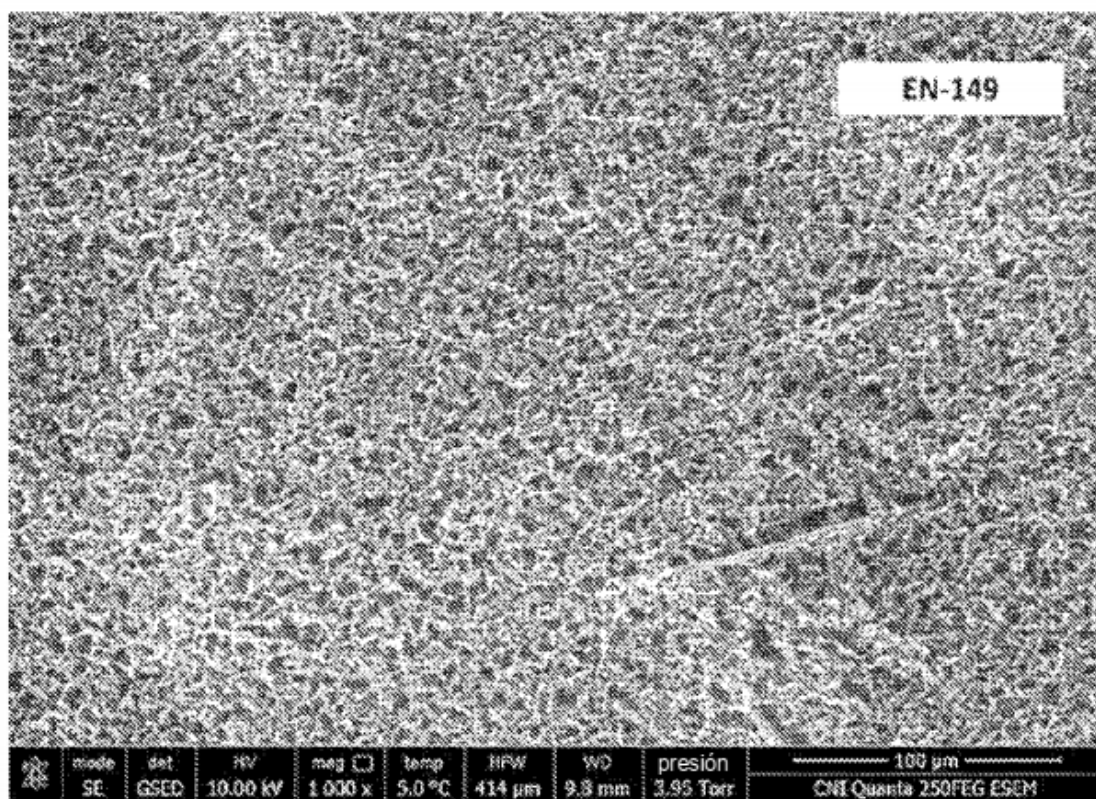


Figura 5B

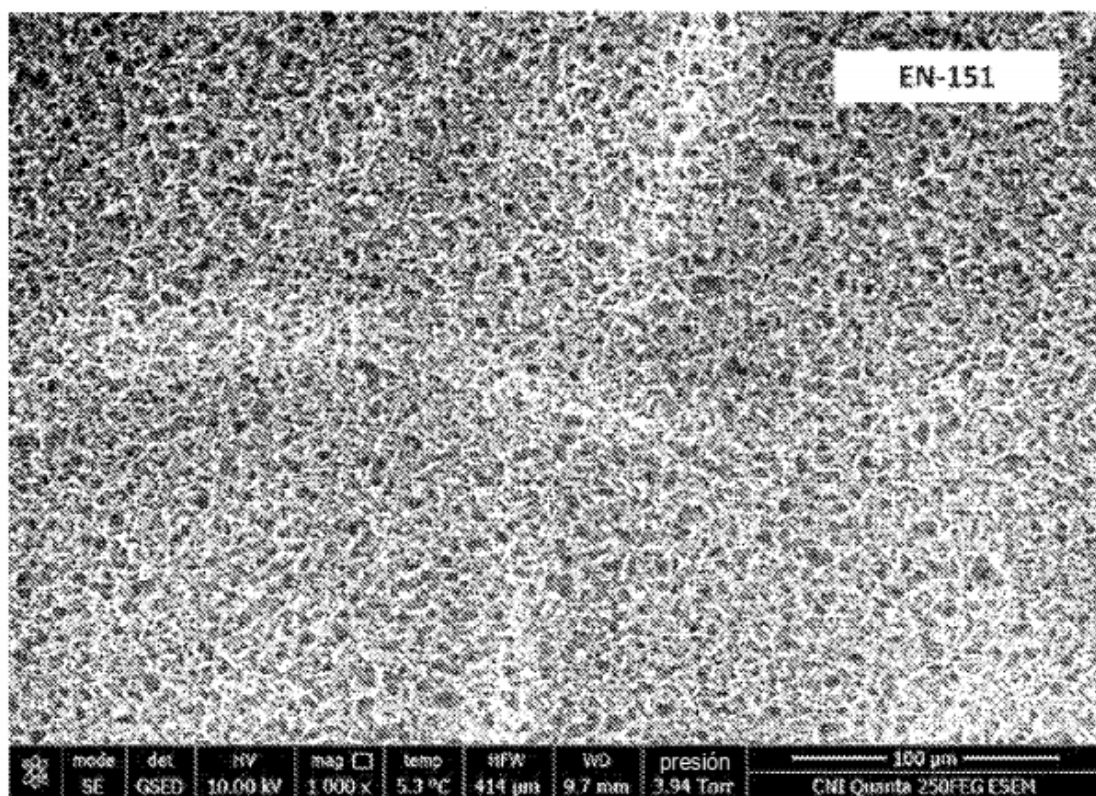


Figura 6

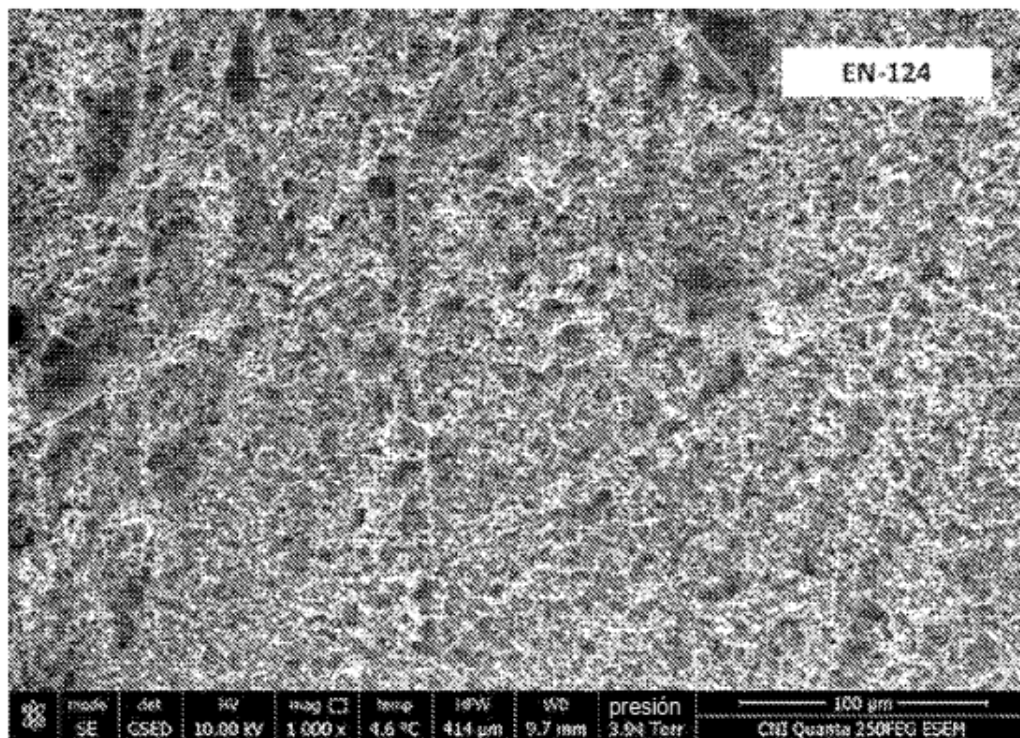


Figura 7

| Fórmula    | % en peso |       |        |       |      |      |      |            |         |           | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|-------|--------|-------|------|------|------|------------|---------|-----------|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            | EDDET     | OctDi | TATATO | TEGDV | DATA | DMAc | DPMA | 1,3-Budiol | Agua DI | IRGA-CURE |                        |                                         |                            |                           |
| CLK-EN-049 | 16,7      | 3,1   | 18,5   | 1,5   |      | 22,2 | 16,7 | 16,7       | 4,3     | 0,31      | 1,94                   | 7257                                    | 306                        | >120                      |
| CLK-EN-052 | 16,3      | 1,6   | 16,3   | 3,3   |      | 24,7 | 16,9 | 16,3       | 4,4     | 0,33      | 1,62                   | 3672                                    | 273                        | >120                      |
| CLK-EN-120 | 15,8      | 1,1   | 8,1    |       | 7,4  | 35,4 | 12,9 | 12,9       | 6,1     | 0,29      | 1,18                   | 142                                     | 223                        | 60                        |
| CLK-EN-134 | 17,3      | 1,3   | 9,0    |       | 5,5  | 33,2 | 12,0 | 16,6       | 5,0     | 0,30      | 1,074                  | 6979                                    | 236                        | 2                         |

Figura 8A

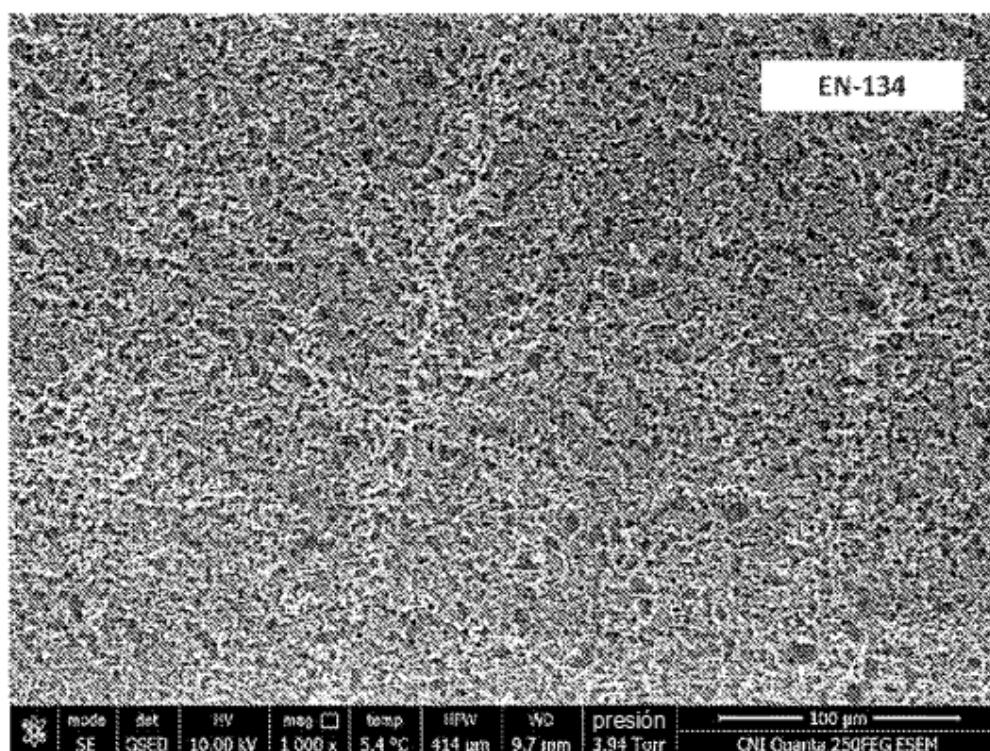


Figura 8B

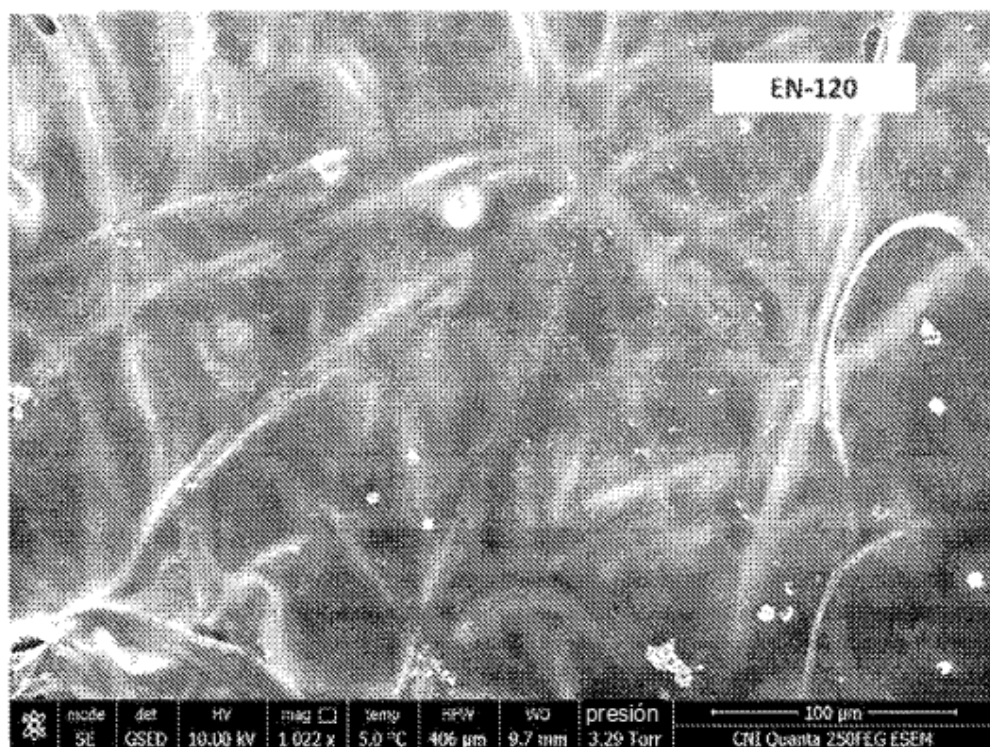


Figura 9

| Fórmula    | % en peso |       |        |       |      |      |      |            |         |           | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|-------|--------|-------|------|------|------|------------|---------|-----------|-----------------------|-------------|----------------------------|---------------------------|
|            | EDDET     | OctDi | TATATO | TEGDV | DATA | DMAc | DPMA | I,3-budiol | Agua DI | IRGA-CURE |                       |             |                            |                           |
| CLK-EN-015 | 13,8      |       | 12,0   | 6,0   |      | 26,6 | 19,9 | 16,6       | 4,7     | 0,47      | 1,35                  | 21 917      | 214,7                      | 40                        |
| CLK-EN-042 | 15,3      |       | 14,6   | 6,7   |      | 32,6 |      | 28,3       | 2,0     | 0,47      | 1,44                  | 27 143      | 235,5                      | 6                         |
| CLK-EN-046 | 15,3      |       | 14,6   | 6,6   |      | 30,5 |      | 29,4       | 3,3     | 0,33      | 1,44                  | 23 509      | 235,8                      | 2                         |
| CLK-EN-112 | 14,1      |       | 11,4   |       | 6,0  | 32,9 | 13,4 | 15,4       | 6,4     | 0,27      | 1,23                  | 15 758      | 208,6                      | 1                         |
| CLK-EN-113 | 14,6      |       | 11,3   |       | 6,6  | 32,6 | 13,3 | 15,3       | 6,0     | 0,27      | 1,21                  | 13 612      | 223,4                      | 1                         |
| CLK-EN-133 | 17,4      | 1,3   | 9,1    |       | 5,5  | 33,4 | 13,4 | 15,4       | 6,3     | 0,30      | 1,08                  | 15 531      | 229,3                      | 1                         |

Figura 10

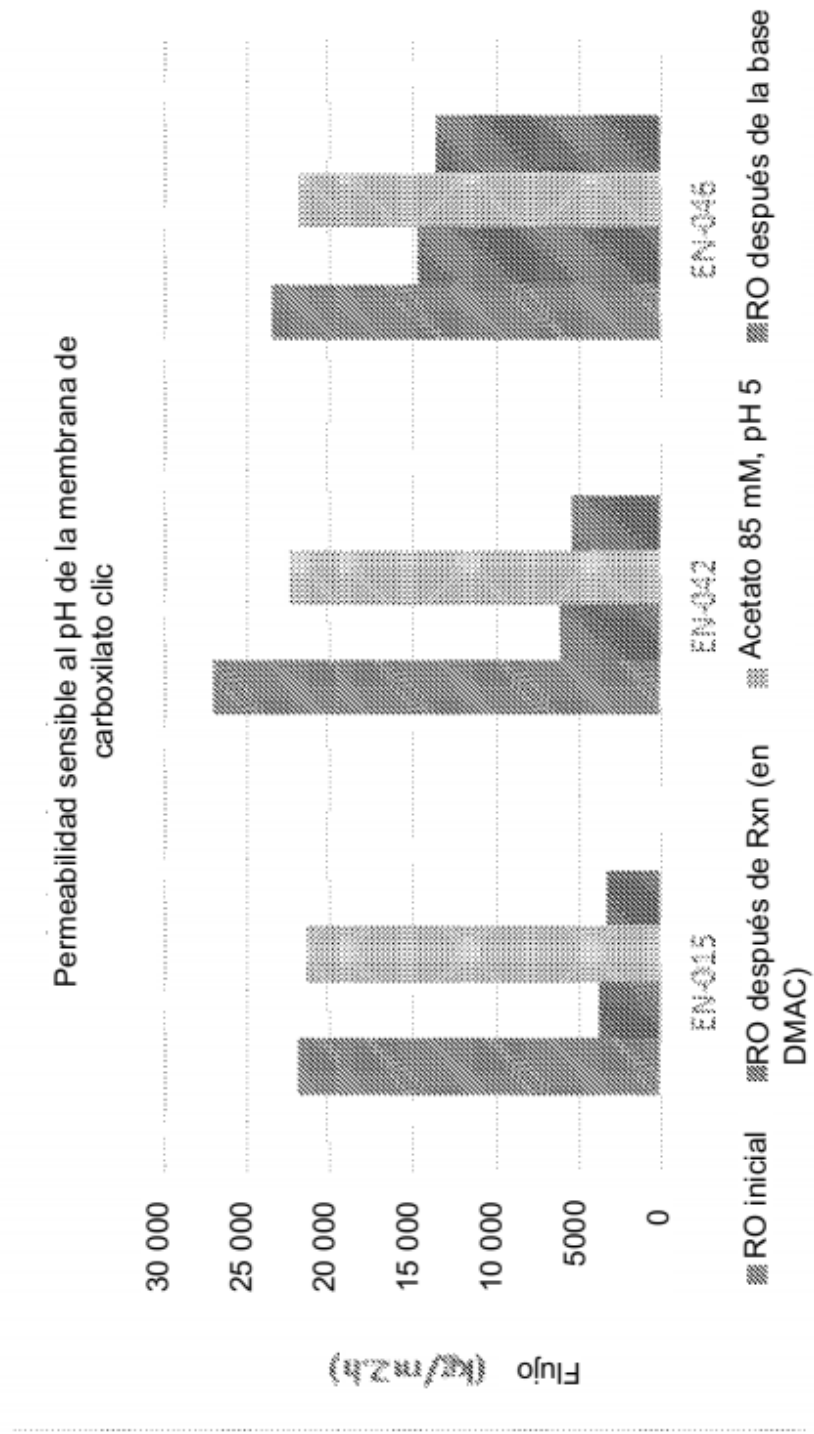


Figura 11

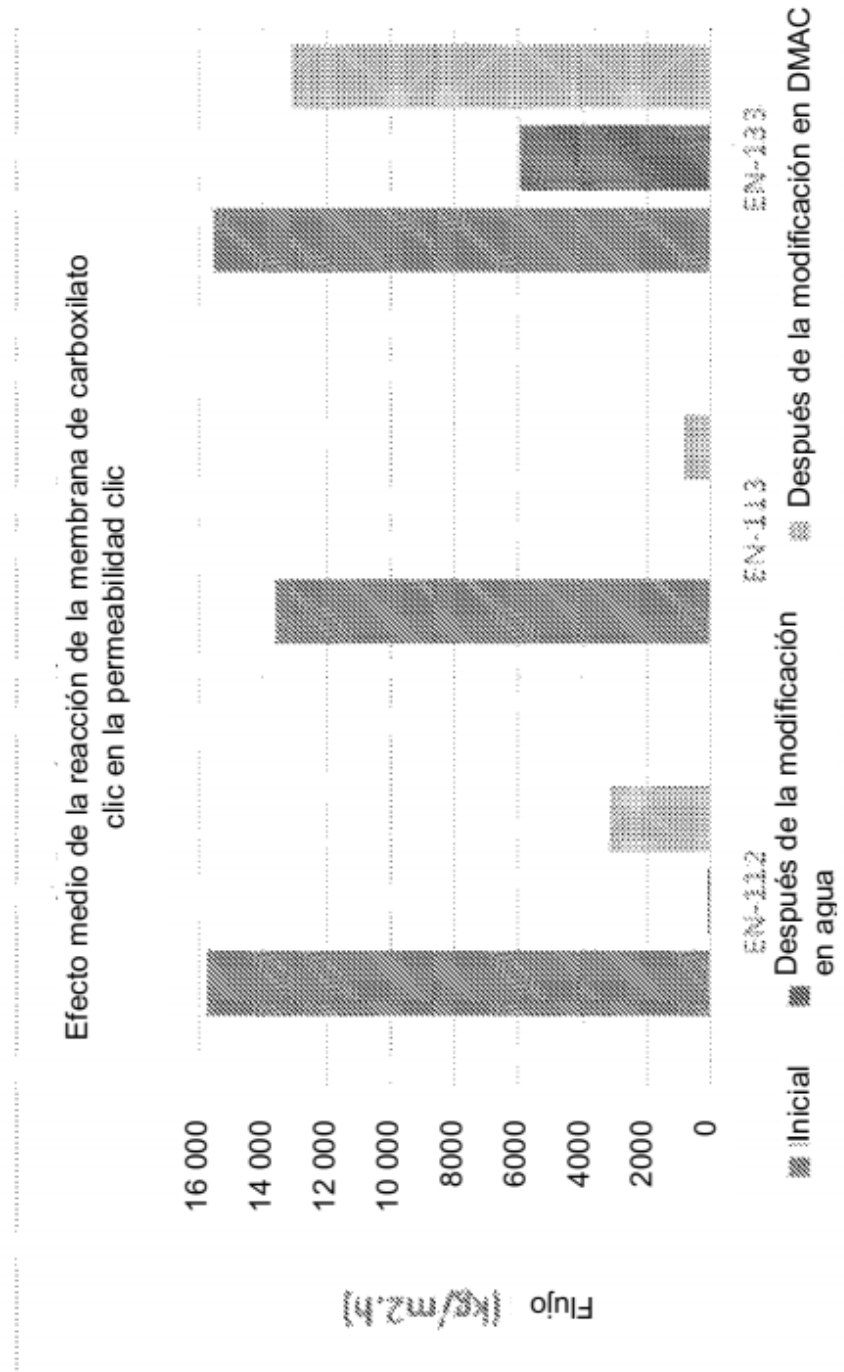


Figura 12

| Experimento | Tampón de acoplamiento final  | Aditivo                    | Volumen de reacción (mL) | Conc. de ligando (mg/mL) | Cantidad total de ligando (mg) | Tiempo de exposición (min) | Capacidad de unión (mg/mL) | Cantidad de iniciador (mg) |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| EN-143A     | Tampón fosfato 250 mM, pH 7,2 | Ninguno                    | 0,5                      | 25                       | 12,5                           | 10                         | 4,9                        | 1,9                        |
| EN-143B     | Tampón fosfato 225 mM, pH 7,2 | 50 µL de cisteamina-HCl    | 0,55                     | 22,8                     | 12,5                           | 10                         | 0,5                        | 1,9                        |
| EN-143C     | Tampón fosfato 225 mM, pH 7,2 | 50 µL de 1-mercapto-etanol | 0,55                     | 22,8                     | 12,5                           | 10                         | 0,5                        | 1,9                        |

Figura 13

| Fórmula    | % en peso |         |      |       |                |            |        |      |         |           | Total | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación (s) |
|------------|-----------|---------|------|-------|----------------|------------|--------|------|---------|-----------|-------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            | FDDET     | TATA TO | DATA | DMAc  | Hexilen glicol | 1,3-Budiol | Tct EG | TfG  | Agua DI | IRGA-CURE |       |                        |                                   |                            |                           |
| CLK-EN-224 | 15,60     | 9,43    | 9,10 | 39,01 | -              | 18,21      | -      | -    | 8,45    | 0,20      | 100   | 1,129                  | 17 189                            | 238                        | 1                         |
| CLK-EN-237 | 16,96     | 10,85   | 8,48 | 37,17 | -              | 18,85      | -      | -    | 7,50    | 0,20      | 100   | 1,101                  | 15 432                            | 258                        | 1                         |
| CLK-EN-235 | 17,34     | 11,74   | 8,67 | 40,03 | -              | 11,34      | -      | 3,34 | 7,34    | 0,20      | 100   | 1,142                  | 12 243                            | 262                        | 1                         |
| CLK-EN-256 | 17,04     | 12,78   | 8,52 | 38,01 | -              | 13,11      | -      | 4,59 | 5,90    | 0,07      | 100   | 1,222                  | 16 246                            | 261                        | 1                         |
| CLK-EN-227 | 16,95     | 10,84   | 8,47 | 38,13 | -              | 13,69      | -      | 4,56 | 7,17    | 0,20      | 100   | 1,101                  | 13 664                            | 259                        | 1                         |
| CLK-EN-287 | 17,12     | 11,20   | 8,96 | 38,20 | -              | 3,29       | 13,17  | 0,00 | 7,90    | 0,16      | 100   | 1,135                  | 6972                              | 267                        | 1                         |
| CLK-EN-291 | 17,09     | 11,83   | 8,54 | 36,15 | 11,83          | 6,57       | -      | 0,00 | 7,89    | 0,10      | 100   | 1,159                  | 10 172                            | 264                        | 1                         |
| CLK-EN-298 | 17,03     | 11,79   | 8,52 | 36,03 | 11,14          | -          | 6,55   | 0,00 | 8,84    | 0,10      | 100   | 1,159                  | 6918                              | 249                        | 1                         |
| CLK-EN-301 | 16,51     | 12,22   | 8,26 | 35,67 | 15,85          | 2,41       | -      | 0,00 | 8,92    | 0,17      | 100   | 1,211                  | 13 841                            | 243                        | 1                         |

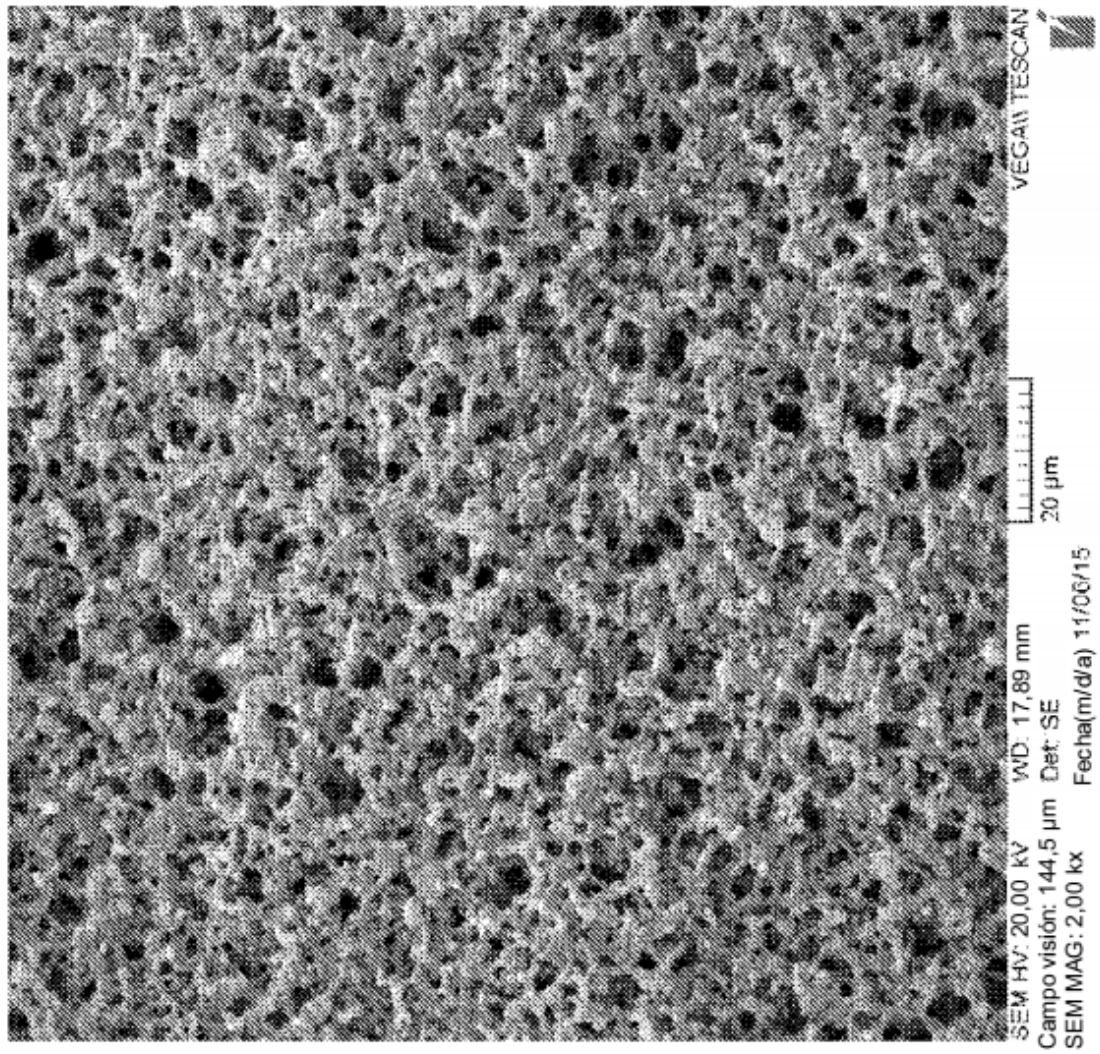


Figura 14

Figura 15

| Fórmula    | % en peso |      |        |      |       |                |            |       |      |         | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO (kg/m <sup>2</sup> h) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación |
|------------|-----------|------|--------|------|-------|----------------|------------|-------|------|---------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------|
|            | EDDET     | PETM | TATATO | DATA | DMAc  | Hexilen glicol | 1,3-Budiol | TetEG | EG   | Agua DI |                        |                                   |                            |                       |
| CLK-EN-314 | 15,01     | 2,28 | 10,77  | 8,81 | 37,85 | -              | 3,92       | 13,05 | -    | 8,16    | 1,128                  | 6781                              | 253                        | 1 seg                 |
| CLK-EN-317 | 14,85     | 2,22 | 11,75  | 8,16 | 36,89 | 9,79           | 9,14       | 0     | -    | 7,02    | 1,176                  | 7995                              | 242                        | 1 seg                 |
| CLK-EN-323 | 13,94     | 3,98 | 11,95  | 8,63 | 38,83 | -              | 4,65       | 8,63  | -    | 9,29    | 1,183                  | 14788                             | 247                        | 1 seg                 |
| CLK-EN-325 | 13,36     | 3,84 | 11,52  | 8,02 | 36,74 | 9,35           | 6,68       | 0     | 3,34 | 7,01    | 1,174                  | 11812                             | 241                        | 1 seg                 |

Figura 16

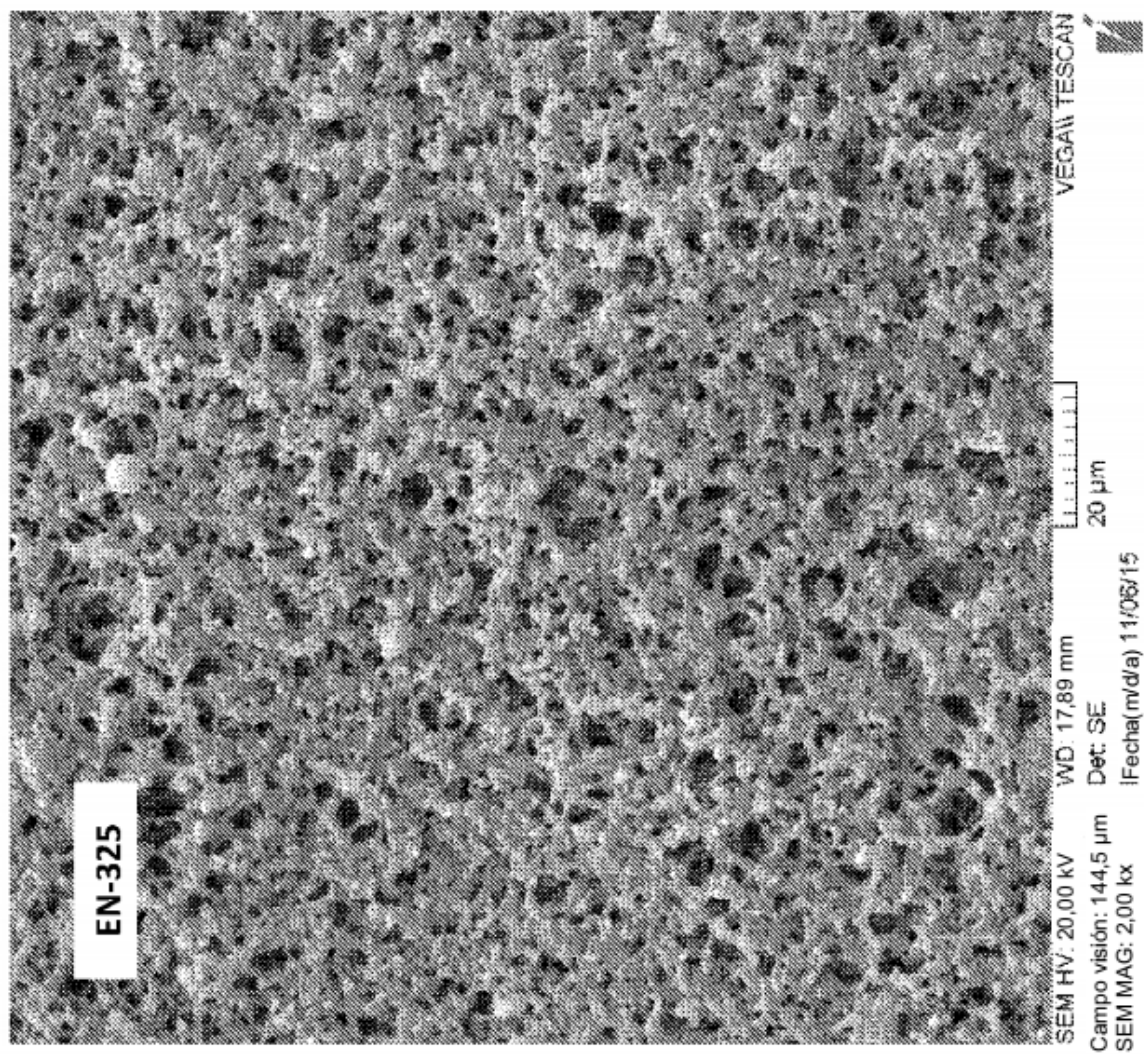


Figura 17

| Fórmula           | % en peso |       |        |       |       |      |       |      | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación |
|-------------------|-----------|-------|--------|-------|-------|------|-------|------|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                   | EDDET     | OctDi | TATATO | DATA  | DMAc  | SDS  | TetEG | EG   | AguaDI                | IRGA-CURE                               |                            |                       |
| <b>CLK-EN-361</b> | 16,34     | 2,14  | 5,03   | 11,62 | 42,10 | 1,57 | 4,71  | 5,03 | 11,31                 | 0,16                                    | 222                        | 2 seg                 |
| <b>CLK-EN-365</b> | 16,54     | 2,16  | 5,09   | 11,14 | 41,36 | 0,00 | 6,36  | 6,36 | 10,82                 | 0,16                                    | 243                        | 1 seg                 |

Figura 18

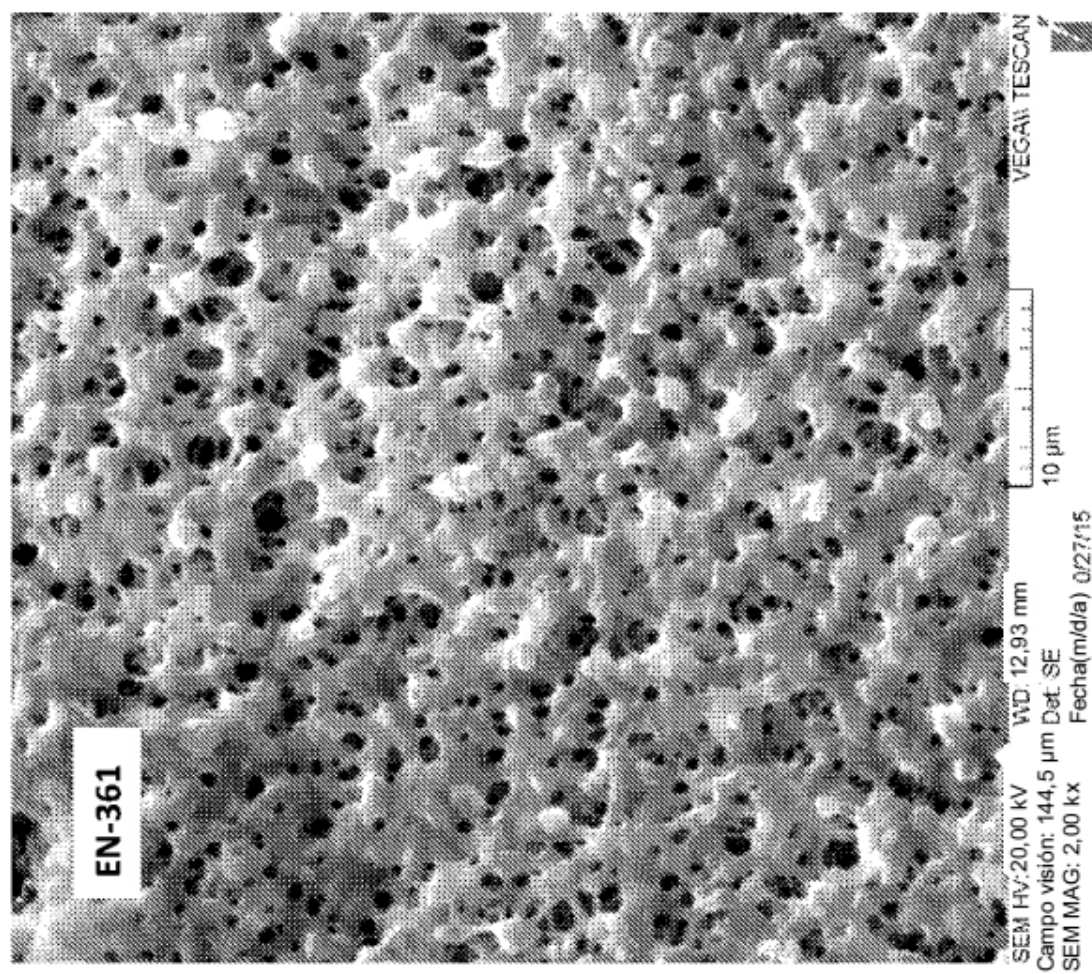


Figura 19

| Fórmula           | % en peso |       |      |       |        |       |       |      |       |      |         | Relación alqueno/ tiol | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación |
|-------------------|-----------|-------|------|-------|--------|-------|-------|------|-------|------|---------|------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                   | EDDET     | OctSH | DTT  | OctDi | TATATO | DATA  | DMAc  | SDS  | TetEG | EG   | Agua DI | IRGA-CURE              |                            |                       |
| <b>CLK-EN-411</b> | 17,53     | 0,94  | 0,63 | 2,19  | 6,89   | 10,33 | 42,25 | 1,56 | 3,13  | 5,01 | 9,39    | 0,16                   | 246                        | 2 seg                 |
| <b>CLK-EN-417</b> | 17,15     | 1,53  | 0,92 | 0,00  | 11,94  | 10,11 | 41,35 | 1,53 | 3,06  | 3,06 | 9,19    | 0,15                   | 265                        | 2 seg                 |

Figura 20

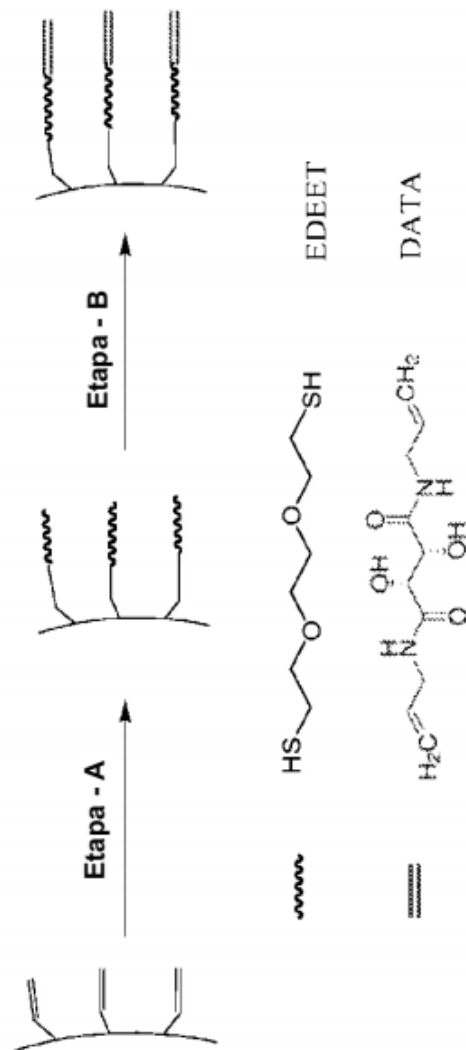


Figura 21

| Fórmula                | % en peso |        |      |       |            |         |           | Relación alqueno/ tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Ganancia de masa % en peso | Tiempo de humectación |
|------------------------|-----------|--------|------|-------|------------|---------|-----------|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                        | EDDET     | TATATO | DATA | DMAc  | 1,3-Budiol | Agua DI | IRGA-CURE |                        |                                         |                            |                       |
| <b>CLK-EN-224-DP-A</b> | 6,16      | 4,46   | 4,66 | 58,31 | 14,58      | 11,66   | 0,17      | 1,398                  | 2238                                    | 309                        | 1 Seg                 |
| <b>CLK-EN-224-DP-B</b> | 6,26      | 5,67   | 3,13 | 58,41 | 14,69      | 11,68   | 0,17      | 1,394                  | 984                                     | 311                        | 1 Seg                 |
| <b>CLK-EN-224-DP-C</b> | 6,34      | 2,92   | 5,84 | 58,43 | 14,61      | 11,69   | 0,17      | 1,241                  | 1706                                    | 300                        | 1 Seg                 |
| <b>CLK-EN-224-DP-D</b> | 7,02      | 4,15   | 3,95 | 50,66 | 22,43      | 11,63   | 0,17      | 1,098                  | 6832                                    | 311                        | 1 Seg                 |

Figura 22

| Fórmula                  | Aumento de la ganancia de masa (% en peso) debido al 2º polim. | Masa del polim. % | Relación alqueno/tiol | Flujo de RO ( $\text{kg/m}^2\text{h}$ ) | Capacidad de unión a IgG por bioafinidad <sup>10%</sup> a.T (mg/mL) | Capacidad de unión a IgG por CEX <sup>10%</sup> a.T (mg/mL) | % en moles |        |      |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------|--------|------|
|                          |                                                                |                   |                       |                                         |                                                                     |                                                             | EDDET      | TATATO | DATA |
| <b>CLK-EN-224 (Base)</b> | -                                                              | 34,14             | 1,129                 | 17 189                                  | 6,0                                                                 | 28,1                                                        | 52,1       | 23,0   | 24,9 |
| <b>CLK-EN-224-DP-A</b>   | 71                                                             | 15,29             | 1,398                 | 2238                                    | 5,1                                                                 | 15,9                                                        | 46,4       | 24,5   | 28,0 |
| <b>CLK-EN-224-DP-B</b>   | 73                                                             | 15,06             | 1,394                 | 984                                     | 4,6                                                                 | 9,3                                                         | 48,0       | 31,8   | 19,2 |
| <b>CLK-EN-224-DP-C</b>   | 62                                                             | 15,11             | 1,241                 | 1706                                    | 3,6                                                                 | 17,7                                                        | 47,8       | 16,1   | 35,1 |
| <b>CLK-EN-224-DP-D</b>   | 73                                                             | 15,12             | 1,098                 | 6832                                    | 7,9                                                                 | 16,3                                                        | 52,6       | 22,8   | 23,6 |