

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
INGEGNERIA CHIMICA, DELL'AMBIENTE E DELLA SICUREZZA  
CICLO XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza:  
ING-IND/24 Principi di Ingegneria Chimica

STUDIO SPERIMENTALE E MODELLAZIONE  
DELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE  
CON MEMBRANE DI AFFINITÀ

Presentata da:  
Ing. Simone Dimartino

Relatore:  
Prof. Ing. Giulio Cesare Sarti

Correlatore:  
Dott. Ing. Cristiana Boi

Coordinatore del corso di dottorato:  
Prof. Ing. Giulio Cesare Sarti

Esame finale anno 2009



# SOMMARIO

Introduzione .....	1
--------------------	---

## Capitolo 1:

Cenni introduttivi alla cromatografia di affinità.....	5
Introduzione.....	5
1.1 La cromatografia di affinità.....	6
1.1.1 Tecnologie di affinità con resine e membrane.....	11
1.2 Membrane versus resine: quale supporto usare? .....	12
1.2.1 Vantaggi delle membrane.....	12
1.2.2 Svantaggi delle membrane .....	14
1.2.3 Osservazioni conclusive .....	15
Bibliografia .....	16

## Capitolo 2:

Procedure sperimentali e sistemi studiati.....	19
Introduzione.....	19
2.1 Progetto europeo AIMs.....	20
2.2 Le immunoglobuline .....	22
2.3 Il sistema sperimentale: materiali.....	24
2.3.1 Membrane.....	24
2.3.2 Ligandi di affinità per le IgG .....	27
2.3.3 Membrane di affinità.....	30
2.3.4 Immunoglobuline .....	33
2.4 Il sistema sperimentale: metodi .....	34
2.4.1 Metodi analitici.....	34
2.4.2 L'apparato sperimentale: l'FPLC ÄKTApurifier 100 .....	37
2.5 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali .....	42
2.5.1 Cicli cromatografici in condizioni dinamiche.....	42
2.5.2 Dispersione nei volumi esterni alla colonna .....	44
2.5.3 Elaborazione dati.....	45
Bibliografia .....	47

## Capitolo 3:

<b>Risultati delle prove sperimentali</b> .....	<b>51</b>
Introduzione .....	51
3.1 Ligando sintetico D-PAM: membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800 .....	52
3.2 Ligando sintetico A2P.....	54
3.2.1 Membrane A2P-Sartoepoxy .....	54
3.2.2 Membrane A2P-Epoxy2.....	59
3.2.3 Membrane A2P-TA-Sartoepoxy .....	61
3.2.4 Membrane A2P-TA-Epoxy2 .....	64
3.2.5 Confronto tra le membrane con ligando A2P .....	66
3.3 Ligando sintetico B14 .....	66
3.3.1 Membrane B14-TA-Sartoepoxy .....	67
3.3.2 Membrane B14-TA-Epoxy2 .....	73
3.3.3 Confronto tra le membrane con ligando B14 .....	77
3.4 Ligando naturale Proteina A: membrane SartoAIMs Protein A .....	77
3.4.1 Esperimenti su scala di laboratorio .....	77
3.4.2 Esperimenti con modulo analitico.....	84
3.4.3 Esperimenti con il modulo pilota.....	86
3.5 Confronto tra le membrane studiate .....	88
Bibliografia .....	90

## Capitolo 4:

<b>Progettazione, realizzazione e verifica di un modulo per membrane</b> .....	<b>93</b>
Introduzione .....	93
4.1 Moduli cromatografici con membrane.....	94
4.2 Modulo di riferimento: ModA .....	96
4.3 Nuovo modulo: ModB.....	97
4.3.1 Fase di progettazione .....	97
4.3.2 Modifiche al pezzo originale .....	98
4.3.3 Verifica e determinazione della configurazione ottimale .....	99
4.4 Confronto sperimentale tra i due moduli.....	105
Bibliografia .....	107

## Capitolo 5:

<b>Modellazione matematica: stato dell'arte</b> .....	<b>109</b>
Introduzione .....	109
5.1 Modello di trasporto .....	111
5.1.1 Miscelazione nei volumi esterni alla colonna.....	111
5.1.2 Fase di adsorbimento.....	118

5.1.3	Fase di lavaggio .....	124
5.1.4	Fase di eluizione .....	126
5.1.5	Forme adimensionali e semplificate del modello di trasporto .....	130
5.2	Metodo dei momenti.....	133
5.2.1	Definizioni e generalità.....	133
5.2.2	Applicazione del metodo dei momenti su sistemi cromatografici con membrane di affinità.....	135
5.2.3	Estensione del metodo dei momenti per disturbi a gradino .....	137
	Bibliografia.....	138

## Capitolo 6:

<b>Analisi matematica dei modelli proposti .....</b>	<b>143</b>
Introduzione.....	143
6.1 Modello con distribuzione della dimensione dei pori.....	143
6.1.1 Trattazione teorica.....	144
6.1.2 Risultati del modello .....	149
6.1.3 Studio teorico delle prestazioni di colonne con membrane sovrapposte .....	152
6.1.4 Osservazioni conclusive .....	154
6.2 Modello con trasporto di materia nello strato limite .....	154
6.2.1 Formulazione del problema.....	155
6.2.2 Studio dei tempi caratteristici.....	157
6.3 Miscelazione nei volumi esterni alla colonna nella fase di eluizione.....	160
Bibliografia.....	161

## Capitolo 7:

<b>Validazione del modello matematico.....</b>	<b>163</b>
Introduzione.....	163
7.1 Modellazione della dispersione nei volumi esterni alla colonna.....	164
7.2 Modellazione dell'adsorbimento di IgG di topo su membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800 .....	167
7.3 Modellazione dell'adsorbimento di IgG umana su membrane A2P-Sartoepoxy.....	170
7.4 Modellazione dell'adsorbimento di IgG umana su membrane SartoAIMs Protein A.....	174
7.4.1 Soluzioni di IgG pura .....	175
7.4.2 Surnatante industriale .....	178
7.5 Modellazione dell'adsorbimento di IgG umana su membrane B14-TA-Sartoepoxy.....	181
7.5.1 Soluzioni di IgG pura .....	181
7.5.2 Surnatante industriale .....	184

7.6	Adsorbimento di IgG umana su membrane B14-TA-Epoxy2: modello dispersivo di equilibrio .....	185
7.6.1	Soluzioni di IgG pura .....	185
7.6.2	Surnatante industriale.....	190
	Bibliografia .....	191
	<b>Conclusioni .....</b>	<b>195</b>
	<b>Notazione Matematica .....</b>	<b>199</b>
	Lettere latine.....	199
	Lettere greche .....	203

*Essere o non essere, questo è il problema: se sia più nobile d'animo sopportare gli oltraggi, i sassi e i dardi dell'iniqua fortuna, o prender l'armi contro un mare di triboli e combattendo disperderli. Morire, dormire, nulla di più, e con un sonno dirsi che poniamo fine al cordoglio e alle infinite miserie naturale retaggio della carne, è soluzione da accogliere a mani giunte.*

*Morire, dormire, sognare forse: ma qui è l'ostacolo, quali sogni possano assalirci in quel sonno di morte quando siamo già sdipanati dal groviglio mortale, ci trattiene: è la remora questa che di tanto prolunga la vita ai nostri tormenti.*

*Chi vorrebbe, se no, sopportar le frustate e gli insulti del tempo, le angherie del tiranno, il disprezzo dell'uomo borioso, le angosce del respinto amore, gli indugi della legge, la tracotanza dei grandi, i calci in faccia che il merito paziente riceve dai mediocri, quando di mano propria potrebbe saldare il suo conto con due dita di pugnale? Chi vorrebbe caricarsi di grossi fardelli imprecando e sudando sotto il peso di tutta una vita stracca, se non fosse il timore di qualche cosa, dopo la morte, la terra inesplorata donde mai non tornò alcun viaggiatore, a sgomentare la nostra volontà e a persuaderci di sopportare i nostri mali piuttosto che correre in cerca d'altri che non conosciamo? Così ci fa vigliacchi la coscienza; così l'incarnato naturale della determinazione si scolora al cospetto del pallido pensiero. E così imprese di grande importanza e rilievo sono distratte dal loro naturale corso: e dell'azione perdono anche il nome..*

*Amleto, scena prima, atto terzo,  
William Shakespeare*





# INTRODUZIONE

La cromatografia di affinità è oggi uno tra i metodi più diffusi per la purificazione di biomolecole quali enzimi, anticorpi monoclonali, ormoni, vaccini, frammenti di DNA e RNA, ecc. Trattandosi di prodotti spesso destinati ad uso farmaceutico, è tassativo che il processo di separazione garantisca una elevata purezza della molecola d'interesse, senza però danneggiarne le caratteristiche biochimiche.

La cromatografia di affinità sfrutta le interazioni altamente specifiche tra la biomolecola da purificare e un apposito ligando immobilizzato su un supporto. Quando una miscela è alimentata alla colonna di affinità, le interazioni specifiche fanno sì che solo la biomolecola d'interesse sia trattenuta, mentre le impurità fluiscono attraverso la colonna. Quando le condizioni del mezzo vengono opportunamente cambiate, tale complesso si dissocia permettendo così il recupero del prodotto (Capitolo 1).

Una delle principali applicazioni industriali della cromatografia di affinità è la purificazione di anticorpi monoclonali (Capitolo 2). Il costo dello stadio di affinità è preponderante rispetto agli altri stadi di purificazione, e risulta dunque indispensabile la ricerca di alternative più economiche e con migliori prestazioni rispetto alla cromatografia di affinità convenzionale.

Il progetto europeo AIMS, acronimo di Advanced Interactive Materials by Design, si inserisce perfettamente in questo contesto. L'obiettivo principale del progetto è la ricerca di materiali ad alte prestazioni che consentano di ridurre i costi dell'attuale processo di purificazione selettiva nella produzione di immunoglobulina G (IgG).

Tra le alternative considerate, la cromatografia di affinità con membrane riveste un ruolo di primaria importanza. I vantaggi di questa tecnica rispetto alla cromatografia classica sono molteplici. Nei supporti cromatografici in resina infatti il trasporto di materia è limitato dalla diffusione nei pori ciechi dei granuli, mentre nelle membrane microporose il principale fenomeno di trasporto è la convezione, con un risparmio sia dei tamponi usati sia del tempo necessario per la separazione. Inoltre, le prestazioni delle membrane sono generalmente indipendenti dalla velocità dell'alimentazione, e le perdite di carico sono irrisorie se confrontate con quelle che si hanno in colonne riempite con resine. Di

conseguenza è possibile lavorare ad alte portate, con un incremento della produttività globale del processo.

Oltre al ligando naturale biospecifico per le IgG, la proteina A, sono stati valutati diversi ligandi sintetici che esibiscono una buona affinità per le IgG. Il principale vantaggio dei ligandi di sintesi è il minore costo di produzione rispetto alla proteina A. I ligandi considerati sono stati immobilizzati su diversi supporti polimerici attraverso differenti protocolli di attivazione, e le membrane di affinità ottenute sono state caratterizzate sperimentalmente in cicli completi di adsorbimento, lavaggio, eluizione e rigenerazione (Capitolo 3). Proprietà quali la capacità massima di adsorbimento ed il recupero in eluizione sono state determinate attraverso esperimenti condotti con soluzioni di IgG pura. Inoltre, per verificare la fattibilità della separazione con membrane di affinità, sono stati eseguiti cicli cromatografici con un surnatante industriale contenente IgG. In queste prove sono stati determinati importanti parametri di processo, quali la selettività dei ligandi e la purezza delle frazioni di eluizione.

Oltre allo sviluppo ed all'ottimizzazione delle matrici di affinità, anche il modulo cromatografico deve essere attentamente studiato affinché vengano pienamente sfruttate le potenzialità delle membrane (Capitolo 4). A tal proposito è stato progettato un nuovo modulo per membrane piane. Una semplice analisi fluidodinamica ha permesso di determinare la configurazione ottimale di utilizzo del nuovo modulo, mentre uno studio comparativo ha dimostrato l'effettivo miglioramento delle prestazioni del nuovo modulo cromatografico.

Lo sviluppo dei modelli matematici riveste un ruolo di fondamentale importanza per una comprensione dettagliata della cromatografia con membrane di affinità. Un buon modello consente di descrivere la risposta del sistema considerato in modo predittivo, evitando l'esigenza di effettuare campagne sperimentali lunghe, delicate e costose (Capitolo 5).

Verrà dunque fornita una panoramica dei modelli matematici esistenti per descrivere un generico processo cromatografico, ponendo particolare attenzione alla struttura che il formalismo matematico assume nel caso di membrane di affinità. I modelli proposti sono comprensivi di tutte le fasi che compongono un ciclo cromatografico, ovvero adsorbimento, lavaggio ed eluizione. Il modello si basa principalmente su un'equazione di bilancio locale di materia nella membrana porosa e un'equazione cinetica per descrivere l'interazione tra la proteina in esame ed il ligando immobilizzato sul supporto. Inoltre, per garantire una completa descrizione del sistema cromatografico in esame, il modello prende in considerazione gli effetti fluidodinamici che avvengono nei volumi esterni al modulo.

Un'interessante applicazione dei modelli matematici è quella di poter valutare l'importanza relativa dei diversi fenomeni chimici e fisici che intervengono nel processo di separazione. Saranno quindi fatte alcune considerazioni teoriche delle conseguenze causate da una distribuzione della dimensione dei pori nel supporto, e verranno analizzati i casi in cui questo effetto può essere ignorato; inoltre, attraverso un'analisi dei tempi caratteristici dei fenomeni coinvolti nel processo di separazione con membrane, sarà valutata l'influenza del trasporto di materia nello strato limite sulla globalità del processo (Capitolo 6).

Infine, i risultati sperimentali dei cicli di affinità eseguiti sono stati descritti attraverso i diversi modelli matematici proposti. A seconda del sistema sperimentale considerato, il modello è stato opportunamente adattato così da tener conto dei fenomeni cinetici e di trasporto fondamentali presenti nella colonna cromatografica (Capitolo 7).

Saranno ampiamente descritte le strategie risolutive adottate per approssimare i dati sperimentali relativi a soluzioni di IgG pura, e saranno commentati i parametri aggiustabili ottenuti ed il loro significato fisico. Infine, sulla base di questi risultati, saranno condotte delle simulazioni mirate alla descrizione dei dati sperimentali relativi a cicli cromatografici eseguiti con il surnatante industriale. La bontà del modello sarà quindi valutata sia per la capacità di riprodurre un ciclo di separazione completo, sia per l'abilità di descrivere il comportamento di miscele complesse.



---

# CAPITOLO 1

---

## CENNI INTRODUTTIVI ALLA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

### Introduzione

La cromatografia è il metodo di purificazione di biomolecole più diffuso per la sua versatilità, alta selettività ed efficienza. Anche se si stanno studiando altre tecniche alternative da applicare nei primi stadi del processo di separazione, come ad esempio l'estrazione liquido-liquido, la cromatografia non può essere sostituita negli stadi finali, nei quali si mira al raggiungimento di un'elevata purezza del prodotto [1].

La cromatografia è sostanzialmente un adsorbimento a letto fisso, in cui viene alimentata una soluzione contenente una miscela di composti da purificare ad una colonna riempita con del materiale cromatografico. Eccetto la cromatografia ad esclusione di forma, in tutti i più comuni processi industriali i soluti vengono adsorbiti dal materiale di riempimento finché non viene saturata la capacità del letto. La colonna deve poi essere lavata per rimuovere le impurità dalle regioni interstiziali del letto prima dell'eluizione dei soluti. Quest'ultima fase viene eseguita utilizzando solventi che rompono il legame delle proteine con il supporto solido, permettendo il loro recupero. Nella cromatografia ad esclusione di forma (o gel-permeazione), il principio di separazione è basato sulla diversa struttura e dimensione molecolare dei componenti, che determinano differenti velocità di migrazione attraverso la colonna.

Grazie alla quantità di possibili interazioni chimiche tra biomolecola e supporto oltre ad una vasta disponibilità di mezzi adsorbenti, numerose tecniche cromatografiche sono oggi disponibili, come la cromatografia a scambio ionico, ad

interazione idrofobica, esclusione di forma e cromatografia di affinità. La scelta di un metodo piuttosto di un altro scaturisce dallo studio di proprietà quali la composizione della miscela di partenza, la struttura chimica e la stabilità dei componenti, la carica elettrica ad un fissato pH e il punto isoelettrico della proteina, il carattere idrofilo o idrofobo dei componenti e la dimensione delle molecole.

Il presente lavoro di tesi verterà sulla purificazione di proteine mediante cromatografia di affinità, pertanto si rimanda a testi specifici per approfondire le altre tecniche cromatografiche esistenti.

## 1.1 La cromatografia di affinità

La cromatografia di affinità, sviluppata tra gli anni '60 e '70, è oggi uno tra i metodi più diffusi per la purificazione di biomolecole contenute in fluidi complessi di provenienza biologica. Nell'industria farmaceutica molecole come enzimi, anticorpi monoclonali, ormoni, vaccini, frammenti di DNA e RNA e addirittura cellule intere o sue frazioni sono purificate mediante separazioni cromatografiche di affinità [2, 3, 4].

Il primo articolo che tratta la cromatografia di affinità sembra essere quello di Lerman [5], il quale dà una magnifica spiegazione del principio su cui si basa questa tecnica:

*It is at present accepted that the action of an enzyme requires as a first step the temporary combination of the substrate with a specific site on the enzyme, and that competitive inhibitors act by reversibly substituting for the substrate in combination with the specific site. If then, a specific competitive inhibitor or a suitable substrate of an enzyme is coupled to the surface of an inert solid, it may be expected that the enzyme will be reversibly bound to the solid through combination with the attached group, while enzymes with different specificities or other proteins will not be bound. The enzyme could later be released by a change in the medium to conditions unfavorable for combination, as, for example, change in pH or salt concentration. Alternatively by the use of a solution of a competitive inhibitor (not necessarily the same as that coupled to the adsorbent) the enzyme will, according to the principle of mass action, be returned into solution by an additional specific process. Thus the isolation of the enzyme would depend directly on its catalytic specificity rather than, as in conventional procedures, its properties as a protein.*

La cromatografia di affinità è applicata per la separazione di una specifica proteina o di una classe di biomolecole strutturalmente simili da miscele grezze, brodi di fermentazione, lisati cellulari, ecc. Questa tecnica sfrutta le interazioni altamente specifiche tra la proteina d'interesse e un apposito ligando immobilizzato su un supporto; da un punto di vista puramente teorico la cromatografia di affinità può essere usata per l'isolamento di una biomolecola direttamente da miscele grezze in un unico stadio. Tra gli esempi di interazione di affinità ricordiamo le coppie antigene – anticorpo, ormone – recettore, enzima – substrato e ione metallico – ligando chelante.

La tecnica prevede che il composto da purificare si leghi reversibilmente al ligando. Quando una miscela è alimentata alla colonna di affinità, le interazioni specifiche fanno sì che solo la biomolecola d'interesse sia trattenuta, mentre le impurità fluiscono attraverso la colonna. Quando le condizioni del mezzo vengono opportunamente cambiate tale complesso si dissocia permettendo così il recupero della biomolecola di interesse.

Il metodo necessita, dunque, di una dettagliata conoscenza della struttura e delle specificità del composto da purificare, in modo da poter predisporre accuratamente le condizioni di separazione che diano la resa più elevata.

La cromatografia di affinità è una tecnica di separazione particolarmente efficace per sostanze molto delicate, come ad esempio i prodotti dell'industria farmaceutica e alimentare (enzimi, antibiotici, ecc.). I processi di separazione tipicamente usati nell'industria chimica, come la distillazione e l'evaporazione, infatti lavorano con solventi aggressivi o condizioni di processo (pH, temperatura, ecc.) particolarmente stressanti.

Trattandosi di biomolecole spesso destinate ad uso farmaceutico, un requisito chiave per la scelta del processo è la possibilità di ottenere un'elevata purezza dei prodotti. Si ricorda che in un processo la fase di separazione è quasi sempre quella economicamente più impegnativa ed incide in maniera preponderante sul costo del prodotto finito. La cromatografia di affinità è in particolar modo usata per la separazione di biomolecole proprio perché consente di raggiungere elevati livelli di purezza. Questa caratteristica è dovuta all'interazione specifica e reversibile che avviene fra il ligando e la biomolecola da purificare.

Sul supporto viene immobilizzato il ligando affine al legante; in questo modo è garantita la facilità e la selettività della formazione di un legame chimico reversibile tra i due. La selettività è assicurata dall'elevata affinità che si basa sul riconoscimento specifico del dominio proteico d'interesse da parte del ligando e non dipende da proprietà chimiche o da dimensioni fisiche che potrebbero essere comuni ad una classe più ampia di proteine. Inoltre la reversibilità del legame formatosi rende generalmente semplice la fase di eluizione, ovvero lo stadio in cui

si riporta in soluzione la biomolecola legata al ligando, e le condizioni blande in cui si esegue questa fase evitano ogni pericolo di denaturazione. Tipicamente infatti, l'interazione tra il ligando e la macromolecola, proprio per la sua natura reversibile, è un legame di tipo chimico debole, costituito da forze di Van der Waals, forze elettrostatiche, legami idrogeno e interazioni idrofobiche.

Le separazioni di affinità vengono generalmente effettuate in tre stadi successivi: adsorbimento, lavaggio ed eluizione (Figura 1.1). Nella prima fase la soluzione da purificare viene messa a contatto con la matrice solida su cui viene adsorbita la proteina di interesse. Nella fase di lavaggio vengono eliminate le molecole rimaste intrappolate nel supporto o legate con interazioni non specifiche. Infine nella fase di eluizione viene scisso il complesso specifico tramite un cambiamento delle condizioni ambientali, permettendo così di recuperare la proteina di interesse. Tale cambiamento può essere specifico, o non specifico. L'eluizione di affinità consiste nel mettere a contatto con il sistema una soluzione contenente un composto competitivo con il ligando. L'eluizione non specifica avviene invece cambiando le condizioni operative come pH, forza ionica (ottenuta solitamente mediante l'aggiunta di sali), ecc.

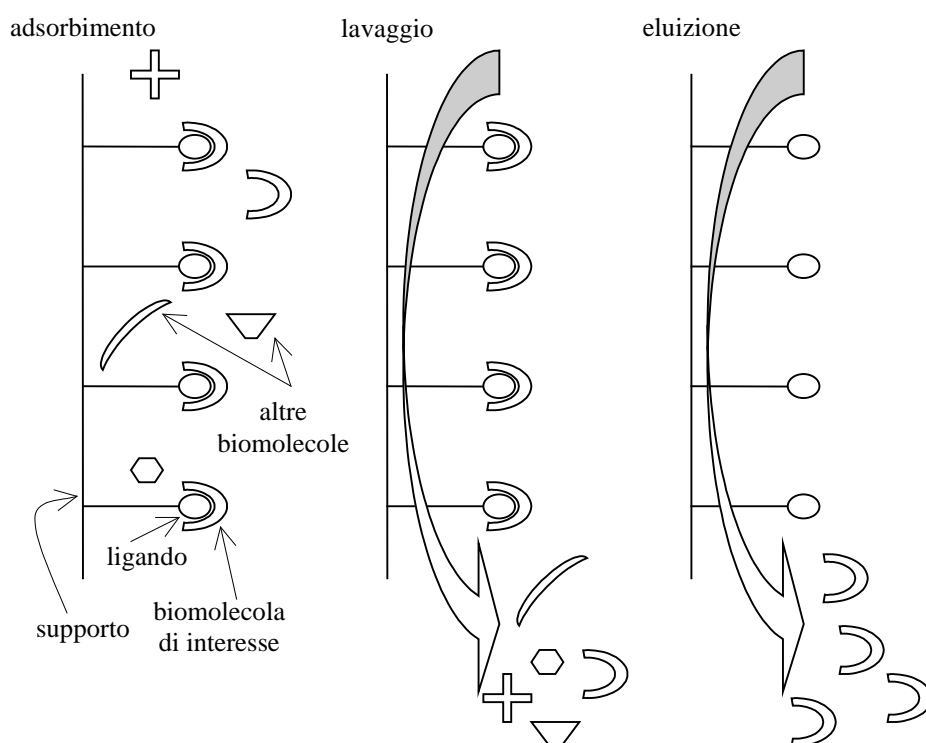


Figura 1.1: Schema semplificato del processo di separazione di cromatografia di affinità.

Va considerato anche un quarto stadio detto di sanitizzazione del supporto, non legato direttamente al recupero del soluto, ma alla rigenerazione del supporto



stesso, per riportarlo in condizioni di sterilità, necessarie in processi alimentari e farmaceutici, e quindi ugualmente importante nella globalità del processo.

Nelle applicazioni cromatografiche, si definisce curva di breakthrough (BTC) l'andamento in funzione del tempo della concentrazione di proteina nella soluzione in uscita dal modulo. La valutazione di un processo di separazione di affinità è in gran parte basato sul risultato della BTC. Idealmente questa dovrebbe presentare un gradino in corrispondenza della saturazione delle membrane, passando da una concentrazione in uscita nulla ad una pari a quella dell'alimentazione. Attualmente le BTC presentano una crescita graduale di concentrazione a causa delle non idealità del sistema come, ad esempio, fenomeni di miscelamento, maldistribuzioni del flusso e cinetiche di adsorbimento lente [6]. Una tipica BTC è riportata in Figura 1.2: inizialmente la concentrazione in uscita è nulla in quanto la proteina è completamente trattenuta dalla colonna; quando quest'ultima inizia a saturarsi, la concentrazione in uscita aumenta fino a raggiungere un valore pari a quello dell'alimentazione. Quantitativamente, l'area sottesa dalla curva rappresenta la quantità di proteina in uscita dalla colonna e quindi persa, mentre l'area compresa tra la curva e la retta passante per  $c = c_0$  corrisponde alla massa di proteina adsorbita, da cui è possibile valutare la capacità dinamica della colonna [7].

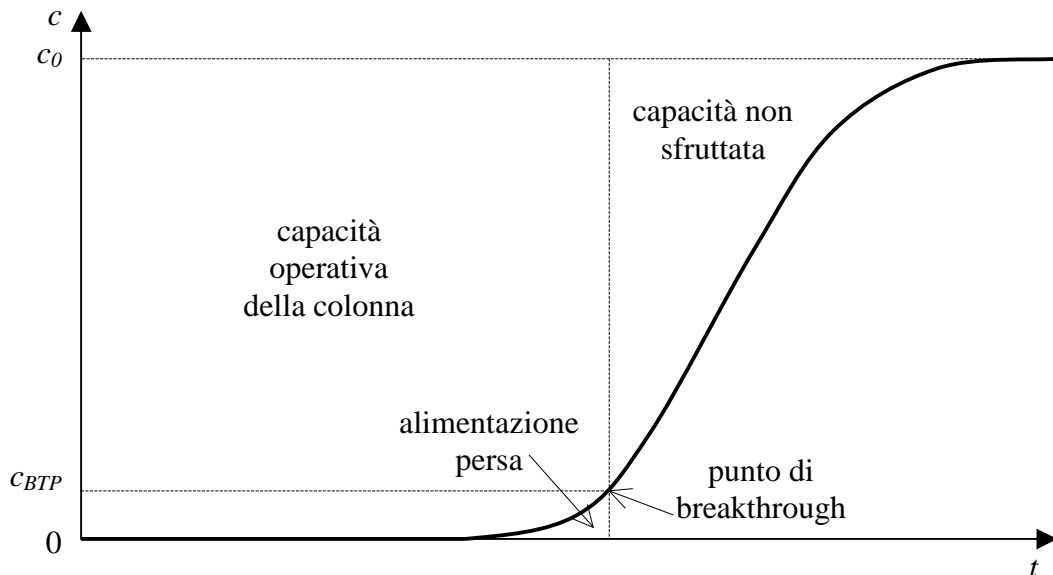


Figura 1.2: Profilo qualitativo di una curva di breakthrough per un generico processo di cromatografia di affinità. Quando la fase di adsorbimento viene fermata nel punto di breakthrough ( $c = c_{BTP}$ ), una piccola quantità di alimentazione è stata persa e parte della capacità totale della colonna non è stata utilizzata.

La posizione della curva di breakthrough lungo l'asse dei tempi dipende dalla capacità della colonna e dalla concentrazione di soluto nell'alimentazione. Una maggiore capacità di adsorbimento, a parità di concentrazione nell'alimentazione,

sposta la curva di breakthrough verso destra; analogamente, a parità di capacità, una diminuzione della concentrazione nell'alimentazione trasla in avanti la breakthrough lungo l'asse dei tempi.

Nei processi industriali la fase di adsorbimento viene fermata nel punto di breakthrough (BTP), ovvero nel momento in cui la concentrazione in uscita dalla colonna è pari ad una determinata frazione della concentrazione dell'alimentazione<sup>1</sup>,  $c_{BTP}$ . Si evita così di perdere una quantità considerevole di soluto, di solito ad alto valore aggiunto, a scapito però dell'incompleto sfruttamento della colonna. È quindi estremamente importante cercare di lavorare con sistemi in cui la capacità della colonna sia alta e la BTC abbia una pendenza molto ripida.

Molte informazioni necessarie per stabilire le prestazioni del processo sono contenute nella BTC, come la capacità dinamica della colonna utilizzata, il quantitativo di soluto perso in uscita e il tempo di processo.

Anche se la fase di adsorbimento è molto importante e caratterizza la maggior parte delle prestazioni del processo di separazione, si ricorda che un ciclo cromatografico è composto anche dalle fasi di lavaggio e di eluizione. Un profilo qualitativo di un intero ciclo cromatografico è presentato in Figura 1.3.

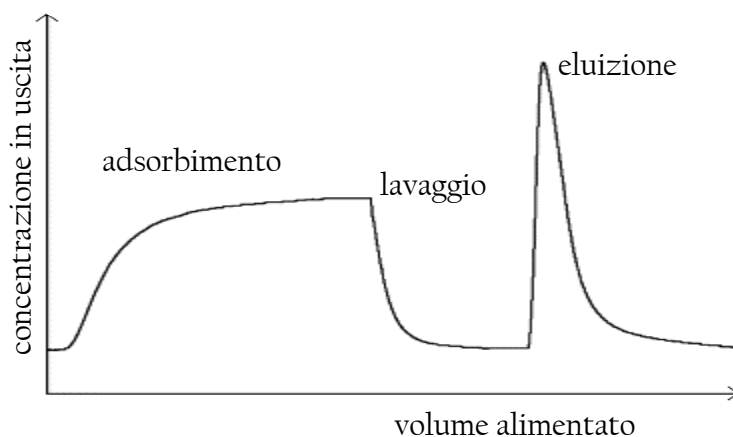


Figura 1.3: Profilo qualitativo di un ciclo completo di affinità. È possibile distinguere le fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione.

Nella fase di lavaggio vengono eliminate le molecole rimaste intrappolate nel supporto o legate con interazioni non specifiche, per cui in termini qualitativi il profilo della concentrazione in uscita dal modulo è decrescente col tempo. L'area

<sup>1</sup> In genere il processo viene arrestato quando la concentrazione in uscita dalla colonna cromatografica è pari al 10% della concentrazione nell'alimentazione. Tuttavia il punto di breakthrough dipende dal sistema considerato: per soluti molto preziosi, in cui è preferibile una minore utilizzazione della colonna piuttosto che una perdita della biomolecola, si arresta il processo quando la concentrazione in uscita è solo il 5% rispetto quella nell'alimentazione; per soluti di basso valore invece può risultare opportuno proseguire il processo fino ad una concentrazione in uscita pari al 20% di quella nell'alimentazione, garantendo così un migliore sfruttamento della colonna.

sottesa dalla curva di lavaggio chiaramente corrisponde alla quantità di proteina che è stata asportata durante il lavaggio. È bene non sottovalutare quest'informazione, indispensabile per eseguire un corretto bilancio di materia del soluto e determinare la quantità di proteina rimasta effettivamente adsorbita sul supporto.

Infine, nella fase di eluizione viene recuperata la proteina di interesse grazie ad un opportuno cambio della fase mobile. In questo stadio il profilo della concentrazione mostra un caratteristico picco detto appunto di eluizione, corrispondente all'uscita del soluto dalla colonna. Anche in questo caso l'area sottesa dal picco di eluizione equivale alla massa di biomolecola recuperata.

### 1.1.1 Tecnologie di affinità con resine e membrane

Le principali tecnologie disponibili per le separazioni di affinità possono essere classificate in base al meccanismo di trasporto dominante che permette alla biomolecola di entrare in contatto con il ligando: diffusivo, perfusivo e convettivo (Figura 1.4) [8].

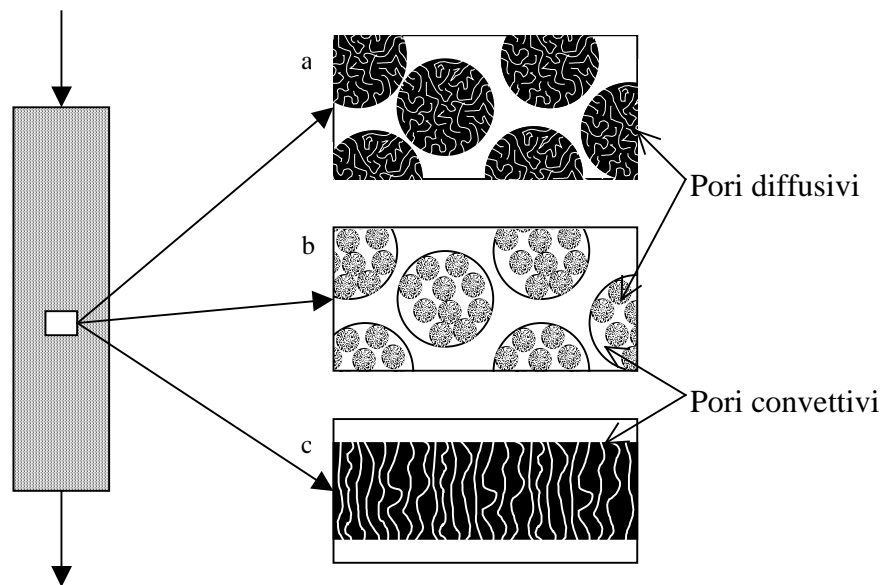


Figura 1.4: Schemi dei diversi tipi di cromatografia di affinità. (a) particelle diffuse, (b) particelle perfusive, (c) membrane microporose.

Attualmente il metodo più diffuso è quello costituito da una colonna impaccata in cui la fase adsorbente è composta da particelle porose, tipicamente del diametro di 50 – 100  $\mu\text{m}$ , sulle quali è immobilizzato il ligando (Figura 1.4a). Un sistema del genere ha prestazioni limitate a causa delle grandi distanze che il soluto deve percorrere nei pori per diffusione affinché interagisca con il ligando. L'uso di particelle più piccole, con maggior area superficiale e minor distanza diffusiva ha

lo svantaggio di far aumentare drasticamente le perdite di carico, con costi decisamente più alti che non giustificano l'incremento delle prestazioni della colonna.

La cromatografia di affinità con particelle perfusive si basa sull'uso di materiali di riempimento con struttura biodispersa sulle quali è immobilizzato il ligando (Figura 1.4b). Tali particelle hanno una rete di pori convettivi, detti anche pori diretti, ed una seconda rete di pori più piccoli che rende intercomunicanti i pori diretti. Nelle particelle adsorbenti di tipo perfusivo, la velocità convettiva non è nulla. Questa caratteristica aiuta a superare le limitazioni che si hanno nei processi convenzionali con particelle puramente diffusive.

Il processo con membrane di affinità è schematizzabile come una larga e sottile colonna cromatografica, in cui il riempimento di materiale adsorbente è costituito da diverse membrane microporose sovrapposte (Figura 1.4c). Generalmente i pori sono dell'ordine di 0,4 – 3,0  $\mu\text{m}$ , mentre la porosità del mezzo solitamente varia tra 0,6 e 0,8. Il ligando è immobilizzato principalmente sulla superficie interna dei pori. Il flusso convettivo che si ha attraverso i pori elimina le limitazioni date dalla diffusione. Inoltre le perdite di carico sono decisamente più basse, con il risultato di un processo meno costoso. Infine, le fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione sono più brevi, quindi diminuisce la probabilità di denaturazione della biomolecola a causa di un'eventuale esposizione ad ambienti sfavorevoli.

La ricerca di nuove matrici per cromatografia con alta permeabilità e buona efficienza ha portato all'avvento dei materiali monolitici [9]. Un monolite consiste in un unico blocco di un materiale poroso. Le colonne monolitiche hanno caratteristiche molto simili a quelle sopra enunciate per le membrane.

## 1.2 Membrane versus resine: quale supporto usare?

### 1.2.1 Vantaggi delle membrane

Tra i problemi principali caratterizzanti un letto impaccato spiccano senza dubbio le alte perdite di carico, che tendono tra l'altro ad aumentare durante il processo a causa degli effetti combinati di compressione del letto, causato dalla deformazione della fase solida, e di intasamento della colonna, dovuto ad un accumulo di materiale colloidale. Un'altra grossa limitazione dei processi di bioseparazione cromatografici convenzionali è la forte dipendenza dalla diffusione per il trasporto delle molecole di soluto sui relativi siti di legame posti entro i pori delle particelle (Figura 1.5). Ciò si traduce in alti tempi necessari per la separazione, in quanto il trasporto di materia per diffusione è lento rispetto a quello per convezione. Conseguentemente aumenta anche il volume di liquido che

serve per recuperare la proteina (tampone di eluizione); inoltre il soluto è esposto per tempi maggiori ad ambienti che potrebbero essere tali da portare alla sua denaturazione. Un altro serio problema è il channeling, ovvero la formazione di passaggi preferenziali per il flusso della soluzione, che conduce ad una scarsa utilizzazione del letto. Altri problemi sono legati al fenomeno della dispersione radiale ed assiale.

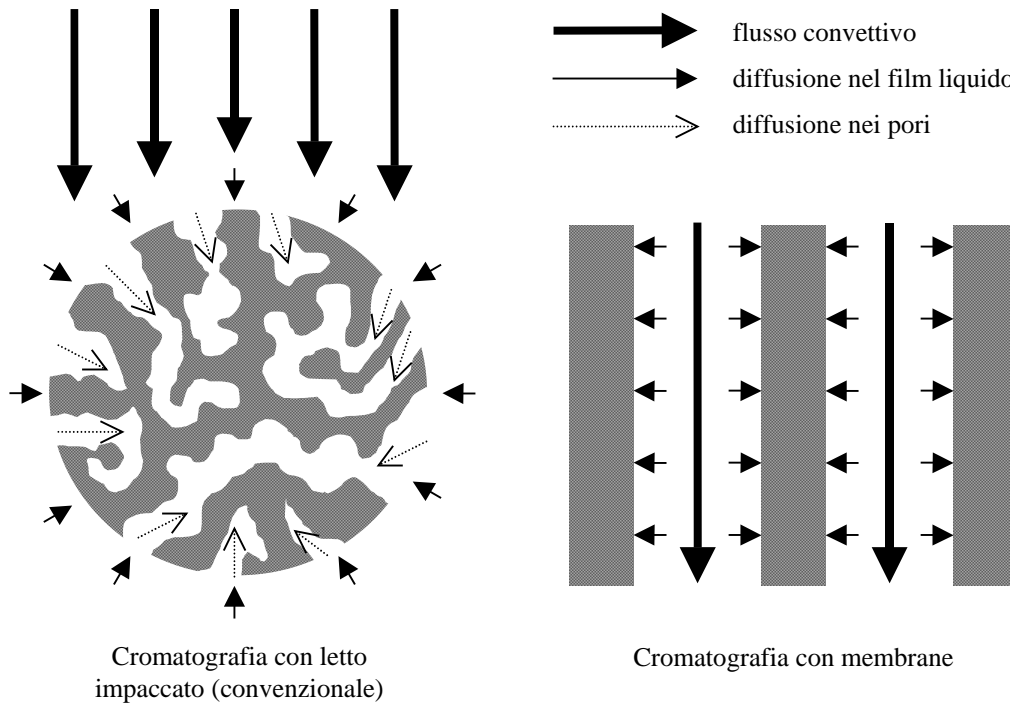


Figura 1.5: Trasporto dei soluti nella cromatografia con letto impaccato e con membrane.

Nei processi cromatografici con membrane di affinità il fenomeno di trasporto predominante è quello convettivo (Figura 1.5), con un risparmio sia di volume di eluente necessario che di tempo di esecuzione della separazione. L'efficienza di separazione è generalmente indipendente dalla portata dell'alimentazione in un ampio intervallo, quindi è possibile lavorare con portate relativamente alte. Inoltre, le perdite di carico sono irrisorie se confrontate con quelle che si hanno in letti impaccati. Un altro grosso vantaggio è la facilità dello scale-up del processo, anche se questa potenzialità non è ancora stata pienamente sfruttata a livello industriale [10].

Una critica che viene spesso indirizzata alle membrane di affinità è la bassa capacità di legame dovuta al basso rapporto tra l'area superficiale e il volume. La soluzione più immediata per ovviare a questo problema sarebbe lo sviluppo di membrane con un'area superficiale più alta. Questo obiettivo non è semplice da raggiungere, in quanto si potrebbero compromettere delle caratteristiche

fondamentali come la resistenza meccanica e la distribuzione uniforme del diametro dei pori.

La cromatografia con membrane è invece particolarmente indicata per grandi biomolecole (peso molecolare superiore a 150 KDa), come per proteine di grandi dimensioni, virus e frammenti di DNA [11, 12]. Difatti i pori diffusivi delle resine convenzionali non hanno un diametro sufficientemente grande per permettere l'accesso a tali biomolecole, per cui la superficie interna non è pienamente sfruttata e l'adsorbimento è limitato alla superficie esterna dei granuli [13, 14].

## 1.2.2 Svantaggi delle membrane

Nonostante i vantaggi esposti nel precedente paragrafo, la cromatografia di affinità con membrane presenta qualche problema che deve essere ancora risolto, o, per usare termini più ottimistici, la ricerca deve ancora superare alcune limitazioni al fine di perfezionare il processo.

### 1.2.2.1 Distribuzione del flusso in ingresso

I problemi legati alla distribuzione del flusso in ingresso sono particolarmente rilevanti nel caso di cromatografia con membrane a causa della grande sezione frontale rispetto all'altezza delle membrane. Tra i tubi dell'impianto e l'ingresso nel modulo generalmente si ha un notevole allargamento di sezione; è molto importante che l'alimentazione sia ben distribuita sull'ingresso per evitare drastiche cadute delle prestazioni del sistema. Questo problema è stato risolto grazie ad un apposito distributore radiale, che idealmente dovrebbe permettere al fronte dei soluti di arrivare simultaneamente alla prima membrana [15]. Questa situazione è piuttosto difficile da verificare. Infatti, una prima dispersione del fronte dei soluti ha luogo negli stessi tubi del sistema, a causa di un profilo di velocità sviluppato. Tale fenomeno è però minimo se confrontato con le inefficienze nel distributore di flusso, che provocano un'ulteriore distorsione del fronte dei soluti [10].

Lo studio della fluidodinamica del sistema e una buona progettazione del distributore dell'alimentazione rendono la cromatografia con membrane un processo molto più competitivo.

Per maggiori dettagli su questo aspetto si rimanda il lettore al Capitolo 4 del presente lavoro di tesi, in cui è stata presa in attenta considerazione la distribuzione radiale del flusso in un nuovo modulo a membrane.

### **1.2.2.2 Distribuzione della dimensione dei pori**

I pori presenti in membrane microporose e macroporose non hanno diametro uniforme ma presentano una distribuzione della dimensione dei pori.

Un mezzo poroso con pori di dimensione molto variabile comporta il passaggio preferenziale del flusso attraverso gli interstizi più larghi, e solamente una piccola parte di alimentazione si snoda nei pori più piccoli. Ciò implica un'enorme diminuzione delle prestazioni nel modulo, come dimostrato in maniera indipendente da Suen ed Etzel [16] e da Liu e Fried [17]. Per non avere effetti rilevanti, i pori devono avere diametro che differisca al massimo dell'1% rispetto al diametro medio. Per ovviare questo problema, in letteratura è consigliato l'uso di un numero sufficientemente elevato di membrane tra loro sovrapposte in modo da limitare la formazione di flussi preferenziali.

Anche quest'argomento è stato ampiamente studiato durante il dottorato di ricerca e sarà trattato nel § 6.1.

### **1.2.2.3 Variazione dello Spessore della Membrana**

Anche la variazione dello spessore della membrana comporta problemi simili a quelli visti nel caso di una non uniforme distribuzione dei pori. Il flusso è infatti favorito dove lo spessore è più piccolo in quanto è minore la resistenza al passaggio della soluzione. Questo fattore è comunque meno influente rispetto a quello precedentemente discusso: bisogna infatti mantenere al di sotto del 3% la variazione dello spessore per non avere marcate diminuzioni di prestazioni [16].

In ogni caso, tale problema non è normalmente associato alle membrane disponibili in commercio che presentano un'ottima uniformità di spessore. È consigliato comunque l'uso di un numero sufficiente di membrane sovrapposte per ridurre eventuali difetti di produzione.

## **1.2.3 Osservazioni conclusive**

La cromatografia con membrane di affinità ha delle prospettive di applicazione come processo alternativo ai processi cromatografici convenzionali. A causa del suo recente sviluppo è una tecnica ancora poco sfruttata, e la ricerca deve ancora migliorarne la competitività. Le aree di studio in cui bisogna concentrare l'attenzione sono [10]:

- perfezionamento della progettazione dell'impianto e dei moduli;
- sviluppo di nuove membrane;
- studio e selezione delle membrane esistenti in commercio per eventuali applicazioni nelle separazioni di affinità;

- analisi dei sistemi in cui è potenzialmente vantaggiosa l'applicazione delle membrane di affinità.

## Bibliografia

1. Henry J. D., Prudich M. E., Eykamp W., Hatton T. A., Johnston K. P., Lemert R. M., Lemlich R., Moyers C. G., Newman J., Pohl H. A., Pollock K., Thien M. P., *Alternative separation processes*, in Perry R. H., Green D. W., Maloney J. O., *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, settima edizione, 1998, McGraw – Hill, Sidney, Australia.
2. Zou H., Luo Q., Zhou D., *Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001, 49, 199–240.
3. Zeng X. F., Ruckenstein E., *Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation*, Biotechnology Progress, 1999, 15, 1003–1019.
4. Klein E., *Affinity membranes. Their chemistry and performance in adsorptive separation processes*, 1991, John Wiley & Sons, New York.
5. Lerman, L. S., *A biochemically specific method for enzyme isolation*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1953, 39, 232–236.
6. Kochan, J. E., Wu, Y. J., Etzel, M. R., *Purification of bovine immunoglobulin G via Protein G affinity membranes*, Industrial Engineering and Chemistry Research, 1996, 35, 1150–1155.
7. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R., *Analysis of affinity separations I: predicting the performance of affinity adsorbers*, The Chemical Engineering Journal, 1985, 30, B9–B23.
8. Tejeda-Mansir, A., Montesinos, R. M., Guzmán, R., *Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001, 49, 1–28.
9. Guiochon, G., *Monolithic columns in high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 2007, 1168, 101–168.
10. Ghosh, R., *Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges*, Journal of Chromatography A, 2002, 952, 13–27.



11. Yang, H., Viera, C., Fischer, J., Etzel, M. R., *Purification of a large protein using ion-exchange membranes*, Industrial & Engineering Chemistry Research, **2002**, *41*, 1597–1602.
12. Endres, H. N., Johnson, J. A. C., Ross, C. A., Welp, J. K., Etzel, M. R., *Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA*, Biotechnology and Applied Biochemistry, **2003**, *37*, 259–266.
13. Zöchling, A., Hahn, R., Ahrer, K., Urthaler, J., Jungbauer, A., *Mass transfer characteristics of plasmids in monoliths*, Journal of Separation Science, **2004**, *27*, 819–827.
14. Urthaler, J., Schlegl, R., Podgornik, A., Strancar, A., Jungbauer, A., Necina, R., *Application of monoliths for plasmid DNA purification. Development and transfer to production*, Journal of Chromatography A, **2005**, *1065*, 93–106.
15. Etzel, M. R., *Layered Stacks*, in: Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z., *Monolithic Materials*, Journal of Chromatography Library, **2003**, *67*, 213–233.
16. Suen, S. Y., Etzel, M. R., *A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations*, Chemical Engineering Science, **1992**, *47*, 1355–1364.
17. Liu, H. C., Fried, J. R., *Breakthrough of lysozyme through an affinity membrane of cellulose-cibacron blue*, AIChE Journal, **1994**, *40*, 40–49.



---

# CAPITOLO 2

---

## PROCEDURE SPERIMENTALI E SISTEMI STUDIATI

### Introduzione

La produzione degli anticorpi monoclonali (Mabs) riveste un ruolo di primaria importanza nell'attuale industria biotecnologica. Basti pensare che circa il 20% dei test clinici è basato su tecniche che utilizzano anticorpi monoclonali [1]. Le applicazioni terapeutiche degli anticorpi monoclonali sono molteplici: l'artrite reumatoide, la profilassi antivirale e il morbo di Crohn sono solo alcuni esempi. Inoltre sono utilizzati per ridurre le possibilità di rigetto a seguito di trapianti e come cura contro il cancro [2].

La maggior parte delle terapie basate su anticorpi richiedono alti dosaggi per lunghi periodi di tempo, dunque per ogni paziente sono necessarie ingenti quantità di farmaco [3]. La produzione di anticorpi è in continuo aumento per soddisfare la crescente richiesta; inoltre, più di 200 nuovi prodotti a base di anticorpi sono attualmente in fase di sperimentazione clinica [4]. È evidente quindi l'enorme pressione economica che grava su questo settore dell'industria farmaceutica.

Gli anticorpi sono prodotti attraverso un primo stadio di coltura cellulare seguito dal recupero e purificazione della proteina. Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi diretti verso il miglioramento del controllo del bioreattore e l'ottimizzazione del substrato, con il risultato di aumentare il titolo di proteina espressa nella coltura cellulare da pochi milligrammi per litro a qualche grammo per litro [5]. Tuttavia, l'aumento di produttività nella fase di coltura non si riflette anche nella fase di purificazione, in cui i costi necessari per le resine cromatografiche, i tamponi di lavaggio e sanitizzazione ecc. sono proporzionali alla massa di anticorpo prodotto. Affinché gli stadi di separazione

non si rivelino il collo di bottiglia dell'intero processo di produzione, è indispensabile che la fase di purificazione sia ottimizzata, sia in termini di efficienza che economici.

In Figura 2.1 è mostrato uno schema di un impianto di produzione industriale di anticorpi. Il primo stadio nella catena dei processi di separazione è costituito dal trattamento della coltura per la rimozione dei frammenti cellulari, seguito da una fase di purificazione selettiva normalmente condotta tramite cromatografia di affinità con resine proteina A. Per garantire l'elevata purezza richiesta dall'industria farmaceutica, sono infine eseguiti alcuni stadi cromatografici con colonne a scambio ionico (IEX) e ad interazioni idrofobiche (HIC), oltre alla fase di disattivazione virale.

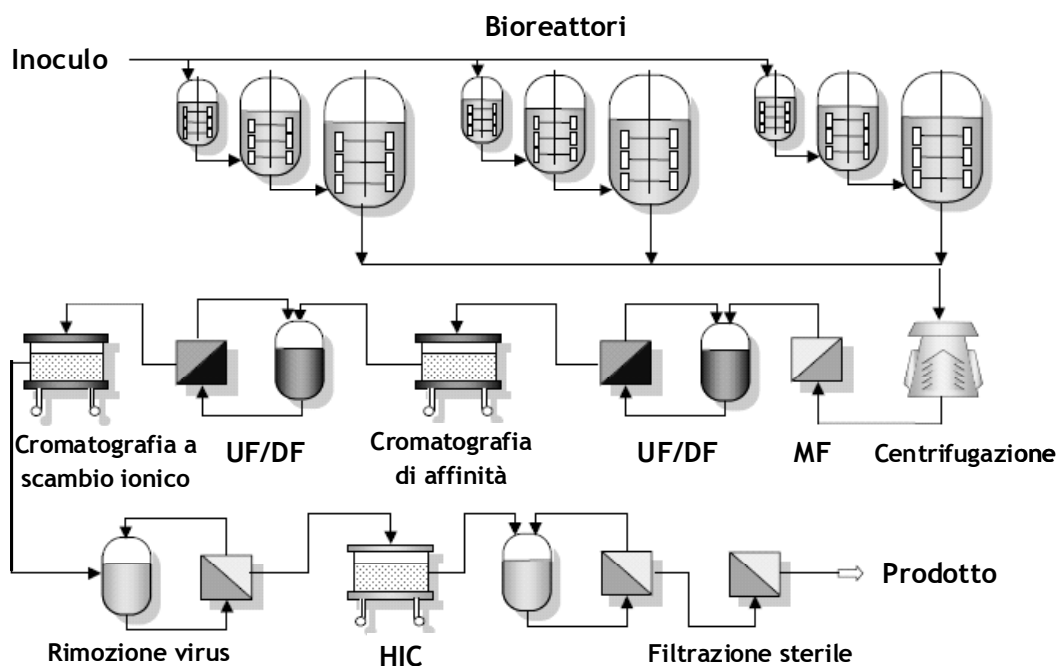


Figura 2.1: Schema di un impianto per la produzione di anticorpi.

Attualmente, l'insieme dei processi di purificazione costituisce circa il 50 ÷ 80% dei costi totali di produzione [6]. In particolare, uno studio interno condotto dalla Bayer ha mostrato che i costi della fase di purificazione selettiva rappresentano circa il 90% dei costi di purificazione, e il 35 ÷ 45% dei costi totali di produzione.

## 2.1 Progetto europeo AIMs

Il progetto europeo AIMs, acronimo di Advanced Interactive Materials by Design, si prefigge l'obiettivo di ricercare materiali con alte prestazioni e di sviluppare metodi di separazione più economici dell'attuale purificazione selettiva per la produzione di immunoglobulina G (IgG). L'attenzione è rivolta

contemporaneamente allo sviluppo di nuovi materiali e all'ottimizzazione del processo, in modo da favorire l'aumento delle prestazioni delle nuove alternative (Figura 2.2).

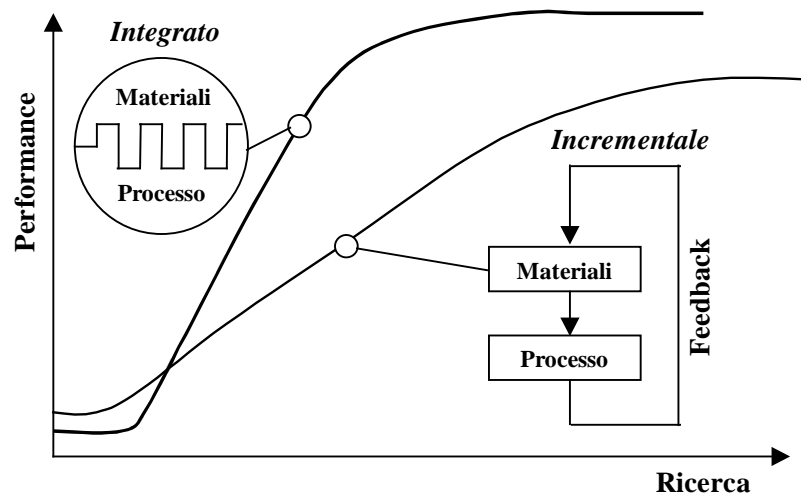


Figura 2.2: Integrazione tra sviluppo dei materiali e del processo.

I processi alternativi che sono stati studiati durante il progetto sono:

- sviluppo di nuovi materiali per cromatografia convenzionale;
- sviluppo di membrane di affinità competitive con la cromatografia classica;
- studio della purificazione di immunoglobuline mediante estrazione liquido – liquido.

Il progetto si è sviluppato attraverso la collaborazione di diversi gruppi di ricerca europei, sia provenienti da università che da industrie e compagnie private.

Il lavoro condotto in questo lavoro di tesi è incentrato sullo studio delle membrane di affinità fornite dai collaboratori del progetto o funzionalizzate nei nostri laboratori. In particolare il nostro gruppo di ricerca ha lavorato in stretta collaborazione con Sartorius Stedim Biotech, il produttore delle membrane, con Xeptagen e Prometic Biosciences che hanno realizzato i ligandi di affinità sintetici, con l'Università di Twente che ha determinato le proprietà strutturali dei materiali di affinità, con l'Università di Vienna che si è incaricata di funzionalizzare alcune delle membrane sviluppate, e con Bayer Technology Services, in collaborazione con la quale sono stati eseguiti alcuni esperimenti con impianti di purificazione su scala pilota.

## 2.2 Le immunoglobuline

Le immunoglobuline, dette comunemente anticorpi, sono delle glicoproteine prodotte dai linfociti come risposta alla presenza di un agente esterno, ovvero un antigene [7].

Dal punto di vista strutturale, le immunoglobuline sono formate dall'unione di due coppie di catene amminoacidiche unite tra loro da ponti disolfuro: due catene leggere, indicate con L (light) e due catene pesanti denotate con la lettera H (heavy). Ogni catena leggera è legata ad una catena pesante, ed a sua volta le due catene pesanti sono legate tra loro in una regione specifica detta cerniera. La formula di struttura generale di un'immunoglobulina è dunque H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. L'unità base ha una massa molare di circa 150 kDa e una quota di 4-18% di carboidrati. Ciascuna catena leggera è costituita da 220 amminoacidi ed ha un peso molecolare di circa 25 kDa, mentre le catene pesanti sono costituite ciascuna da 440 amminoacidi con un peso molecolare di circa 50 kDa (Figura 2.3).

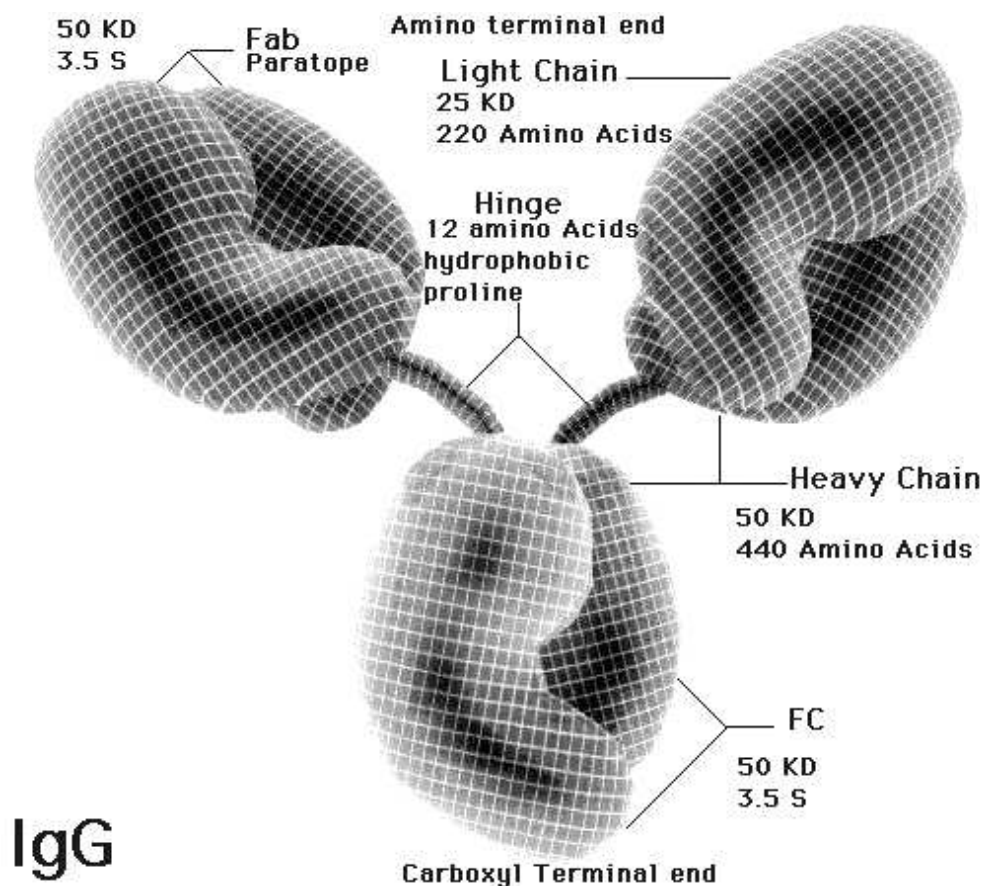


Figura 2.3: Struttura generale di una immunoglobulina.

Nella struttura delle immunoglobuline è possibile distinguere tre porzioni: una Fc (Fragment Crystallizable) e due Fab (Fragment Antigen Binding). Ogni Fab è composto da una catena leggera e parte della catena pesante. E' questa la regione

delle immunoglobuline che lega l'antigene. La zona Fc non partecipa direttamente al legame con l'antigene, ma è responsabile dell'attivazione della risposta immunitaria.

Le porzioni N-terminali delle quattro catene presentano una notevole variabilità della sequenza amminoacidica, e vengono pertanto indicate con la lettera V (rispettivamente  $V_L$  e  $V_H$ ). Alcune sequenze delle regioni variabili presentano un grado di variabilità particolarmente elevato; in particolare, sono stati individuati tre segmenti ipervariabili nella catena leggera e tre nella catena pesante. Il cambiamento di un solo amminoacido in una sola delle catene comporta una notevole modifica delle proprietà della immunoglobulina, si spiega quindi l'enorme numero di antigeni che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario e l'elevata specificità della risposta immunitaria (Figura 2.4).

Le restanti parti delle catene sono relativamente costanti, e vengono indicate con la lettera C (rispettivamente  $C_L$  e  $C_H$ ). Le differenze nella sequenza delle catene costanti contraddistinguono le varie classi di immunoglobuline, che nell'uomo sono cinque: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

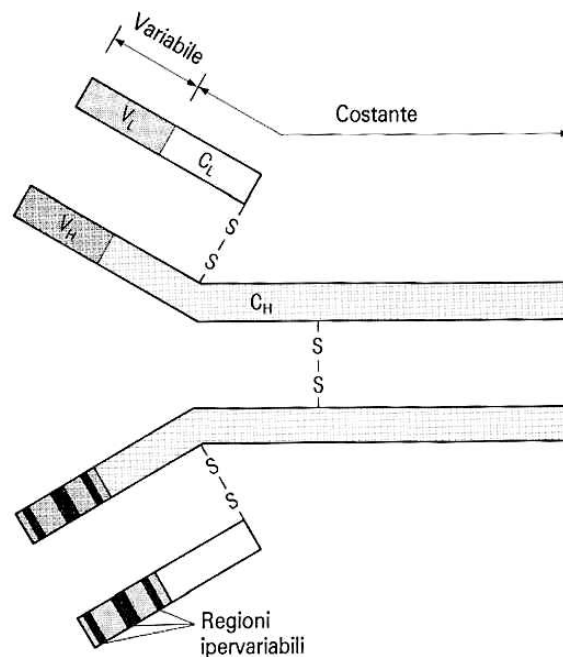


Figura 2.4: Variabilità nella sequenza di amminoacidi delle immunoglobuline.

Le IgG, o gammaglobuline, rappresentano la classe di immunoglobuline presente nell'organismo in maggior quantità, con una percentuale sul totale dell'80%. La concentrazione nel siero umano è normalmente di circa 8 – 16 mg/mL. Le IgG sono i principali anticorpi circolanti nei tessuti in quanto diffondono con maggiore facilità nelle zone extravascolari rispetto alle altre immunoglobuline. Sono prodotte in elevata quantità dopo il secondo impatto con antigeni quali

virus, tossine e batteri. Grazie alla loro capacità di attraversare la placenta, esse forniscono la principale difesa contro le infezioni durante le prime fasi di vita del feto.

Sono conosciute quattro sottoclassi di IgG, indicate con le sigle IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Queste differiscono tra loro per il numero di ponti disolfuro presenti nella regione della cerniera e per la posizione del legame tra le catene leggere e pesanti (Figura 2.5).

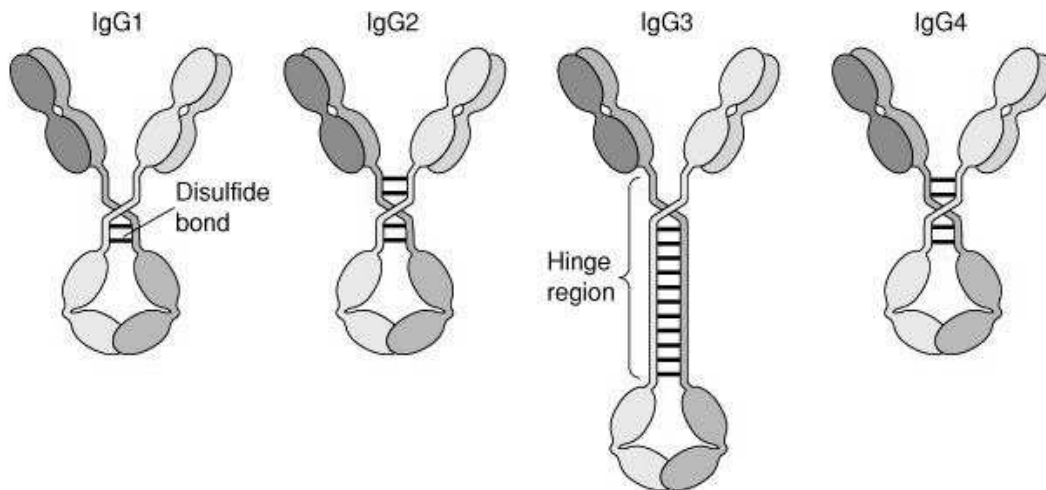


Figura 2.5: Struttura semplificata delle principali sottoclassi delle IgG.

## 2.3 Il sistema sperimentale: materiali

Nel Capitolo 1 è stato introdotto il concetto di cromatografia con membrane di affinità. Una membrana di affinità è un sistema in grado di separare in modo estremamente selettivo una proteina dal fluido complesso da cui proviene [8]. La purificazione è compiuta grazie alla formazione di un legame specifico e reversibile tra la proteina di interesse ed il ligando immobilizzato sulla matrice.

Nei paragrafi a seguire saranno descritte le membrane di affinità considerate in questo lavoro di tesi, come risultato dell'accoppiamento di membrane e ligandi. Saranno in seguito elencate le soluzioni di IgG usate per eseguire una completa caratterizzazione delle membrane di affinità.

### 2.3.1 Membrane

Le membrane costituiscono la fase stazionaria delle colonne cromatografiche considerate in questo lavoro di tesi. Per costituire un buon supporto, una membrana deve possedere diverse caratteristiche, prime tra tutte elevate porosità ed area superficiale, così da aumentare il numero di ligandi che è possibile immobilizzare; tuttavia la porosità deve essere tale per cui la superficie interna sia



accessibile alla proteina da separare e sia garantita la stabilità meccanica. Inoltre la membrana deve presentare un basso adsorbimento non specifico, così da evitare che altre proteine e contaminanti interagiscano con il supporto. La matrice deve essere chimicamente e fisicamente stabile, in modo da sopportare condizioni di lavoro che possono essere particolarmente stressanti in termini di pH e pressione. Infine, ma non meno importante, devono essere presenti dei gruppi funzionali che possono essere attivati per l'immobilizzazione del ligando. Chiaramente devono essere considerati anche fattori quali il costo e la reperibilità.

Di seguito saranno presentate le caratteristiche delle membrane che hanno costituito i supporti di affinità studiati nel presente lavoro di tesi.

### 2.3.1.1 Membrane in polieterosulfone

Le membrane Pall Ultrabind® hanno una struttura in polieterosulfone (PES), un polimero che presenta un'elevata resistenza meccanica e termica, oltre ad un'eccellente stabilità agli agenti idrolitici come gli acidi o le basi forti. Il monomero di base del polieterosulfone è riportato in Figura 2.6. La formazione delle catene avviene per attacco testa coda delle singole unità monomeriche, mentre la ramificazione avviene attraverso gli atomi di ossigeno legati allo zolfo.

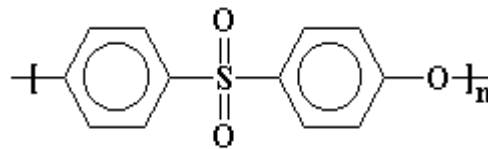


Figura 2.6: Monomero del polieterosulfone.

In questo lavoro sono state considerate due matrici in polieterosulfone che differiscono tra loro per il diametro medio dei pori e il grado di vuoto; queste saranno denotate con le sigle U450 e U800, che rispettivamente indicano le membrane con dimensione media dei pori di 0.45 e 0.80  $\mu\text{m}$ . Entrambi i supporti sono preattivati con gruppi aldeidici per eseguire l'immobilizzazione del ligando. Le membrane sono supportate su fibre di polipropilene in modo da aumentarne la resistenza meccanica (Figura 2.7). Le principali caratteristiche delle membrane Pall Ultrabind® sono riassunte in Tabella 2.1.

Tabella 2.1: Principali caratteristiche delle membrane Pall Ultrabind®.

membrana	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$L_m$ ( $\mu\text{m}$ )	$\epsilon$ (%)
U450	0.45	155	48.4
U800	0.80	155	66.7

$d_p$  = diametro dei pori;  $L_m$  = spessore unitario;  $\epsilon$  = grado di vuoto.

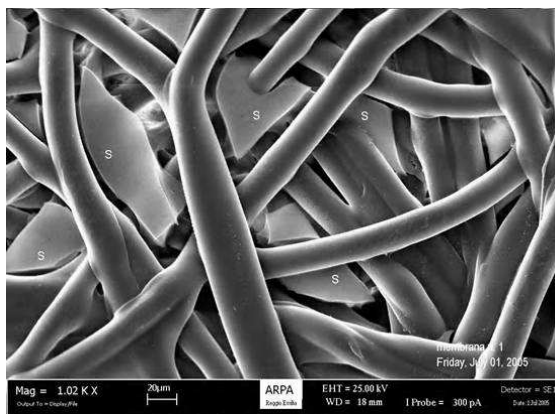


Figura 2.7: Scansione al microscopio elettronico di una membrana PALL Ultrabind® U450 dal lato rinforzato; sono visibili le fibre in polipropilene che costituiscono il supporto e la fase di polietere sulfone (contrassegnata da S) [9].

### 2.3.1.2 Membrane in cellulosa rigenerata

Le cellulosa rappresenta un semplice ma funzionale supporto per membrane di affinità. La catena polimerica di base è formata da monomeri di glucosio uniti dal legame  $\beta$  1-4 glucosidico (Figura 2.8); sono inoltre possibili reticolazioni con catene adiacenti attraverso il legame 1-6 glicosidico. La struttura ed il grado di vuoto della membrana sono controllate in base al numero di ramificazioni intercatena che vengono eseguite. Gli ossidrili dei carboni in posizione 2, 3 e 5 sono disponibili per essere attivati con gruppi funzionali, come ad esempio gruppi epossidici od aldeidici, in modo da rendere possibile l'immobilizzazione del ligando.

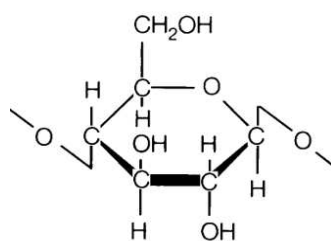


Figura 2.8: Monomero della cellulosa.

Le membrane prodotte da Sartorius che sono state considerate in questo lavoro di tesi hanno una matrice in cellulosa rigenerata stabilizzata e rinforzata. Tre diverse membrane sono state utilizzate come supporto per l'immobilizzazione del ligando: una membrana disponibile in commercio, la Sartobind Epoxy®, e due membrane sviluppate nel corso del progetto AIMS, indicate con Epoxy1 ed Epoxy2. Come si può dedurre dai nomi, tutte le membrane sono preattivate con gruppi epossidici. Le caratteristiche delle membrane sono riassunte in Tabella 2.2, mentre in Figura 2.9 sono riportate delle micrografie al microscopio ottico a

scansione (SEM). Come si vedrà nel Capitolo 3, le membrane di affinità che si basano sui supporti Epoxy1 ed Epoxy2 hanno delle prestazioni di separazione migliori rispetto le commerciali Sartobind Epoxy, indice che la struttura più aperta e con maggiori interconnessioni tra i pori influisce positivamente nel processo di adsorbimento. In particolare le membrane Epoxy1 sono state ottimizzate per l'immobilizzazione del ligando naturale specifico per l'IgG, la proteina A, mentre le membrane Epoxy2 sono state sviluppate principalmente per l'immobilizzazione dei ligandi sintetici A2P e B14.

Tabella 2.2: Principali caratteristiche delle membrane prodotte da Sartorius.

Membrana	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	$L_m$ ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	$\varepsilon$ (%) <sup>b</sup>	$A_S$ ( $\text{m}^2/\text{ml}$ ) <sup>b</sup>	$\rho_{\text{epoxy}}$ ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) <sup>a</sup>
Sartobind Epoxy	0.45	275	72.7	0.93	2.0 $\div$ 2.2
Epoxy1	0.45	200	54.5	1.47	0.3 $\div$ 0.4
Epoxy2	0.45	200	58.5	2.37	1.2 $\div$ 1.8

$d_p$  = diametro dei pori;  $L_m$  = spessore unitario;  $\varepsilon$  = grado di vuoto;  $A_S$  = area superficiale;

$\rho_{\text{epoxy}}$  = densità dei gruppi epossidici.

a) dati del produttore, Sartorius Stedim Biotech.

b) dati ottenuti dal Membrane Technology Group dell'Università di Twente.

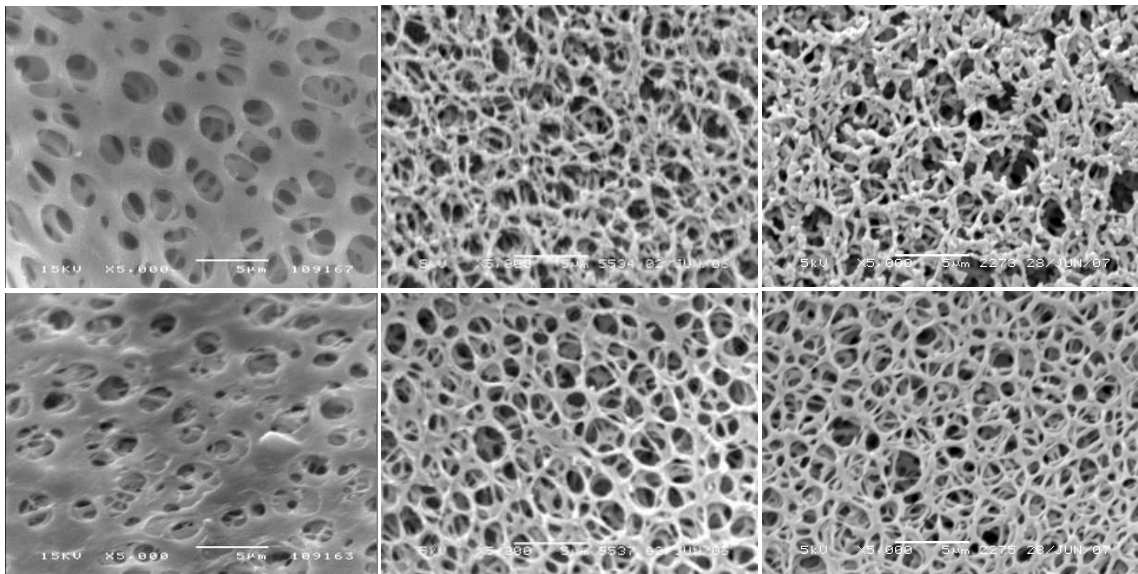


Figura 2.9: Scansioni al microscopio elettronico delle membrane Sartobind Epoxy (a sinistra), Epoxy1 (al centro) ed Epoxy2 (a destra) eseguite dal lato superiore (in alto) ed inferiore (in basso). Micrografie eseguite dal Membrane Technology Group dall'Università di Twente.

### 2.3.2 Ligandi di affinità per le IgG

Il ligando è una delle componenti più importanti nella cromatografia di affinità e ne costituisce la strategia di base. La capacità di legarsi alla proteina di interesse in maniera specifica e reversibile è fondamentale. È importante che il legame di affinità sia tale da permettere il successivo recupero della proteina legata: un

legame eccessivamente forte richiede condizioni drastiche per il recupero della proteina durante l'eluizione, con il rischio di denaturare facilmente la biomolecola di interesse.

I ligandi di affinità maggiormente utilizzati nella purificazione di IgG sono la proteina A e la proteina G [10–14]. Sono noti con il nome di recettori Fc, in quanto tendono a legarsi alla parte costante degli anticorpi e sono ottenuti da microrganismi o batteri geneticamente modificati attraverso procedure complesse e costose. Inoltre, questi ligandi richiedono costose fasi di purificazione per eliminare i contaminanti, come virus, tossine o frammenti di DNA, che andrebbero a compromettere la purezza dell'anticorpo e quindi il suo utilizzo in ambito medico.

Negli ultimi anni si sta puntando alla ricerca di ligandi sintetici per la purificazione di anticorpi [15]. I nuovi ligandi sono stati sviluppati grazie allo studio dei meccanismi biologici coinvolti nel riconoscimento delle IgG e all'uso spesso combinato di simulazione molecolare e sintesi chimica.

Rispetto le proteine A e G, i ligandi sintetici presentano diversi vantaggi, come un ridotto costo di produzione ed una maggiore resistenza in condizioni sfavorevoli di pH e forza ionica. Inoltre possono essere progettati con una marcata biospecificità per le classi di immunoglobuline che non sono riconosciute dalle proteine A e G. Un enorme vantaggio è la minore tossicità che i ligandi sintetici mostrano, e quindi un eventuale distacco dei ligandi dalla matrice rappresenta un pericolo più contenuto rispetto quanto accade con le proteine A e G, forti patogeni per l'organismo umano.

Nel presente lavoro di tesi sono stati considerati diversi ligandi di affinità: la proteina A, di origine biotecnologica, e tre ligandi di origine sintetica, indicati con le sigle D-PAM, A2P e B14.

### 2.3.2.1 Proteina A

La proteina A è una proteina della membrana cellulare comune nei ceppi di *Staphylococcus Aureus*. Ha una spiccata affinità per molte immunoglobuline, ma in particolare per il frammento Fc delle IgG [16].

Nella proteina A possono essere riconosciuti diversi domini funzionali, tra cui cinque domini omologhi coinvolti nel legame con l'IgG [17]. Ognuno dei domini leganti le IgG è composto da tre  $\alpha$ -eliche di 58 amminoacidi disposte a fascio antiparallelo, in cui la porzione centrale è idrofobica. Ciascuno di essi ha la capacità di legare la porzione Fc delle IgG, con affinità particolarmente elevata per le sottoclassi IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>.

### 2.3.2.2 Ligando A2P

Il ligando A2P è stato sviluppato da Prometic Biosciences, uno dei collaboratori all'interno del progetto europeo AIMs. Rappresenta il risultato della selezione fatta su biblioteche di ligandi combinatoriali<sup>1</sup>, caratterizzate da composti specifici per le IgG. Studi di modellazione molecolare hanno indicato la probabilità che questa molecola possa simulare la struttura di due amminoacidi della proteina A, Phe 132 (fenilalanina) e Tyr 133 (tirosina), che hanno un ruolo fondamentale nella formazione del complesso con l'IgG.

Dal punto di vista chimico, l'A2P è una triclortriazina disostituita con 2 ammino-fenoli; per comodità in Figura 2.10 è riportata la struttura del ligando sintetico.

Studi preliminari condotti da Prometic Biosciences hanno dimostrato una notevole selettività dell'A2P nei confronti dell'IgG, oltre a rendere possibile un recupero in eluizione superiore all'85% [18].

Questo ligando presenta lo svantaggio di essere sensibile all'acido pluronico F68, un additivo comunemente presente in mezzi di coltura di cellule mammifere. L'acido pluronico infatti è in grado di rompere le interazioni tra l'IgG e l'A2P, quindi l'adsorbimento dell'IgG presente in soluzione è sfavorito.

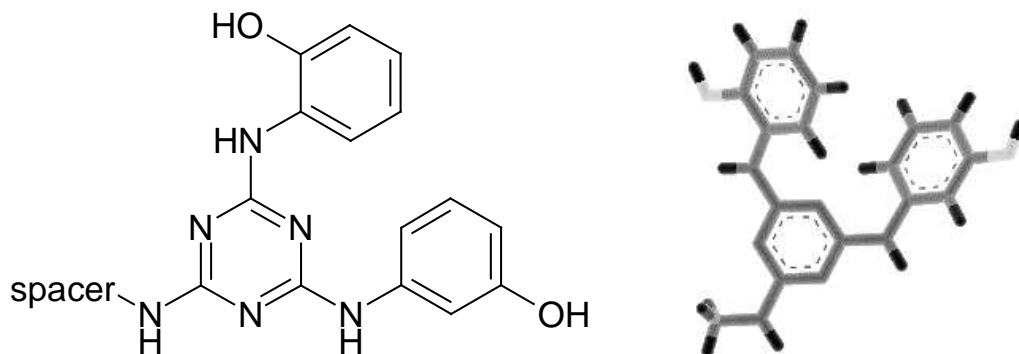


Figura 2.10: Struttura chimica e tridimensionale del ligando mimetico A2P.

### 2.3.2.3 Ligando mimetico B14

Il ligando B14 è stato sviluppato per interagire specificamente con anticorpi monoclonali; con l'introduzione di questo ligando sono stati risolti i problemi legati all'A2P, come la sensibilità all'acido pluronico F68 e l'alto adsorbimento di tipo non specifico osservato quando l'A2P è immobilizzato su membrane [19].

Anche il ligando B14 è stato prodotto nei laboratori di Prometic Biosciences. Di questo ligando non sono disponibili informazioni sulla struttura e composizione perché coperti da segreto industriale.

<sup>1</sup> Raccolte di peptidi a fissata lunghezza ma realizzati con diverse sequenze di amminoacidi.

### 2.3.2.4 Ligando mimetico D-PAM

Il ligando D-PAM (Protein A Mimetic) è stato sintetizzato da Xeptagen SpA, ditta italiana che collabora al progetto AIMS, in seguito alla selezione eseguita su proprie biblioteche combinatoriali di peptidi [20, 21].

La formula generale di questo ligando è  $(\text{Arg-Thr-Tyr})_4\text{-K}_2\text{-K-G}$  [PAM, Protein A Mimetic, TG19320]. Si tratta di quattro identiche catene peptidiche che dipartono da un cuore di lisina tetradentato, come mostrato in Figura 2.II. Tutti gli amminoacidi presenti nel D-PAM sono nella configurazione D, rendendo questo ligando resistente all'azione delle proteasi e quindi idoneo ad operare direttamente su lisati cellulari. Il peso molecolare del ligando è pari a 2141 Da.

Il ligando tetramerico D-PAM interagisce con il frammento cristallizzabile delle IgG. Il ligando ha mostrato una affinità maggiore nei confronti delle IgG di topo piuttosto che su quelle umane, oltre ad una spiccata affinità per le IgM [22].

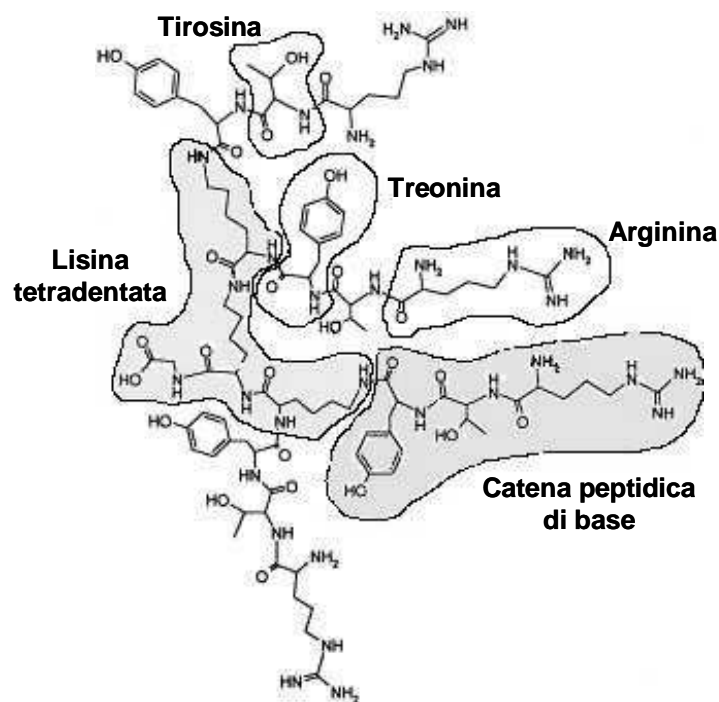


Figura 2.II: Struttura del ligando D-PAM.

### 2.3.3 Membrane di affinità

Dalla combinazione dei supporti con i ligandi specifici sono state ottenute diverse membrane di affinità. L'immobilizzazione dei ligandi è stata eseguita attraverso un braccio spaziatore allo scopo di rendere il ligando più disponibile alle interazioni con l'IgG.

### 2.3.3.1 Membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800

Queste membrane sono il risultato dell'accoppiamento del ligando specifico D-PAM con i due supporti Pall Ultrabind®. La funzionalizzazione è stata eseguita tramite un protocollo di attivazione sviluppato nei nostri laboratori [23]. In Tabella 2.3 è riportata la densità di ligando immobilizzata sui due supporti; questa è misurata attraverso il saggio dell'acido bicinconinico (bicinchoninic acid assay, BCA), un metodo colorimetrico usato per la quantificazione della concentrazione totale di proteina in soluzione [22, 24]. Nel § 3.1 saranno presentati i risultati degli esperimenti condotti su queste membrane.

Tabella 2.3: Densità di ligando,  $\rho_l$ , immobilizzato sulle membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800.

membrana	$\rho_l$	
	(mmol/cm <sup>2</sup> )	(mg/ml)
D-PAM-U450	$5.94 \cdot 10^{-6}$	0.821
D-PAM-U800	$1.73 \cdot 10^{-6}$	0.239

### 2.3.3.2 Membrane A2P-Sartoepoxy e membrane Epoxy2-A2P

Il ligando A2P è stato immobilizzato da Prometic Biosciences sulle membrane Sartoepoxy ed Epoxy2 secondo un loro protocollo di attivazione. Non ci è nota la densità di ligando delle membrane di affinità risultanti. I risultati sperimentali ottenuti con queste membrane saranno esposti nei § 3.2.1 e 3.2.2.

### 2.3.3.3 Membrane A2P-TA-Sartoepoxy e membrane A2P-TA-Epoxy2

Queste membrane sono il risultato di un innovativo protocollo di attivazione sviluppato durante il progetto europeo AIMs dal gruppo del professor Lindner dell'Università di Vienna. Il ligando A2P è immobilizzato sulle matrici cellulose attraverso un opportuno braccio spaziatore, indicato con la sigla TA<sup>2</sup>.

Sono stati preparati diversi lotti di queste membrane al fine di studiare l'efficacia del protocollo di attivazione e la sua ripetibilità. Le membrane risultanti hanno una densità di ligando leggermente variabile con il lotto di produzione (Tabella 2.4). I risultati relativi a queste membrane saranno discussi più approfonditamente nei § 3.2.3 e 3.2.4.

<sup>2</sup> Le caratteristiche chimiche del gruppo TA così come il protocollo di attivazione non verranno riportate in questo lavoro di tesi perché costituiscono informazioni riservate.

Tabella 2.4: Densità di ligando,  $\rho_l$ , immobilizzato sulle membrane A2P-TA-Sartoepoxy e A2P-TA-Epoxy2.

Membrana	lotto	$\rho_l$ ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )
A2P-TA-Sartoepoxy	# SH211B	0.74
	# SH265	0.99
	# SH286	1.10
	# SH426	0.73
A2P-TA-Epoxy2	# SH462	0.22

### 2.3.3.4 Membrane B14-TA-Sartoepoxy e membrane B14-TA-Epoxy2

Il protocollo di attivazione sviluppato dall'Università di Vienna è stato ripetuto per l'immobilizzazione del nuovo ligando B14 sulle matrici cellulose. Anche in questo caso è stato usato lo stesso braccio spaziatore TA considerato per le membrane A2P-TA-Sartoepoxy e A2P-TA-Epoxy2. Per verificare la procedura di immobilizzazione sono stati preparati due lotti per ciascun tipo di supporto. La densità di ligando delle membrane B14-TA-Sartoepoxy e B14-TA-Epoxy2 sono riportati in Tabella 2.5. Nei § 3.3.1 e 3.3.2 saranno presentati i risultati sperimentali ottenuti con queste membrane.

Tabella 2.5: Densità di ligando,  $\rho_l$ , immobilizzato sulle membrane B14-TA-Sartoepoxy e B14-TA-Epoxy2.

Membrana	lotto	$\rho_l$ ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )
B14-TA-Sartoepoxy	# SH502	0.84
	# SH558	0.68
B14-TA-Epoxy2	# SH503	0.26
	# SH559	0.37

### 2.3.3.5 Membrane SartoAIMs Protein A

Le membrane SartoAIMs ProteinA sono il risultato dell'accoppiamento della proteina A sulle membrane Epoxy1, la cui struttura interna è stata appositamente elaborata per un miglior sfruttamento della proteina A immobilizzata. La funzionalizzazione è stata eseguita da Sartorius, e la densità di ligando risultante è di 2 mg/ml. Queste membrane sono state oggetto di un esteso lavoro sperimentale che verrà descritto nel § 3.4.



### 2.3.4 Immunoglobuline

Per la caratterizzazione delle membrane di affinità sono state utilizzate diverse fonti di immunoglobuline.

Per le membrane con ligando D-PAM è stata alimentata una soluzione di IgG di topo. L'IgG, acquistata da Sigma Aldrich, si presenta come un preparato liofilizzato in contenitori da 5 g, che viene diluito in tampone fosfato 50 mM fino alla concentrazione desiderata.

Il prodotto farmaceutico Gammanorm, acquistato dalla Octapharma, è una miscela policlonale di IgG umana. Si presenta in ampolle da 10 ml ognuna con concentrazione proteica totale pari a 165 mg/ml in cui il contenuto minimo garantito di IgG è del 95%; in minima parte sono presenti anche delle IgA con una percentuale massima dello 0.05%. I dettagli della composizione del Gammanorm sono riportati in Tabella 2.6. Le fiale sono precedentemente diluite con acqua da HPLC in frazioni da 1 ml ciascuna alla concentrazione di 16.5 mg/ml e conservate a  $-18^{\circ}\text{C}$ . I campioni alimentati nelle prove sperimentali sono stati ottenuti tramite un'ulteriore diluizione con PBS (Phosphate Buffered Saline) alla concentrazione voluta.

Tabella 2.6: Composizione delle sottoclassi di IgG nel Gammanorm; valori medi.

sottoclasse	quantità (%)
IgG <sub>1</sub>	59
IgG <sub>2</sub>	36
IgG <sub>3</sub>	4.9
IgG <sub>4</sub>	0.5

Il surnatante industriale è il prodotto di una coltura di cellule ovariche di criceto ingegnerizzate per la produzione di immunoglobuline, ceppo ProCHO5-CDM. Secondo quanto dichiarato dal produttore, Excell Gene, contiene IgG<sub>1</sub> monoclonale ad una concentrazione minima di 0.1 mg/ml; inoltre è presente lo 0.1% di acido pluronico F68, usato per aumentare la permeabilità della membrana cellulare, e rosso fenolo che dà una forte colorazione rossa al preparato. Non sono noti altri dettagli sulle specie presenti, ma è nota la presenza di frammenti di DNA e di altre proteine escrete dalle cellule (HCP, Host Cell Proteins). Il surnatante industriale è stato alimentato al sistema dopo una prefiltrazione con filtri Minisart® in cui diametro dei pori è di 0.2  $\mu\text{m}$ .

## 2.4 Il sistema sperimentale: metodi

### 2.4.1 Metodi analitici

Esistono diversi metodi per lo studio delle proteine presenti in un campione. Normalmente tali tecniche sono di tipo quantitativo se il campione considerato contiene solo la proteina pura, mentre nel caso di miscele i metodi sono per lo più di tipo qualitativo. Tuttavia esistono analisi di tipo specifico in grado di quantificare la concentrazione di una determinata proteina contenuta in una miscela complessa.

#### 2.4.1.1 Lettura dell'assorbanza

La lettura dell'assorbanza è uno dei metodi più semplici ma allo stesso tempo efficaci per la determinazione della concentrazione di proteine in soluzioni pure. Questo metodo di misura si basa sulla capacità delle proteine di assorbire radiazioni nell'ultravioletto vicino. Solitamente le lunghezze d'onda usate sono pari a 215 e 280 nm, in corrispondenza delle quali le proteine mostrano dei picchi di assorbimento. Infatti i legami peptidici vengono maggiormente eccitati quando la lunghezza d'onda del raggio incidente è pari a 215 nm, mentre a 280 nm sono sensibili gli elettroni delocalizzati negli anelli indolici e benzilici del triptofano e della tirosina.

Per concentrazioni non troppo elevate, il legame tra l'assorbanza e la concentrazione di proteina in soluzione è lineare e può essere descritta dalla legge di Lambert e Beer:

$$Abs_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} c H \quad 2.1$$

dove  $Abs_{\lambda}$  è il valore di assorbimento letto dallo strumento di misura in corrispondenza della lunghezza d'onda  $\lambda$ ,  $c$  è la concentrazione di proteina in soluzione,  $H$  è lo spessore della cella di misura ed  $\epsilon_{\lambda}$  è il coefficiente di proporzionalità detto anche coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda  $\lambda$ .

Anche se l'assorbimento è un numero puro, solitamente si usa l'unità di assorbimento, AU (Absorbance Unit), come unità di misura. Il coefficiente di estinzione esprime la facilità di interazione dei fotoni della radiazione incidente con la molecola, e dipende pertanto dalla proteina in esame. Da notare che il coefficiente di estinzione dipende anche dal tampone in cui è presente la proteina, in quanto caratteristiche come il pH o la forza ionica possono modificare la configurazione proteica e quindi l'interazione dei fotoni con la biomolecola.

In Tabella 2.7 sono riassunti i coefficienti di estinzione dell'IgG nelle soluzioni utilizzate nel presente lavoro di tesi. Bisogna puntualizzare che i valori riportati sono stati determinati con uno spettrofotometro UV1601 della Shimadzu, in cui la lunghezza della cella è pari ad 1 cm. Il rivelatore UV dell'FPLC ÄKTApurifier 100<sup>TM</sup> ha diverso cammino ottico (§ 2.4.2), per cui il segnale di assorbanza registrato deve essere opportunamente convertito per una corretta stima della concentrazione. Per comodità in Tabella 2.7 si riporta anche il fattore  $H\epsilon_{280nm}$  dell'FPLC ÄKTApurifier 100, utile per eseguire le conversioni da milli unità di assorbanza, mAU, a valori di concentrazione in mg/ml.

Tabella 2.7: Coefficienti di estinzione dell'IgG,  $\epsilon_{280nm}$ , e fattore di conversione da assorbanza a 280nm (mAU) a concentrazione (mg/ml) per l'FPLC ÄKTApurifier 100.

	soluzione	$\epsilon_{280nm}$ (AU cm <sup>2</sup> /mg)	$H\epsilon_{280nm}$ (mAU ml/mg)
IgG di topo	tampone fosfato 50 mM pH 7.2	1.028	223.8
	acido acetico 0.1 M pH 3.5	1.000	217.7
IgG umana	PBS 0.1 M pH 7.4	1.305	284.2
	glicina 0.1 M pH 2.8	1.334	290.5
	glicina 0.1 M pH 3.5	1.335	290.6
	acido citrico 0.1 M pH 2.5	1.407	306.3
	acido citrico 50 mM pH 3	1.408	306.5

### 2.4.1.2 Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica di separazione che sfrutta la diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Il frazionamento è condotto in un opportuno gel, solitamente a base di poliacrilammide, che funge da setaccio molecolare. Dunque la velocità di migrazione nel gel dipende sia dalla carica netta che dalla dimensione della particella.

Tra le tecniche elettroforetiche condotte su gel a base di poliacrilammide, si distingue il metodo dell'SDS-PAGE, acronimo di Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis. Si basa sull'analisi di proteine denaturate attraverso l'utilizzo di sodio dodecil solfato (SDS). L'SDS è un detergente anionico in grado di rompere le interazioni non covalenti nelle proteine, che dunque si denaturano e perdono la propria struttura tridimensionale. Il risultato è un complesso SDS-proteine in un rapporto di circa una molecola di SDS per ogni due residui amminoacidici. Tale rapporto conferisce al complesso SDS-proteina denaturata una carica negativa netta approssimativamente proporzionale alla massa della proteina stessa. La carica negativa acquisita con il legame con l'SDS è

in genere molto più grande della carica della proteina nativa, che diventa quindi trascurabile.

Il campione proteico viene inoltre trattato con blu di bromofenolo, un colorante che permette di visualizzare l'andamento della corsa elettroforetica. In questo modo è possibile valutare la presenza di una determinata proteina nel campione se nel gel è visibile la corrispondente banda colorata.

Il materiale di supporto utilizzato è generalmente un gel a gradiente, ossia un gel con una diversa distribuzione dei pori da un estremo all'altro: nella zona vicina ai pozzetti, in cui vengono caricati i campioni, si ha la percentuale più bassa di poliacrilammide, percentuale che aumenta progressivamente spostandosi verso il fondo del gel. Questa struttura favorisce la separazione delle proteine anche in base alle dimensioni, permettendo solo alle proteine più piccole di raggiungere il fondo del gel.

L'IgG trattata con SDS si denatura nelle 4 catene che la compongono: due catene leggere e due pesanti, rispettivamente con peso molecolare di 25 e 50 kDa (§ 2.2). La presenza di IgG in un campione trattato con SDS-PAGE è quindi visibile se sono presenti delle bande colorate in corrispondenza dei pesi molecolari delle catene leggere e pesanti dell'IgG; altre bande corrispondono ad eventuali inquinanti presenti nel campione.

### 2.4.1.3 Analisi cromatografiche

La quantificazione dell'IgG e degli altri componenti presenti in una miscela è possibile attraverso delle opportune analisi cromatografiche condotte all'HPLC, acronimo di High Performance Liquid Chromatography.

La cromatografia liquida ad alta risoluzione è una moderna tecnica cromatografica in cui, grazie all'esercizio di una forte pressione, la fase mobile avanza lungo una colonna riempita con una fase stazionaria di granulazione finissima.

Una rappresentazione semplificata di un HPLC è riportata in Figura 2.12. In primo luogo si trova un sistema di pompe, necessario per la movimentazione della fase mobile, ed un iniettore del campione da analizzare. La colonna costituisce il fulcro dello strumento poiché in questo elemento ha luogo la separazione. Infine un apposito rivelatore misura la quantità dei componenti in uscita, e il segnale viene registrato da un computer.

Per la quantificazione dell'IgG è stata usata una colonna di affinità con proteina A immobilizzata nella fase stazionaria (Applied Biosystems Cat.PA 2-1001-00). Il principio di questa tecnica è del tutto simile a quanto introdotto nel § 1.1.

Per valutare la purezza di IgG in una miscela è stata usata una colonna ad esclusione di forma, detta anche SEC (Size Exclusion Chromatography),

impaccata con un materiale altamente poroso. Il principio di separazione sfrutta le caratteristiche del riempimento, per cui una molecola di grosse dimensioni è esclusa dai pori delle particelle e fluisce solo attraverso gli spazi interstiziali, mentre le molecole di piccole dimensioni si distribuiscono anche all'interno del riempimento e dunque attraversano la colonna con una velocità minore. In uscita dalla colonna SEC emergeranno prima le molecole di grandi dimensioni e via via quelle di dimensioni minori. Questa tecnica è solitamente qualitativa, anche se una quantificazione di massima è possibile sulla base della dimensione dei picchi dei composti in uscita dalla colonna. La colonna usata per queste analisi è una Proteema 300 acquistata dalla Polimer Standards Service.

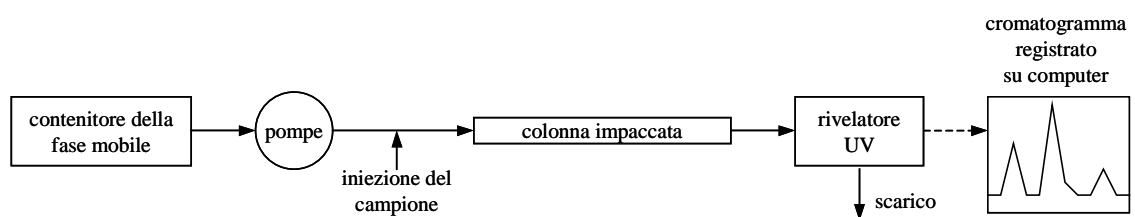


Figura 2.12: Schematizzazione semplificata di un'HPLC.

## 2.4.2 L'apparato sperimentale: l'FPLC ÄKTApurifier 100

La caratterizzazione delle membrane è stata eseguita mediante una FPLC, acronimo di Fast Liquid Protein Chromatography. Il nome commerciale dell'FPLC posseduta in laboratorio è ÄKTApurifier 100, ed è stata acquistata presso la sede di Milano della GE Healthcare.

L'FPLC ÄKTApurifier è un sistema per cromatografia liquida appositamente progettato per applicazioni di laboratorio e di ricerca su piccola scala. L'unità cromatografica è composta da tre moduli sovrapposti (Figura 2.13). Dal basso verso l'alto questi sono:

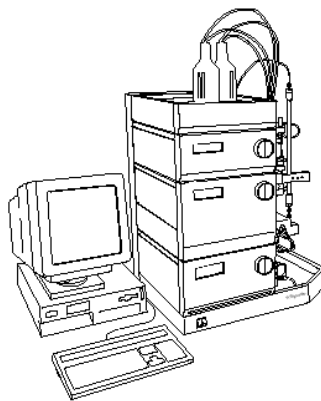


Figura 2.13: Immagine dell'FPLC ÄKTApurifier. È possibile distinguere i tre moduli sovrapposti costituenti l'unità cromatografica.

- Sistema di pompe P-900, costituito da due coppie di pompe alternative a pistone ad alte prestazioni in grado di raggiungere una portata di 100 ml/min ed una pressione massima di 100 bar.
- Monitor UV-900, un rivelatore di assorbanza a lunghezza d'onda multipla, capace di monitorare contemporaneamente tre diverse lunghezze d'onda nell'intervallo da 190 a 700 nm;
- Monitor pH/C-900, un rivelatore combinato per la misurazione in linea del pH e della conducibilità;

La zona superiore invece non ha nessuna particolare funzionalità tecnica, ma offre una posizione particolarmente comoda dove riporre le soluzioni ed i tamponi da alimentare all'unità.

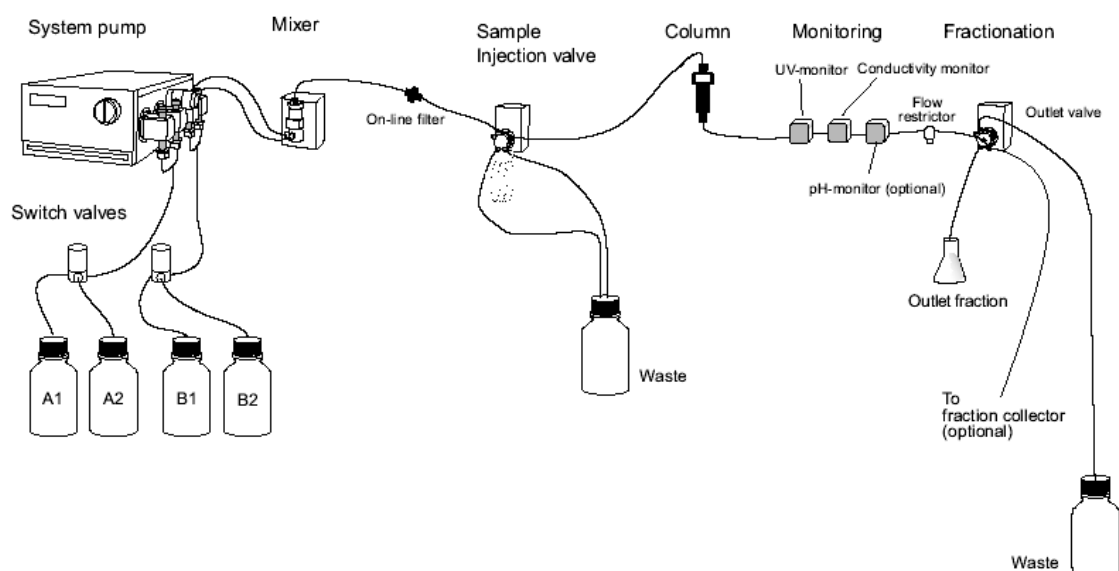


Figura 2.14: Schema delle connessioni e dei componenti presenti nella configurazione di base di un FPLC ÅKTApurifier 100.

Oltre ai moduli sono presenti altri accessori quali le valvole, un miscelatore, la colonna cromatografica ecc. (Figura 2.14). Il sistema di pompe è costituito da 4 testate, due per la coppia di pompe A e altre due per la coppia B. Ogni coppia di pompe lavora in parallelo per garantire che la portata sia costante. Il sistema di pompe A può processare due diverse linee, rispettivamente indicate con le sigle A1 e A2, e altrettante per le pompe B, che movimentano le soluzioni collegate alle linee B1 e B2. La scelta tra la linea 1 e 2 è determinata dalla posizione di una valvola di switch. Dunque il sistema cromatografico è in grado di processare fino ad un massimo di 4 tamponi, di cui due contemporaneamente, una dalle pompe A ed una dalle pompe B. Uno smorzatore di pressione è posizionato a valle delle pompe per

contenere gli sbalzi di pressione legati al funzionamento alternativo degli organi di movimento. La lubrificazione delle pompe è garantita da un apposito sistema di retro lubrificazione, in cui un fluido di servizio scorre in un circuito chiuso con velocità proporzionale a quella delle pompe. Il fluido di servizio è una soluzione di acetone allo 0.4% V/V in acqua.

Le soluzioni provenienti dalle due linee sono omogeneizzate in un miscelatore magnetico, vengono filtrate attraverso un filtro in polipropilene con dimensione dei pori di 2 µm e giungono alla valvola di iniezione. Come mostrato in Figura 2.15, la valvola di iniezione può assumere tre posizioni differenti. Quando la valvola si trova in posizione di Load, il tampone proveniente dalle pompe viene alimentato alla colonna cromatografica. In questa posizione è possibile caricare il campione dalla porta 3 mentre la colonna viene equilibrata. Tra le porte 2 e 6 è posto il contenitore del campione, che può essere un semplice tubo di volume noto (loop) oppure un superloop (si veda dopo). Quando la valvola si sposta nella posizione Inject il campione è spinto alla colonna cromatografica dal flusso del tampone, mentre quando la valvola è in Waste la colonna è esclusa dal circuito e la soluzione pompata viene raccolta nello scarico. Questa posizione è utile quando è necessario cambiare tampone e si devono lavare i volumi a monte della colonna.

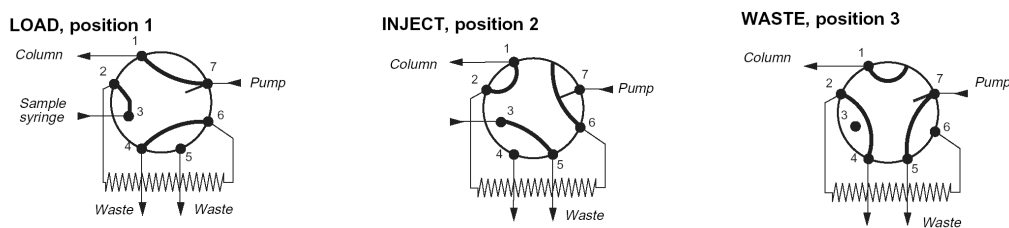


Figura 2.15: Posizioni che può assumere la valvola di iniezione.

Dopo la valvola di iniezione il flusso è diretto alla colonna, dopodiché attraversa gli strumenti di misura dell'assorbanza, della conducibilità e del pH, necessari per monitorare le caratteristiche della soluzione in uscita dalla colonna. Prima della valvola di uscita è posizionato il flow restrictor, un elemento che genera delle perdite di carico concentrate ed innalzare la pressione nella sezione degli strumenti di misura. Questo accorgimento è necessario per evitare la formazione di bolle d'aria all'uscita della colonna che potrebbero falsare le misure.

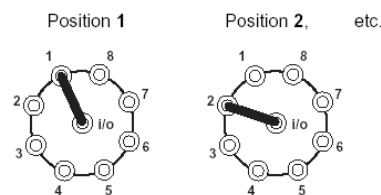


Figura 2.16: Posizioni che può assumere la valvola di uscita.

Alla fine del circuito si trova una valvola ad otto porte (Figura 2.16); in base alla posizione della valvola di uscita è possibile dirigere il flusso ad un apposito raccoglitore di frazioni (Figura 2.17), ad altri elementi di raccolta della soluzione processata o più semplicemente allo scarico.

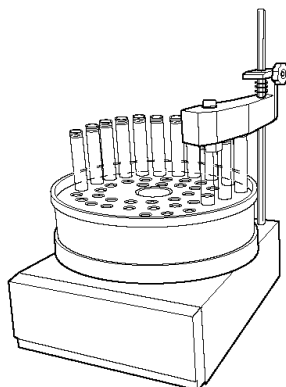


Figura 2.17: Immagine del raccoglitore di frazioni connesso in uscita all’FPLC ÅKTApurifier 100.

La configurazione base è stata modificata con l’introduzione del reverse flow kit e di un superloop.

Il reverse flow kit consiste in una valvola connessa direttamente alla colonna, formalmente identica alla valvola di iniezione, che in base alla posizione assunta dirige il flusso del tampone attraverso la colonna dall’alto verso il basso (posizione Downward Flow) o dal basso verso l’alto (posizione Upward Flow), come mostrato in Figura 2.18.

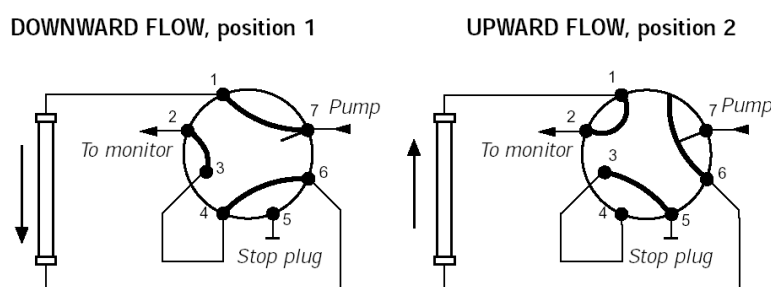


Figura 2.18: Posizioni della valvola di reverse flow.

La valvola di reverse flow è usata per facilitare il recupero di proteina durante la fase di eluzione. Gli esperimenti eseguiti con la reverse flow valve prevedono che le fasi di adsorbimento ed eluizione siano condotte con direzione del flusso opposto rispetto allo stadio di eluizione.

Il superloop è un accessorio che permette di iniettare fino ad un massimo di 150 ml di campione alla colonna. È costituito da un tubo in pirex dotato di un pistone interno che lo suddivide in due regioni (Figura 2.19). Nella regione inferiore viene



caricato il campione da analizzare, operazione che può essere effettuata attraverso una siringa o più comodamente mediante una pompa peristaltica; si ricorda che il campione deve essere caricato quando la valvola di iniezione è posizionata in Load. Nel momento in cui la valvola di iniezione si sposta nella posizione di Inject, nella zona superiore del superloop ha ingresso il tampone movimentato dalle pompe, che fa avanzare il pistone e dunque alimenta il campione alla colonna.

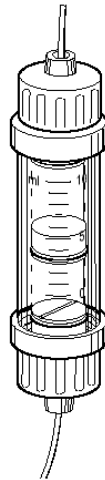


Figura 2.19: Immagine del superloop.

Infine, per evitare problemi di intasamento dei pori delle membrane con aggregati proteici, è stato introdotto un filtro Minisart da 0.2  $\mu\text{m}$  immediatamente prima dell'ingresso del modulo.

Unicorn™ è il programma utilizzato per il controllo dell'unità cromatografica e per l'elaborazione dei risultati. Si presenta all'utente con una struttura a quattro finestre:

- Manager: questa finestra costituisce il sistema di gestione dei documenti; è impostata secondo due colonne, una in cui si trovano i metodi di lavoro per l'esecuzione degli esperimenti e la seconda dove sono salvati i risultati delle prove effettuate;
- Method editor: in questa finestra è possibile creare, modificare e salvare i metodi di lavoro;
- System control: questa è forse la finestra più importante; permette infatti di seguire i risultati degli esperimenti in tempo reale e di modificare i parametri operativi manualmente e con effetto immediato sul processo;
- Evaluation: questa finestra permette una semplice e comoda elaborazione dei risultati di un esperimento. Si possono eseguire operazioni come la

normalizzazione della curva, l'integrazione dell'area sottostante ai picchi, la minimizzazione delle interferenze del rumore sul segnale registrato ecc. I risultati possono essere esportati in altri programmi come fogli di lavoro o file di testo per una successiva elaborazione.

## 2.5 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali

Tutte le soluzioni tampone preparate per eseguire le prove sono precedentemente filtrate con filtri Millipore da 0.45  $\mu\text{m}$  attraverso una beuta da vuoto collegata ad un eiettore.

Anche i campioni di IgG, sia in soluzioni pure che in miscele complesse, sono filtrati per rimuovere eventuali aggregati proteici. Questa operazione è eseguita con filtri Minisart da 0.45  $\mu\text{m}$  connessi in linea con il sistema di carico del campione. Questi sono mantenuti ad una temperatura di 4 °C mediante un bagno termostatico.

Le prove sperimentali sono state eseguite su due diversi moduli per membrane, il primo in materiale polimerico (ModA) ed il secondo in acciaio (ModB). Una completa descrizione dei due moduli per membrane sarà fornita nel Capitolo 4.

Le membrane da caratterizzare sono state tagliate in dischi del diametro di 25 o da 26 mm, a seconda che sia stato usato il ModA o il ModB rispettivamente. Prima di inserire le membrane nel modulo, queste sono preliminarmente condizionate in batch nel tampone di equilibratura per una notte. In questo modo è garantito un completo bagnamento della superficie interna delle membrane, ed è spazzata dai pori la soluzione di stoccaggio.

Una volta inserite le membrane nel modulo, questo viene connesso al sistema cromatografico FPLC ÄKTApurifier 100. A seconda della configurazione usata, il modulo è posto tra la valvola di iniezione e il rivelatore dell'assorbanza oppure tra le porte 1 e 6 della valvola di reverse flow.

### 2.5.1 Cicli cromatografici in condizioni dinamiche

Gli esperimenti eseguiti in condizioni dinamiche sono eseguiti come un classico ciclo cromatografico, che nel caso più generale consta delle seguenti fasi:

- Equilibratura: la colonna cromatografica viene condizionata con una soluzione tampone con caratteristiche di pH e forza ionica simili a quelle del campione da analizzare. In questa fase vengono uniformate le condizioni di lavoro lungo la colonna, e quindi la sua durata dipende principalmente dal volume della colonna usata.

- Adsorbimento: in questa fase viene alimentato il campione. La sua durata dipende dal tipo di analisi che si vuole eseguire. In ambito industriale l'adsorbimento viene terminato quando la concentrazione di proteina in uscita dalla colonna raggiunge una determinata frazione della concentrazione nell'alimentazione, detta concentrazione di Breakthrough (si veda introduzione del Capitolo 5). In esperimenti su scala di laboratorio, in cui si vogliono studiare le caratteristiche di separazione della colonna, è più utile proseguire la fase di alimentazione finché la colonna raggiunge le condizioni di saturazione. In questo modo sono sfruttate pienamente le capacità di adsorbimento del riempimento e la fase mobile è in equilibrio con la fase stazionaria in ogni sezione della colonna.
- Lavaggio: la fase di lavaggio è necessaria per spiazzare il campione che è presente nel sistema alla fine dell'adsorbimento. In questa fase inoltre vengono trasportate fuori la colonna i residui proteici eventualmente adsorbiti in modo non specifico sul supporto. È eseguita alimentando una soluzione tampone di solito identica a quella usata per l'equilibratura. Il lavaggio è terminato quando il segnale di assorbanza si approssima allo zero; anche questa fase dipende quindi dal volume della colonna cromatografica.
- Eluizione: il tampone che viene alimentato in questa fase ha caratteristiche tali da rendere possibile la scissione delle interazioni tra la proteina adsorbita ed il ligando immobilizzato sul supporto. La sua durata è strettamente dipendente dal tempo necessario per il recupero della biomolecola.
- Rigenerazione: durante la rigenerazione si alimenta una soluzione in grado di ripristinare le condizioni originali della colonna. Normalmente il tampone di rigenerazione ha pH acido o basico per favorire la denaturazione ed il distacco di aggregati proteici adsorbiti sulla colonna. La fase di rigenerazione è stata eseguita quando ritenuto necessario: per alcuni sistemi è condotta alla fine di ogni ciclo cromatografico, mentre per altri è sufficiente rigenerare dopo un numero prestabilito di cicli eseguiti.
- Riequilibratura: il tampone di equilibratura viene nuovamente alimentato per riportare la colonna ed il sistema in condizioni da poter eseguire un nuovo ciclo cromatografico. Anche in questo caso la sua durata dipende dal volume della colonna.

Le prove condotte nel presente lavoro di tesi sono basate su una strategia operativa comune a tutti i sistemi studiati. In primo luogo le fasi di equilibratura,

lavaggio e riequilibrio sono state eseguite alimentando sempre lo stesso tampone, solitamente collegato alla linea A1 dell'FPLC ÄKTApurifier 100. Nella fase di adsorbimento è stata alimentata una quantità di campione sufficiente a saturare completamente le membrane inserite nel modulo; il volume alimentato dipende dunque dalle membrane di affinità studiate, e comunque non è mai inferiore a 20 ml. Date le grandi quantità di campione da processare, l'alimentazione è stata eseguita attraverso la linea A2 o mediante il superloop. Infine, i tamponi di eluizione e di rigenerazione sono stati collegati alle linee B1 e B2 rispettivamente. Per ogni sistema studiato, i dettagli sul tipo di soluzioni utilizzate in ogni fase e il corrispondente volume alimentato saranno esposti nel corso del Capitolo 3.

Nel caso in cui gli esperimenti siano condotti con soluzioni di IgG pura, la presenza di proteina nella soluzione in uscita dalla colonna è monitorata in continuo dal rivelatore UV. Il segnale di assorbanza a 280 nm è registrato dal programma Unicorn<sup>TM</sup>, e tramite i fattori di conversione riportati in Tabella 2.7 è possibile risalire alla concentrazione di proteina in uscita dal modulo cromatografico.

Quando gli esperimenti sono eseguiti con soluzioni complesse non è possibile derivare la concentrazione di IgG dal dato di assorbanza. Durante tali prove la soluzione in uscita dal sistema è stata frazionata in campioni di 1 ml ciascuno. Le frazioni sono state successivamente analizzate all'HPLC con colonna proteina A e colonna SEC, rispettivamente per la quantificazione dell'IgG presente in ogni campione e per la valutazione della purezza delle frazioni raccolte. Con questo artificio è stato possibile definire il profilo di concentrazione dell'IgG in uscita dalla colonna.

### 2.5.2 Dispersione nei volumi esterni alla colonna

Le prove di dispersione nei volumi esterni alla colonna sono necessarie per valutare l'influenza dei volumi esterni alla colonna cromatografica sul processo di separazione (§ 5.1.1). Queste sono condotte come un comune ciclo cromatografico in cui sono escluse le interazioni tra soluto e fase stazionaria.

Le prove di dispersione sono state eseguite sostituendo il campione proteico con una soluzione di acetone allo 0.4% V/V in acqua. Il tampone usato nelle fasi di equilibratura, lavaggio e riequilibrio è stato rimpiazzato da acqua demineralizzata.

In esperimenti preliminari è stato verificato che i risultati di dispersione condotti con acetone o con soluzioni proteiche (HSA) sono coincidenti. Rispetto a tamponi contenenti proteine, l'acetone è vantaggioso perché economico, non sono

richiesti accorgimenti particolari durante la preparazione delle soluzioni ed è sensibile all'assorbanza a 280 nm.

### 2.5.3 Elaborazione dati

I risultati dei cicli cromatografici eseguiti sono stati elaborati per determinare la quantità di proteina adsorbita, lavata ed eluita dalla colonna. Queste informazioni sono indispensabili per determinare le prestazioni delle membrane poiché permettono il calcolo della capacità di adsorbimento e del recupero.

In un generico esperimento, la massa di proteina complessivamente alimentata alla colonna,  $m_{lim}$ , è pari al prodotto della concentrazione di IgG in ingresso,  $c_0$ , per il volume di soluzione alimentata nella fase di adsorbimento,  $V_{ads}$ , che in Figura 2.20 corrisponde all'area del rettangolo limitato tra gli assi e le rette passanti per  $c_0$  e  $V_{ads}$ . La quantità di proteina complessivamente alimentata può essere suddivisa in tre contributi (Figura 2.20): una prima quota è relativa alla massa di proteina contenuta nella soluzione che occupa tutti i volumi del sistema cromatografico,  $m_{sis}$ , un secondo contributo è associato alla quantità di proteina effettivamente adsorbita dalla colonna,  $m_{ads}$ , ed infine bisogna computare la massa di proteina che esce dal sistema ed è quindi persa,  $m_{out}$ . In formule:

$$m_{lim} = m_{sis} + m_{ads} + m_{out} \quad 2.2$$

Il termine  $m_{sis}$  può essere stimato per integrazione dell'area delimitata tra l'asse delle ordinate e la curva di dispersione, mentre  $m_{out}$  è calcolato dall'integrale dell'area sottesa dalla curva di breakthrough. La differenza tra la massa di proteina alimentata e i due contributi appena valutati è pari alla quantità di proteina adsorbita sulla colonna.

La capacità dinamica al 100% breakthrough, ovvero quando la membrana è completamente sfruttata, è indicata con  $DBC_{100\%}$  ed è pari al rapporto tra la massa di proteina adsorbita e il volume totale delle membrane poste nella colonna:

$$DBC_{100\%} = \frac{m_{ads}}{V_{mem,tot}} \quad 2.3$$

La capacità dinamica al 100% breakthrough è pari alla concentrazione di proteina nella fase stazionaria in equilibrio con la fase mobile alle condizioni operative in cui è stata eseguita la prova. La  $DBC_{100\%}$  è un parametro che dipende principalmente dal supporto di affinità considerato, ma può variare anche con la concentrazione di proteina nell'alimentazione,  $c_0$ , e con la portata della fase mobile,  $F$ .

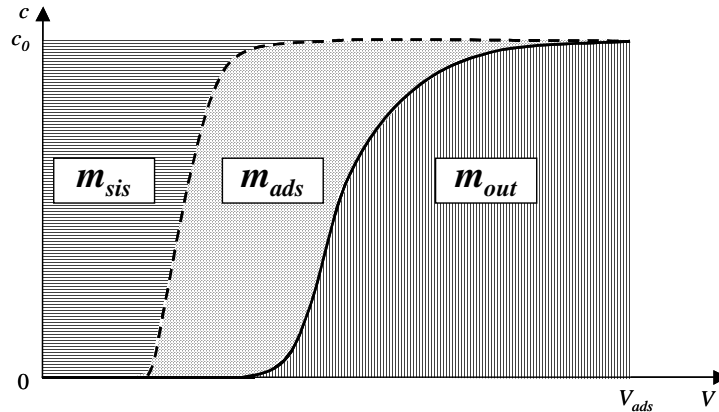


Figura 2.20: Andamento qualitativo delle curve di dispersione nei volumi esterni alla colonna (linea tratteggiata) e di breakthrough (linea continua) nella fase di adsorbimento. Le aree ombreggiate corrispondono alla massa di proteina contenuta nei volumi del sistema,  $m_{sis}$ , la massa di proteina adsorbita,  $m_{ads}$ , e la quantità di proteina non trattenuta dal modulo,  $m_{out}$ .

Se si riportano i dati di capacità dinamica in funzione della concentrazione dell'alimentazione è possibile costruire l'isoterma di adsorbimento per il sistema considerato. Per interpolazione dei dati sperimentali con una ragionevole isoterma teorica, come ad esempio quella di Langmuir, è possibile stimare importanti parametri come la capacità massima in condizioni dinamiche,  $DBC_{max}$ , e la costante di dissociazione  $K_d$ . Il procedimento appena descritto sarà applicato più volte nel corso del Capitolo 3 in cui verranno esposti i risultati sperimentali, mentre le basi teoriche dell'isoterma di Langmuir saranno esposte in dettaglio nel § 5.1.2.1.

Considerazioni del tutto simili possono essere fatte anche durante il lavaggio. In questa fase il tampone di lavaggio spiazza la soluzione proteica dai volumi del sistema, inoltre parte della proteina precedentemente adsorbita può desorbire dal supporto, sia perché legata in modo non specifico e quindi con interazioni deboli, sia a causa della reversibilità del legame specifico. La quantità di proteina in uscita in questa fase,  $m_{lav}$ , corrispondente all'area sottesa dalla curva di lavaggio, è quindi costituita da due contributi, uno relativo alla massa di proteina contenuta nei volumi del sistema,  $m_{sis}$ , ed un altro pari alla massa di proteina che desorbe dal supporto,  $m_{des}$  (Figura 2.21). In formule:

$$m_{lav} = m_{sis} + m_{des} \quad 2.4$$

La massa di proteina che rimane adsorbita sulla membrana di affinità alla fine della fase di lavaggio corrisponde alla quantità di proteina che può essere teoricamente recuperata nella fase di eluizione,  $m_{clu}^{teorica}$ , ed è determinata con semplicità attraverso la seguente differenza:

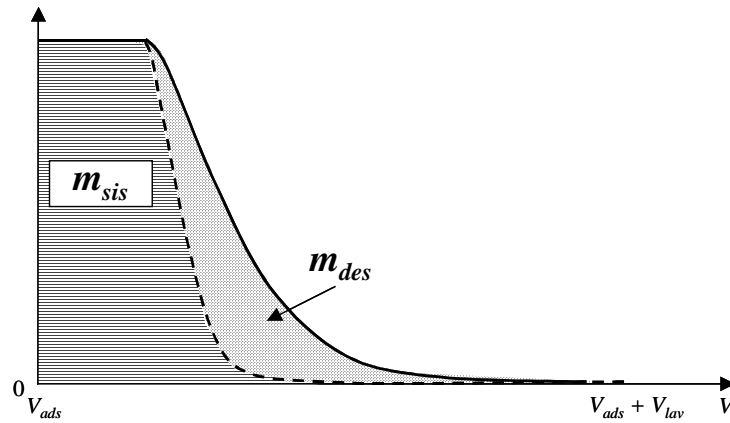


Figura 2.21: Andamento qualitativo delle curve di dispersione nei volumi esterni alla colonna (linea tratteggiata) e di breakthrough (linea continua) nella fase di lavaggio. Le aree ombreggiate corrispondono alla massa di proteina contenuta nei volumi del sistema,  $m_{sis}$  e la massa di proteina desorbita dalla colonna,  $m_{des}$ .

$$m_{elu}^{teorica} = m_{ads} - m_{des} \quad 2.5$$

La massa di proteina effettivamente recuperata durante la fase di eluizione,  $m_{elu}^{reale}$ , è determinata per integrazione dell'area sottesa dal picco di eluizione. Di solito la proteina eluita è minore rispetto a quella rimasta adsorbita alla fine della fase di lavaggio; si introduce quindi il recupero, R, definito come il rapporto tra la quantità di proteina effettivamente ottenuta in eluizione e la massa di proteina teoricamente eluibile, in formule:

$$R = \frac{m_{elu}^{reale}}{m_{elu}^{teorica}} \quad 2.6$$

Il recupero è un numero inferiore ad 1 ed è solitamente espresso in termini percentuali. Anche il recupero è un parametro di fondamentale importanza per stimare le prestazioni che caratterizzano una data membrana di affinità.

Se le interazioni tra la proteina di interesse ed il ligando di affinità sono tali da permettere una semplice scissione dei legami in fase di eluizione, allora il recupero sarà prossimo al 100%.

## Bibliografia

1. Tugcu, N., Roush, D. J., Göklen, K. E., *Maximizing productivity of chromatography steps for purification of monoclonal antibodies*, Biotechnology and Bioengineering, 2007, 99, 599–613.

2. Brekke, O. H., Sandlie, I., *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*, Nature Reviews Drug Discovery, **2003**, 2, 52–62.
3. Li, F., Zhou, J., Yang, X., Tressel, T., Lee, B., *Current therapeutic antibody production and process optimization*, Bioprocessing Journal, **2005**, 4, 23–30.
4. Low, D., O’Leary, R., Pujar, N. S., *Future of antibody purification*, Journal of Chromatography B, **2007**, 848, 48–63.
5. Wurm, F. M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*, Nature Biotechnology, **2004**, 22, 1393–1398.
6. Farid, S. S., *Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture*, Journal of Chromatography B, **2007**, 848, 8–18.
7. Rosati, P., Colombo, R., Istologia, **2001**, Edi Ermes, Milano.
8. Boi, C., *Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification*, Journal of Chromatography B, **2007**, 848, 19–27.
9. Algeri, C., *Purificazione di immunoglobuline mediante membrane di affinità*, **2005**, Tesi di laurea, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.
10. Horstmann, B. J., Chase, H. A., *Modelling the affinity adsorption of Immunoglobulin G to Protein A immobilized to agarose matrices*, Chemical Engineering Research and Design, **1989**, 67, 243–254.
11. Kochan, J. E., Wu, Y. J., Etzel, M. R., *Purification of bovine immunoglobulin G via Protein G affinity membranes*, Industrial and Engineering Chemistry Research, **1996**, 35, 1150–1155.
12. Thommes, J., Bader, A., Halfar, M., Karau, A., Kula, M., *Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds*, Journal of Chromatography A, **1996**, 752, 111–122.
13. Dancette, O. P., Taboureau, J. L., Tournier, E., Charcosset, C., Blond, P., *Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography*, Journal of Chromatography B, **1999**, 723, 61–68.
14. Giovannini, R., Freitag, R., *Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography*, Biotechnology and Bioengineering, **2001**, 73, 522–529.
15. Fassina, G., Ruvo, M., Palombo, G., Verdoliva, A., Marino, M., *Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **2001**, 49, 481–490.
16. Klein, E., *Affinity membranes: their chemistry and performance in adsorptive separation processes*, **1991**, John Wiley & Sons, New York.



17. Moks, T., Abrahmsén, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjöquist, J., Uhlén, M., *Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains*, European Journal of Biochemistry, **1986**, 156, 637–643.
18. Newcombe, A. R., Cresswell, C., Davies, S., Watson, K., Harris, G., O'Donovan, K., Francis, R., *Optimised affinity purification from hyper immunised ovine serum using a synthetic protein A adsorbent, MAbsorbent® A2P*, Journal of Chromatography B, **2005**, 814, 209–215.
19. Boi, C., Busini, V., Salvalaglio, M., Cavallotti, C., Sarti, G. C., *Understanding ligand-protein interactions in affinity chromatography for antibody purification*, inviato per pubblicazione al Journal of Chromatography A.
20. Fassina, G., Verdoliva, A., Odierna, M. R., Ruvo, M., Cassani, G., *Protein A mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies*, Journal of Molecular Recognition, **1996**, 9, 564–569.
21. Verdoliva, A., Pannone, F., Rossi, M., Catello, S., Manfredi, V., *Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G*, Journal of Immunological Methods, **2002**, 271, 77–88.
22. Boi, C., Algeri, C., Sarti, G. C., *Preparation and characterization of polysulfone affinity membranes bearing a synthetic peptide ligand for the separation of murine immunoglobulins*, Biotechnology Progress, **2008**, 24, 1304–1313.
23. Boi, C., Sarti, G. C., *Development and characterization of affinity membranes for immunoglobulin purification*, Separation Science and Technology, **2007**, 42, 2987–3001.
24. Bruschi, M., *Sviluppo di membrane di affinità per la purificazione di anticorpi monoclonali*, **2007**, Tesi di laurea, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.



---

# CAPITOLO 3

---

## RISULTATI DELLE PROVE SPERIMENTALI

### Introduzione

La cromatografia di affinità con membrane è una tecnica piuttosto recente e, nonostante negli ultimi due decenni stia ricevendo una crescente attenzione da parte del mondo della ricerca, costituisce una materia da studiare ed approfondire in molti suoi aspetti [1].

Il ruolo rivestito dal lavoro sperimentale è di fondamentale importanza affinché la cromatografia di affinità con membrane possa essere sempre più competitiva con la cromatografia convenzionale. Nuovi campi di applicazione delle membrane di affinità possono essere considerati su grande scala solo dopo una completa esplorazione delle proprietà e caratteristiche di questi supporti. Inoltre, le prove sperimentali rappresentano il punto di partenza per verificare l'affidabilità dei modelli matematici esistenti.

Nel presente capitolo sarà discusso il lavoro sperimentale condotto per valutare le prestazioni di membrane di affinità di nuova generazione per la purificazione di IgG.

In primo luogo i supporti di affinità sono stati caratterizzati con soluzioni pure di IgG, così da stimare proprietà del mezzo adsorbente come la capacità di adsorbimento e il recupero nella fase di eluizione. Per valutare l'influenza dei parametri operativi sulle prestazioni del processo, le prove sono state eseguite in un ampio intervallo di condizioni sperimentali.

Sui sistemi più promettenti sono state fatte prove con miscele complesse al fine di verificare la fattibilità del processo. In questi esperimenti sono stati valutati parametri quali la selettività del ligando nei confronti dell'IgG e il grado di purezza della soluzione ottenuta.

I sistemi analizzati non saranno presentati in ordine cronologico, ma suddivisi in categorie sulla base del ligando immobilizzato sul supporto. I primi dati mostrati sono relativi ai ligandi sintetici D-PAM, A2P e B14, dopodiché saranno trattati i risultati ottenuti con la proteina A, il ligando biospecifico naturale per le IgG.

### 3.1 Ligando sintetico D-PAM: membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800

Le membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800 (§ 2.3.3.1) sono state caratterizzate alimentando una soluzione di IgG di topo, più affine al ligando D-PAM rispetto all'immunoglobulina di origine umana [2].

Per eliminare possibili legami non specifici tra l'IgG e le membrane, queste sono state saturate preventivamente con albumina umana (Human Serum Albumine, HSA) in grado di bloccare i siti non specifici; dopo immersione per 30 minuti in una soluzione di HSA in tampone fosfato 50 mM pH 7.2, le membrane sono state lavate abbondantemente per rimuovere l'HSA non adsorbito.

Le prove dinamiche consistono in tre cicli cromatografici successivi che sono stati condotti alle stesse condizioni operative, sia per verificare la riproducibilità dei risultati, sia per studiare un'eventuale diminuzione della capacità con il susseguirsi dei cicli. Al termine di ogni ciclo le membrane sono state rigenerate in modo da eliminare eventuali residui proteici adsorbiti sul supporto e riportare le membrane alle condizioni iniziali. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con 5 membrane sovrapposte alla portata di 1 ml/min. In Tabella 3.1 sono riportati i dettagli operativi seguiti in ogni fase cromatografica.

Tabella 3.1: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	tampone fosfato 50 mM pH 7.2	10
Adsorbimento	IgG di topo 0.3 mg/mL in tampone fosfato 50 mM pH 7.2	20
Lavaggio	tampone fosfato 50 mM pH 7.2	15
Eluizione	acido acetico 0.1 M pH 3.5	10
Rigenerazione	acido acetico 0.1 M pH 2.7	20
Riequilibratura	tampone fosfato 50 mM pH 7.2	10

I risultati dei cicli eseguiti sulle due membrane funzionalizzate, D-PAM-U450 e D-PAM-U800, sono riportati in Figura 3.1. Oltre a distinguere chiaramente le fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione si può osservare un picco più basso ed allargato relativo alla fase di rigenerazione. In questo stadio infatti il rivelatore UV segnala la presenza della proteina rimossa dalle membrane che non è stata

precedentemente eluita. Un'osservazione qualitativa dei grafici mostra un andamento pressoché simile in tutti i cicli eseguiti.

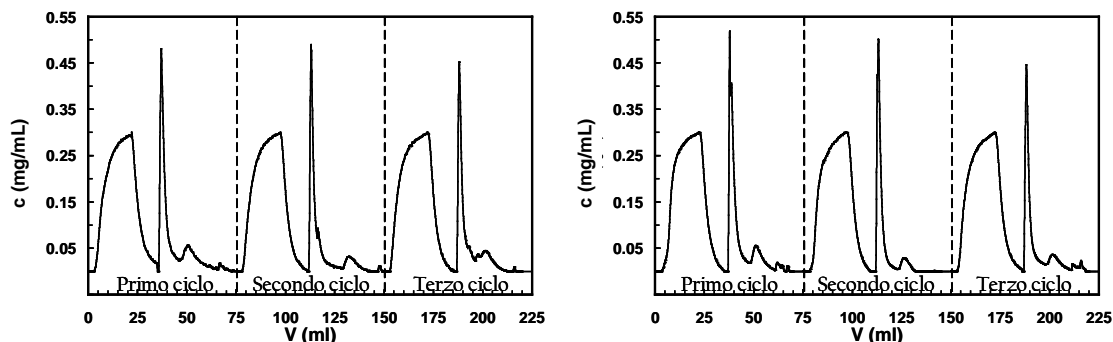


Figura 3.1: Risultati sperimentali dei tre cicli di adsorbimento, lavaggio, eluizione e rigenerazione sulle membrane D-PAM-U450 (a sinistra) e D-PAM-U800 (a destra).

Un confronto di tipo quantitativo può essere fatto con i dati riportati in Tabella 3.2. Si può osservare che la capacità dinamica diminuisce leggermente tra un ciclo e il successivo per entrambi i supporti analizzati. Il calo è circa del 20% per le membrane D-PAM-U450 e del 15% per le D-PAM-U800. Questa evidenza sperimentale potrebbe essere dovuta alla perdita di funzionalità del D-PAM o addirittura il suo distacco quando la matrice è esposta a condizioni particolarmente stressanti di pH, come durante le fasi di eluizione e rigenerazione. Un comportamento analogo è stato osservato anche in prove sperimentali eseguite con siero di topo su altre membrane funzionalizzate con D-PAM [3]. In questi sistemi il calo di capacità dinamica su tre cicli consecutivi è dell'ordine del 60%.

I dati di recupero invece sono tutti prossimi all'80%, un ottimo valore soprattutto se si considera il fatto che il D-PAM è un ligando di tipo sintetico.

Tabella 3.2: Capacità dinamica e recupero delle prove sperimentali condotte.

<i>D-PAM-U450</i>	<i>ciclo 1</i>	<i>ciclo 2</i>	<i>ciclo 3</i>
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.90	1.51	1.24
Recupero %	81.6	81.1	70.3
<i>D-PAM-U800</i>	<i>ciclo 1</i>	<i>ciclo 2</i>	<i>ciclo 3</i>
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	2.38	2.04	1.77
Recupero %	78.7	81.8	75.7

Anche se le membrane D-PAM-U450 sono caratterizzate da una più alta densità di ligando (Tabella 2.3), la capacità dinamica è inferiore del 25% circa rispetto alle D-PAM-U800. È probabile che le differenze strutturali a livello microscopico sfavoriscano l'utilizzazione di ligando nelle membrane D-PAM-

U450. Prove sperimentali eseguite con IgG umana e con siero di topo hanno confermato quest'osservazione [3].

Nonostante il recupero di queste membrane sia abbastanza elevato, il calo di capacità dinamica tra un ciclo ed il successivo rende queste membrane poco competitive. Il protocollo di attivazione delle membrane deve essere rivalutato con attenzione, così come è necessario approfondire i meccanismi coinvolti nell'interazione tra D-PAM e IgG, ad esempio con l'ausilio degli strumenti della modellazione dinamica molecolare [4].

## 3.2 Ligando sintetico A2P

Nel corso del progetto europeo AIMs sono state prodotte diverse membrane funzionalizzate con il ligando sintetico A2P. Le membrane ricevute differiscono non solo per la matrice polimerica usata ma anche per la procedura di immobilizzazione del ligando sul supporto.

Le diverse membrane ricevute sono state preventivamente esaminate in batch dal nostro gruppo di ricerca; i sistemi che hanno mostrato buone o sufficienti prestazioni sono stati successivamente caratterizzati in prove dinamiche.

### 3.2.1 Membrane A2P-Sartoepoxy

Le membrane A2P-Sartoepoxy sono il risultato dell'accoppiamento delle membrane Sartobind Epoxy con il ligando sintetico A2P (§ 2.3.3.2).

Nelle prove eseguite è stata studiata la risposta del sistema a due concentrazioni di IgG nell'alimentazione, pari a 0.25 e 0.5 mg/ml, e a due diverse portate, 0.5 e 1 ml/min. Al fine di valutare la stabilità delle membrane, per ogni condizione operativa sono stati studiati gli effetti di cicli successivi con e senza rigenerazione intermedia [5].

Le prove sono state eseguite con 10 membrane sovrapposte; la durata delle fasi cromatografiche e le soluzioni usate sono riassunte in Tabella 3.3. Da notare che la fase di eluizione è stata eseguita sia con una soluzione di glicina che di acido citrico per valutare l'influenza del tampone di eluizione sul recupero di proteina. In tutti gli esperimenti è stata alimentata una quantità sufficiente di IgG per saturare le membrane, dunque la durata della fase di adsorbimento dipende dalla concentrazione di IgG nell'alimentazione. La fase di rigenerazione è stata eseguita in condizioni batch per 45 minuti dopo aver eseguito due o tre cicli successivi. In Tabella 3.4 sono riportati i dettagli delle condizioni operative delle prove dinamiche eseguite.

## Risultati delle prove sperimentali

Tabella 3.3: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	5
Adsorbimento	IgG umana diluita in PBS 0.1 M pH 7.4	20 – 40
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	15
Eluizione	glicina 0.1 M pH 2.8 / Acido citrico 0.1 M pH 2.5	10
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	10
Rigenerazione	NaOH 1 M	in discontinuo per 45'

Tabella 3.4: Condizioni operative delle prove dinamiche.

$F$ (ml/min)	$c_{0,IgG}$ (mg/ml)	Totale cicli eseguiti	Tampone di eluizione	Rigenerazione dopo ciclo
0.5	0.50	5	glicina 0.1 M pH 2.8	2
0.5	0.25	5	glicina 0.1 M pH 2.8	3
1	0.50	6	glicina 0.1 M pH 2.8	3
1	0.25	6	glicina 0.1 M pH 2.8	3
0.5	0.25	2	acido citrico 0.1 M pH 2.5	–
1	0.25	2	acido citrico 0.1 M pH 2.5	–

Tabella 3.5: Capacità dinamica e recupero delle prove sperimentali condotte.

$F = 0.5$ ml/min, $c_0 = 0.5$ mg/ml	ciclo 1	ciclo 2	rigenerazione	ciclo 3	ciclo 4	ciclo 5
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.57	0.61		0.44	0.52	0.15
Recupero %	63.3	66.1	100	65.9	–	

$F = 0.5$ ml/min, $c_0 = 0.25$ mg/ml	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	rigenerazione	ciclo 4	ciclo 5
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.48	0.32	0.32		0.31	0.29
Recupero %	59.6	83.5	61.5	87	100	

$F = 1$ ml/min, $c_0 = 0.5$ mg/ml	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	rigenerazione	ciclo 4	ciclo 5	ciclo 6
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.77	0.69	0.50		0.37	0.37	0.29
Recupero %	60.5	88.9	85.6	100	93.1	100	

$F = 1$ ml/min, $c_0 = 0.25$ mg/ml	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	rigenerazione	ciclo 4	ciclo 5	ciclo 6
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.81	0.64	0.41		0.55	0.25	0.26
Recupero %	54.8	87.7	95.7	100	–	–	

Nelle figure riportate nel seguito sono confrontati i risultati sperimentali delle fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione per i cicli eseguiti ad una portata di 1 ml/min, in cui la concentrazione di IgG nell'alimentazione è pari a 0.5 mg/ml. Le membrane sono state rigenerate dopo il terzo ciclo, quindi si riportano separatamente i risultati per i primi tre cicli e per i tre cicli eseguiti dopo la rigenerazione con soda. In Tabella 3.5 sono invece riportati i dati di capacità dinamica e recupero nella fase di eluizione ottenuti dalle elaborazioni dei dati sperimentali.

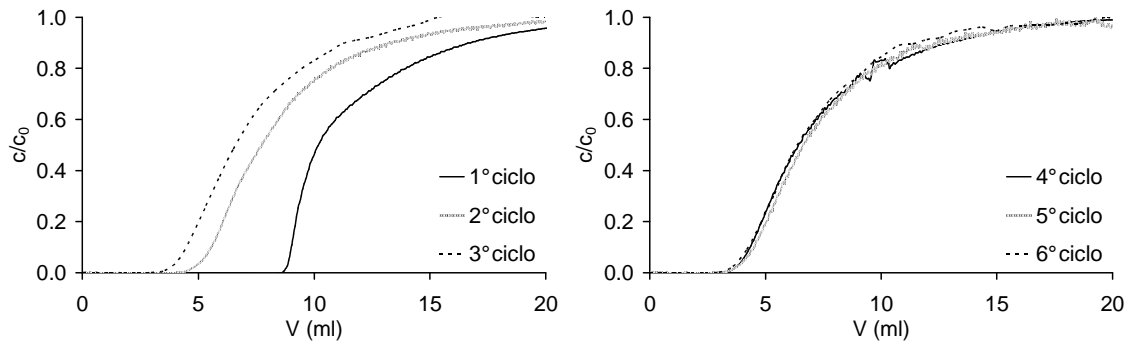


Figura 3.2 Confronto delle curve di adsorbimento per sei cicli cromatografici successivi: a sinistra i cicli prima della rigenerazione e a destra i cicli dopo la rigenerazione.  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.5$  mg/ml.

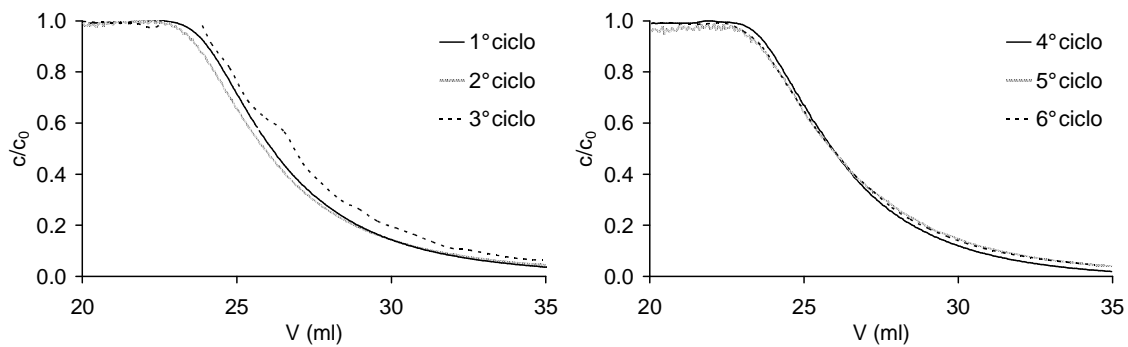


Figura 3.3 Confronto delle curve di lavaggio per sei cicli cromatografici successivi: a sinistra i cicli prima della rigenerazione e a destra i cicli dopo la rigenerazione.  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.5$  mg/ml.

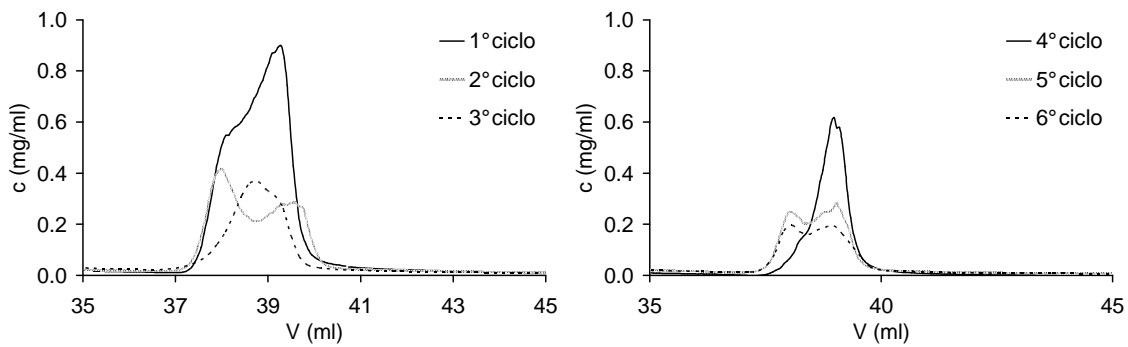


Figura 3.4 Confronto delle curve di eluizione per sei cicli cromatografici successivi: a sinistra i cicli prima della rigenerazione e a destra i cicli dopo la rigenerazione.  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.5$  mg/ml.

Per tutte le condizioni operative analizzate, si osserva un brusco calo della capacità dinamica tra il primo ed il secondo ciclo, diminuzione che continua anche nei cicli a seguire, ma in maniera più contenuta. Questo comportamento è riflesso anche dal picco di eluizione, che sottende un'area via via minore con il susseguirsi dei cicli. È evidente quindi che la rigenerazione non è in grado di ripristinare le condizioni originali del supporto.



In quasi tutti gli esperimenti eseguiti si nota che il profilo della concentrazione nella fase di eluizione mostra spesso un doppio picco. Un'altra considerazione va fatta sul recupero: per qualsiasi condizione operativa studiata la resa di eluizione del primo ciclo si assesta intorno al 60%, aumenta con il progredire del numero dei cicli e raggiunge valori intorno al 100% per i cicli eseguiti dopo la rigenerazione.

Queste due osservazioni sono correlate tra loro se si ipotizza che la proteina interagisca con il supporto sia in maniera specifica che non specifica [6]. In particolare, se i legami di tipo non specifico sono forti o al limite irreversibili, il desorbimento della biomolecola in fase di eluizione può risultare difficile. Introducendo quest'ipotesi è presto spiegato il basso valore di recupero per il primo ciclo. Nei cicli successivi i siti di legame non specifici sono quasi tutti occupati e la proteina può interagire solo con i siti specifici. Difatti la capacità nei cicli successivi è minore rispetto a quella iniziale, ma quasi tutta la proteina adsorbita viene recuperata grazie alla reversibilità dei legami specifici.

Se l'ipotesi dell'esistenza di due siti di legame è valida, allora è molto probabile che le due reazioni abbiano diversa cinetica. Per verificare questa deduzione si può fare riferimento alla Figura 3.5, in cui sono riportate due curve di adsorbimento registrate in esperimenti condotti alla stessa concentrazione di IgG ma a diverse portate. Entrambe le curve sono riferite al primo ciclo di utilizzo delle membrane. Si nota che la pendenza iniziale della curva di breakthrough è indipendente dalla portata, ma nel tratto terminale la pendenza è molto diversa nei due casi proposti. In particolare, all'aumentare della portata la pendenza diminuisce visibilmente. Quest'osservazione dimostra che una delle due reazioni è molto più veloce rispetto ai fenomeni convettivi e quindi il profilo di concentrazione non dipende dalla portata considerata; l'altra reazione invece è più lenta, con tempo caratteristico confrontabile o minore rispetto a quello per la convezione.

Per stabilire quale dei due tipi di interazioni abbia una cinetica più veloce si richiama l'attenzione sulla Figura 3.2. Il presupposto di partenza ipotizza che nei cicli successivi al primo la curva di breakthrough, e quindi la sua pendenza, è principalmente definita dalla reazione specifica. La curva di adsorbimento per il primo ciclo invece deve includere i due contributi, reazione specifica e non specifica. Si osserva che la breakthrough per il primo ciclo ha pendenza simile alle altre curve solo nel tratto finale, mentre la zona iniziale è molto più ripida. Di conseguenza la reazione di adsorbimento non specifica avviene velocemente e in modo irreversibile, mentre l'interazione specifica è descritta da una lenta reazione di equilibrio.

In Figura 3.5 si nota che l'area sottesa dai due picchi di eluizione è identica, indice che il recupero non è influenzato dalla portata alla quale viene eseguita la prova. Tuttavia, all'aumentare della portata il picco si allarga e

contemporaneamente si abbassa, indice che in questa fase entrano in gioco fenomeni cinetici più lenti rispetto alla convezione.

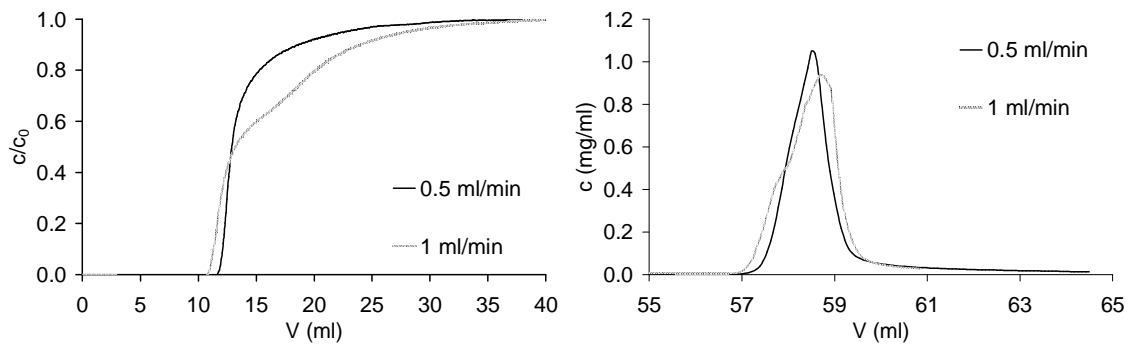


Figura 3.5 Confronto del primo ciclo eseguito a diverse portate e ad una concentrazione di IgG nell'alimentazione pari a 0.25 mg/ml: fase di adsorbimento (a sinistra) e fase di eluizione (a destra).

Dati gli scarsi risultati ottenuti nella fase di eluizione usando una soluzione di glicina, è stato proposto di cambiare il tampone sia intermini di composizione che di pH. Al posto di glicina 0.1 M pH 2.8 è stata adoperata una soluzione 0.1 M di acido citrico a pH 2.5. I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 3.6 e riassunti in Tabella 3.6. Il recupero sembra indipendente dal tampone usato. Infatti nel primo ciclo eluisce circa il 58% della proteina inizialmente adsorbita, e nel secondo ciclo i valori di recupero si aggirano intorno al 90%. Anche il calo di capacità dinamica tra il primo e il secondo ciclo è molto simile nei due casi considerati. Si deve dedurre che il cambio di tampone di eluizione non ha comportato nessun vantaggio particolare.

Rispetto ai materiali disponibili in commercio e ad altre membrane studiate in precedenti lavori [7, 8], le membrane A2P-Sartoepoxy hanno una discreta capacità di legame solo per il primo ciclo di utilizzo, mentre hanno una capacità irrisoria nei cicli successivi. Inoltre, il recupero della proteina adsorbita con l'eluizione è poco efficiente.

Tabella 3.6: Capacità dinamica e recupero delle prove sperimentali condotte con diverso tampone di eluizione.

$F = 0.5 \text{ ml/min}, c_0 = 0.25 \text{ mg/ml}$	<i>ciclo 1 glicina</i>	<i>ciclo 1 ac. cit.</i>	<i>ciclo 2 glicina</i>	<i>ciclo 2 ac. Cit.</i>
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.48	1.65	0.32	0.36
Recupero %	59.6	56.8	83.5	100
$F = 1 \text{ ml/min}, c_0 = 0.25 \text{ mg/ml}$	<i>ciclo 1 glicina</i>	<i>ciclo 1 ac. cit.</i>	<i>ciclo 2 glicina</i>	<i>ciclo 2 ac. Cit.</i>
DBC <sub>100%</sub> (mg/ml)	1.81	1.51	0.64	0.59
Recupero %	54.8	58.9	87.7	89.8

Date le scarse prestazioni delle membrane A2P-Sartoepoxy non sono stati condotti cicli con surnatante industriale. Tuttavia, la presenza di due siti di legame differenti risulta interessante dal punto di vista della modellazione. Quest'aspetto sarà discusso nel § 7.3.

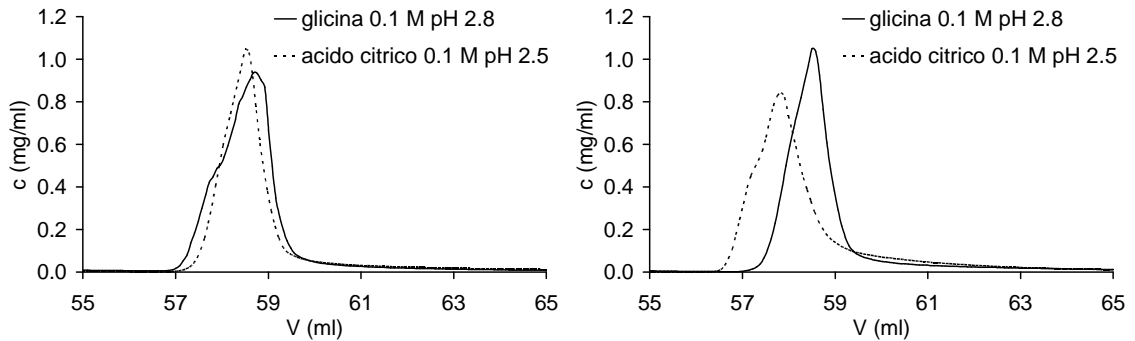


Figura 3.6 Confronto del picco di eluizione misurato nel primo ciclo per diversi tamponi. a sinistra  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.25$  mg/ml; a destra  $F = 0.5$  ml/min,  $c_0 = 0.25$  mg/ml.

### 3.2.2 Membrane A2P-Epoxy2

La diretta evoluzione delle A2P-Sartoepoxy è costituita dalle membrane A2P-Epoxy2, in cui il ligando A2P è immobilizzato su membrane di nuova generazione Epoxy2 (§ 2.3.3.2).

Per verificare i miglioramenti apportati dalla nuova matrice polimerica, otto cicli cromatografici consecutivi sono stati eseguiti con 6 membrane sovrapposte. Le condizioni operative sono state mantenute costanti per tutti i cicli, con una portata di 1 ml/min ed una concentrazione di IgG di circa 0.55 mg/ml. Per verificare gli effetti del tampone rigenerante sulle membrane, la fase di rigenerazione è stata eseguita alla fine di ogni prova per i primi cinque cicli cromatografici, mentre è assente negli ultimi tre. In Tabella 3.7 sono riassunte le principali informazioni sullo svolgimento degli esperimenti.

Le curve di adsorbimento e di eluizione per i primi 5 cicli consecutivi sono riportate in Figura 3.7. Da considerazioni grafiche, si può affermare che sia la capacità di adsorbimento che la quantità di proteina eluita calano con il numero dei cicli eseguiti. Di contro, le curve di lavaggio sono tra loro quasi perfettamente sovrapposte (dato non riportato).

In Figura 3.8 è riportato l'andamento della quantità di IgG adsorbita e successivamente eluita, oltre ad una stima della massa di proteina eliminata durante la fase di rigenerazione. In quasi tutte le prove fatte, è molto curioso notare che la quantità di proteina che è possibile adsorbire in un dato ciclo è circa uguale alla somma della proteina eluita ed eliminata durante la rigenerazione nel ciclo precedente. È logico infatti che i siti di legame capaci di adsorbire in un ciclo

coincidano con quelli liberati nel ciclo precedente, perché resi vacanti nella fase di eluizione e di rigenerazione. Parte dei siti di legame non viene comunque recuperata, forse a causa di una rigenerazione troppo blanda, dunque si osserva un calo della capacità dinamica con il procedere del numero dei cicli eseguiti. Si nota inoltre, indipendentemente dal ciclo considerato, che la proteina in grado di desorbire dal supporto nella fase di eluizione è mediamente l'80% della proteina precedentemente adsorbita.

Tabella 3.7: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	10
Adsorbimento	IgG umana 0.55 mg/mL in PBS 0.1 M pH 7.4	30
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Eluizione	acido citrico 50 mM pH 3	10
Rigenerazione	acido citrico 50 mM pH 2.5 (solo per le prime 5 prove)	10
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	10

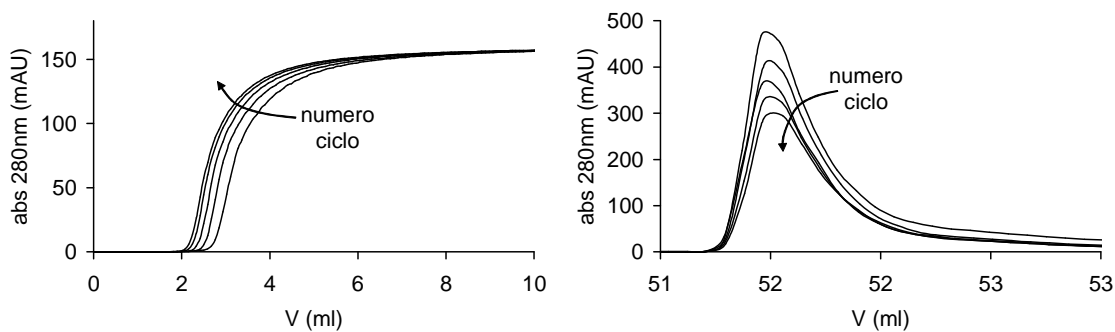


Figura 3.7: Curve di adsorbimento (a sinistra) e di eluizione (a destra) per i primi cinque cicli cromatografici eseguiti.

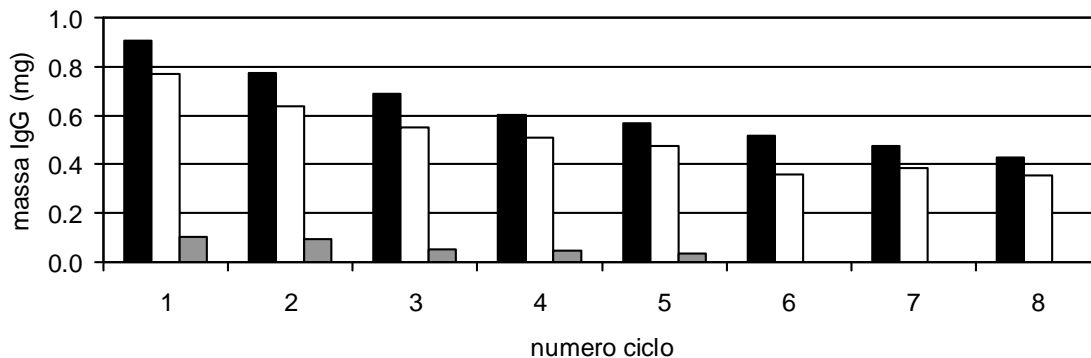


Figura 3.8: Quantità di IgG adsorbita (■), eluita (□) e rigenerata (▨) relativamente ai cicli cromatografici eseguiti.

Negli ultimi tre esperimenti le membrane non sono state rigenerate tra un ciclo ed il successivo. Nonostante la capacità continui a diminuire, la quantità ottenuta

in eluizione è pressoché costante. È possibile che anche in questo sistema la proteina interagisca con due siti di legame, uno dei quali specifico e reversibile, corrispondente alla quantità di proteina eluita negli ultimi cicli, ed un altro non specifico solo parzialmente reversibile.

Risulta interessante confrontare questi risultati con quelli ottenuti con le membrane A2P-Sartoepoxy per esperimenti condotti a concentrazione e portata simile. Per membrane A2P-Epoxy2 la capacità al primo utilizzo è pari a 1.53 mg/ml, valore di poco inferiore rispetto alle A2P-Sartoepoxy. Tuttavia, già nel secondo ciclo la capacità delle A2P-Epoxy2 è praticamente il doppio rispetto al precedente supporto. Il calo di capacità dinamica è un fenomeno che interessa entrambi i sistemi studiati, ma è molto più drastica per membrane A2P-Sartoepoxy. In particolare, per le membrane A2P-Epoxy2 la diminuzione tra una prova e la successiva è pressoché costante ed è circa del 10%, mentre per le A2P-Sartoepoxy dal primo al secondo ciclo si ha un calo di oltre il 60%.

Rispetto alle precedenti membrane, le A2P-Epoxy2 hanno sicuramente prestazioni più alte, ma la capacità di legame rimane comunque bassa. Per questo motivo non sono state eseguite prove con surnatante industriale, ma si è pensato piuttosto di ricercare altri supporti, nuovi ligandi e/o diverse combinazioni tra supporti e ligandi al fine di migliorare la capacità di separazione.

### **3.2.3 Membrane A2P-TA-Sartoepoxy**

A differenza delle A2P-Sartoepoxy, il ligando sintetico non è immobilizzato direttamente sulle membrane, ma viene usato un opportuno braccio spaziatore, indicato con la sigla TA (§ 2.3.3.3). Questa alternativa è stata proposta per risolvere i problemi legati ai supporti precedentemente esaminati, in particolare in termini di adsorbimento non specifico e recupero della proteina.

Diversi lotti delle membrane A2P-TA-Sartoepoxy sono stati ricevuti nel corso del progetto europeo AIMs in modo da verificare l'affidabilità e la ripetitività del protocollo di attivazione adoperato.

Prima di eseguire una caratterizzazione dinamica dei lotti ricevuti sono state condotte delle prove di equilibrio preliminari in condizioni batch. I risultati sono stati trattati secondo il modello di Langmuir ottenendo i parametri di equilibrio, riassunti per comodità in Tabella 3.8. Da una diretta osservazione dei risultati ottenuti si può stabilire che i diversi lotti non hanno le stesse caratteristiche; l'ultimo lotto ricevuto, SH 426, dovrebbe essere il prodotto di un'ottimizzazione del protocollo di attivazione delle membrane.

L'attenzione è stata focalizzata sulle membrane provenienti da due lotti: SH 211B perché mostrano caratteristiche di adsorbimento migliori rispetto le altre, e SH 426 perché relative al protocollo di attivazione ottimizzato. Anche le

membrane SH 265 ed SH 280 sono state studiate in condizioni dinamiche, ma i risultati ottenuti indicano una capacità di adsorbimento in forte diminuzione con il susseguirsi dei cicli cromatografici ed una resa di eluizione inferiore al 60% (dati non riportati).

Date le buone prestazioni mostrate in discontinuo dalle membrane SH 211B, lo studio sul questo lotto è stato condotto direttamente con il surnatante industriale, in cui la concentrazione di IgG umana è pari a 0.72 mg/ml. Sono stati eseguiti cinque cicli cromatografici consecutivi ad una portata fissa di 1 ml/min usando 5 membrane SH 211B sovrapposte. Le principali informazioni riguardo i cicli eseguiti sono riportati in Tabella 3.9.

Tabella 3.8: Parametri di equilibrio secondo il modello di Langmuir per i lotti di membrane A2P-TA-Sartoepoxy ricevuti.

Lotto	$SBC_{max}$ (mg/ml)	$K_d$ (mg/ml)
SH 211B	4.69	0.186
SH 265	2.91	0.103
SH 286	3.28	0.069
SH 426	3.24	0.055

$SBC_{100\%}$  = capacità dinamica massima della membrana valutata in esperimenti batch.

Tabella 3.9: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Adsorbimento	surnatante industriale	50
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	50
Eluizione	acido acetico 0.1 M pH 2.7	10
Rigenerazione	NaOH 0.6 M	20
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	10

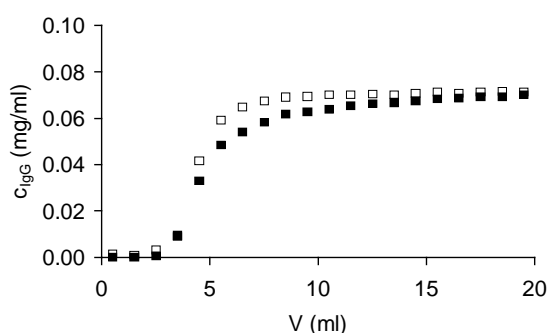


Figura 3.9: Curve di adsorbimento per il primo ciclo (■) ed il secondo ciclo (□) in termini di concentrazione di IgG. Lotto: SH211B.

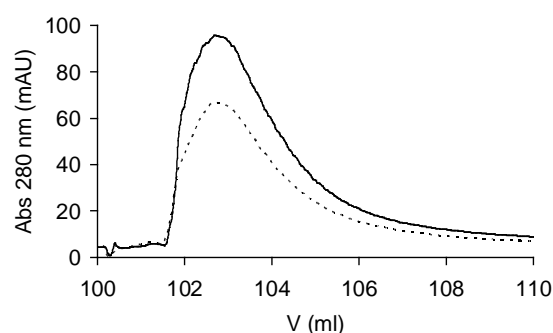


Figura 3.10: Curve di eluizione per il primo ciclo (linea continua) ed il secondo ciclo (linea tratteggiata) in termini di assorbimento a 280 nm. Lotto: SH 211B.

In Figura 3.9 sono riportate le curve di adsorbimento relativamente alla sola IgG per i primi due cicli eseguiti. Si ricorda che per la quantificazione dell'IgG nella miscela è necessario raccogliere dei campioni in uscita dal sistema ed analizzarli all'HPLC con colonna Proteina A (si veda § 2.4.1.3).

Le due curve di breakthrough si sovrappongono solo nella porzione iniziale, mentre nel tratto superiore si allontanano. È difficile stabilire se questa differenza sia dovuta alla presenza di siti di legame specifici e non specifici per l'IgG. Non si conosce infatti il comportamento dei contaminanti in miscela e le possibili interazioni che possono stabilire con il ligando immobilizzato. Per chiarire meglio questo dettaglio sarebbe necessario eseguire prove con soluzioni pure di IgG.

Ciò che si può affermare con certezza è che il secondo ciclo ha capacità di adsorbimento più bassa ( $DBC_{100\%} = 0.55 \text{ mg/ml}$ ) rispetto al primo ( $DBC_{100\%} = 0.67 \text{ mg/ml}$ ), con un calo tra i due cicli pari al 18%. In entrambi i casi la capacità è molto minore di quella teorica calcolata dall'isoterma di Langmuir alla concentrazione di IgG nell'alimentazione ( $DBC_{\text{Langmuir}} = 1.31 \text{ mg/ml}$ , calcolata dai dati in Tabella 3.8). È probabile che il sistema sia poco selettivo e che le impurità presenti nel surnatante industriale siano in grado di bloccare alcuni siti di legame. Si ricorda a questo proposito che l'acido pluronico F68 contenuto nella miscela complessa interagisce fortemente con il ligando A2P (§ 2.3.2.2). È anche possibile che il protocollo di rigenerazione sia meno efficace quando si trattano miscele complesse piuttosto che soluzioni pure di IgG.

Il calo di capacità tra i due cicli è confermato qualitativamente anche dai profili di eluizione riportati in Figura 3.10. Difatti il picco di eluizione per il secondo ciclo è più basso rispetto al primo. Nonostante non si abbiano informazioni sulla composizione delle frazioni di eluizione, si può ragionevolmente supporre che in questa fase i contaminanti non siano predominanti sull'IgG, per cui il picco in termini di assorbanza è una stima qualitativa dell'IgG recuperato in eluizione.

Al fine di verificare l'effettiva ottimizzazione del protocollo di attivazione delle membrane, sull'ultimo lotto ricevuto, SH 426, sono stati eseguiti alcuni cicli cromatografici completi sia con soluzioni pure di IgG che con il surnatante industriale. In tutti i cicli sono state impiegate 5 membrane sovrapposte.

Nei primi esperimenti, una soluzione di IgG pura alla concentrazione di circa  $0.81 \text{ mg/ml}$ , è stata alimentata per quattro cicli consecutivi ad una portata di  $2 \text{ ml/min}$ . Le soluzioni usate nelle fasi di equilibratura, lavaggio, eluizione e rigenerazione sono uguali a quelle usate per i cicli condotti con il lotto SH 211B e già riportate in Tabella 3.9.

I risultati sperimentali più significativi sono riportati in Figura 3.11 e Figura 3.12. Rispetto ai sistemi analizzati finora, questo lotto di membrane ha un comportamento più stabile con il numero dei cicli eseguiti. Basti dire che la

diminuzione della capacità tra un ciclo ed il successivo è in media inferiore al 5%. La capacità del primo ciclo è pari a 2.72 mg/ml, mentre per l'ultimo ciclo vale 2.43 mg/ml, valori di poco al di sotto della capacità teorica calcolata dall'isoterma di Langmuir alla concentrazione di 0.81 mg/ml ( $DBC_{Langmuir} = 3.03$  mg/ml, calcolata dai dati in Tabella 3.8).

Tuttavia il recupero di proteina nella fase di eluizione è molto basso, e anche se con il numero dei cicli tende ad aumentare, la resa di eluizione media è del 56.5%, valore molto poco confortante.

I risultati dei cicli cromatografici condotti con il surnatante industriale non smentiscono il fatto che il protocollo di attivazione vada ulteriormente migliorato: la capacità della membrana è solo di 0.85 mg/ml, meno della metà di quella teorica ( $DBC_{Langmuir} = 1.81$  mg/ml). Inoltre il recupero in eluizione è solo del 4%, indice della scarsa selettività di questo sistema nei confronti dell'IgG.

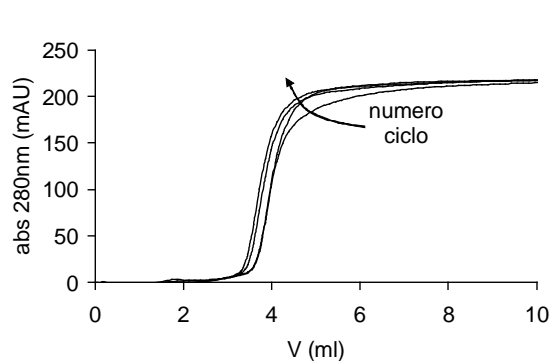


Figura 3.11: Curve di adsorbimento per i quattro cicli eseguiti. Lotto: SH 426.

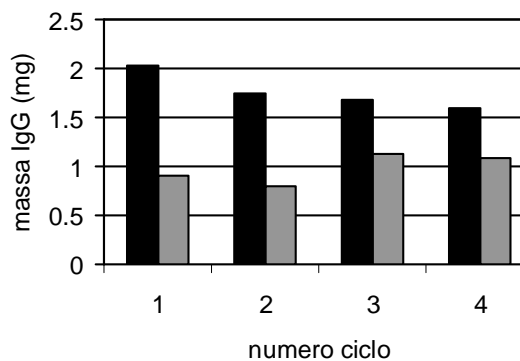


Figura 3.12: Quantità di IgG adsorbita (■) ed eluita (▨) nei quattro i cicli eseguiti. Lotto: SH 426.

### 3.2.4 Membrane A2P-TA-Epoxy2

A differenza delle A2P-TA-Sartoepoxy, nelle membrane A2P-TA-Epoxy2 la matrice è costituita dalle nuove membrane Epoxy2 (§ 2.3.3.3). In questo modo si può verificare se il supporto riveste un ruolo chiave sulle prestazioni della separazione.

Le membrane sono state studiate in due cicli consecutivi in cui è stato alimentato il surnatante industriale. Da precisare che la miscela complessa usata per questi esperimenti proviene da un nuovo lotto, in cui la concentrazione di IgG è di circa 0.12 mg/ml. Le due prove sono state condotte alle portate di 1 e 5 ml/min con 5 membrane sovrapposte. Le informazioni su durata e soluzioni alimentate in ciascuna fase cromatografica sono riportate in Tabella 3.10.



Tabella 3.10: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Adsorbimento	surnatante industriale	50
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	30
Eluizione	acido acetico 0.1 M pH 2.7	20
Rigenerazione	NaOH 0.6 M	20
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20

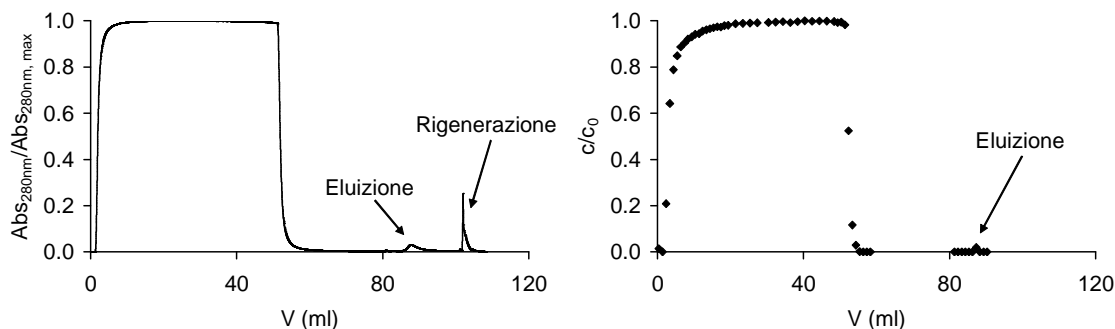
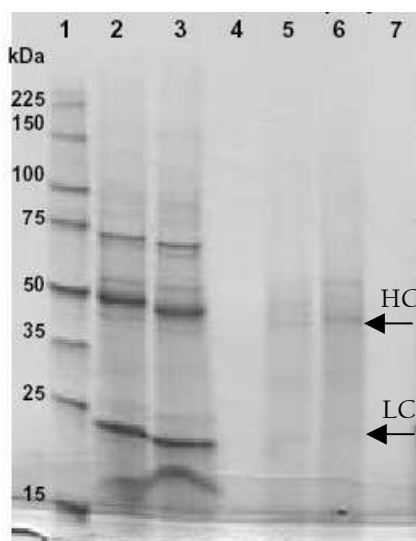


Figura 3.13: Risultati del ciclo cromatografico condotto a 5 ml/min in termini di assorbanza a 280nm (a sinistra) e di concentrazione di IgG (a destra). Entrambi i profili sono normalizzati ad 1.



corsia	campione
1	standard pesi molecolari
2	surnatante industriale
3	frazione fine adsorbimento (V = 50 ml)
4	frazione lavaggio (V = 60 ml)
5	frazione eluizione (V = 85 ml)
6	frazione eluizione (V = 86 ml)
7	frazione rigenerazione (V = 102 ml)

Figura 3.14: Gel di elettroforesi in condizioni di denaturazione delle frazioni più rappresentative raccolte dal ciclo condotto alla portata di 5 ml/min.  
LC: IgG Light Chain; HC: IgG Heavy Chain.

In Figura 3.13 sono riportati il profilo del segnale di assorbanza registrato dal rivelatore UV a 280 nm e l'andamento della concentrazione di IgG nelle frazioni raccolte in uscita dall'FPLC. Un commento necessario è relativo al picco di eluizione che risulta molto poco pronunciato, indice di una bassa resa in eluizione.

Il gel di elettroforesi riportato in Figura 3.14 conferma quest'osservazione. In corrispondenza delle bande relative alle catene leggere e pesanti dell'IgG, aventi rispettivamente pesi molecolari di 25 e 50 kDa, le due frazioni di eluizione

mostrano una debolissima colorazione (corsie 5 e 6), mentre il surnatante industriale presenta due nitide bande che segnalano la presenza di IgG nell'alimentazione, (corsia 2).

Nonostante in questo lotto la concentrazione di IgG nel surnatante industriale sia superiore rispetto a quello precedentemente usato, la capacità dinamica di queste membrane risulta confrontabile se non addirittura inferiore rispetto quella trovata per le A2P-TA-Sartoepoxy (Tabella 3.11). Inoltre il recupero della proteina è inefficiente, con valori della resa nella fase di eluizione prossimi a zero.

Tabella 3.11: Risultati dei cicli cromatografici eseguiti in termini di capacità di adsorbimento dinamica e di recupero nella fase di eluizione.

<i>F</i> (ml/min)	<i>DBC</i> <sub>100%</sub> (mg/ml)	<i>Recupero</i> (%)
1	0.673	0.00
5	0.725	0.63

Le cause delle basse prestazioni di separazione possono essere imputate a diversi fattori, come la scarsa selettività delle membrane A2P-TA-Epoxy2, l'interferenza dell'acido pluronico F68 con il ligando A2P o l'inefficienza dei tamponi di eluizione e rigenerazione usati.

### 3.2.5 Confronto tra le membrane con ligando A2P

I risultati ottenuti con le membrane che supportano il ligando sintetico A2P hanno mostrato una bassa capacità di legame. Inoltre è stata notata una diminuzione della capacità dinamica con il susseguirsi dei cicli. Nella fase di eluizione il recupero è spesso molto basso o addirittura nullo. Infine, nel caso in cui vengono trattate miscele complesse, l'A2P è poco selettivo nei confronti dell'IgG e viene irreversibilmente bloccato dalle impurità e da altri composti come l'acido pluronico F68. Il comportamento descritto è del tutto simile per le due matrici usate (Sartobind Epoxy ed Epoxy2). Le basse prestazioni di queste membrane non giustifica un loro utilizzo in campo industriale, pertanto devono essere ricercati altri supporti di affinità più promettenti.

## 3.3 Ligando sintetico B14

Anche il ligando B14 è stato accoppiato su diverse matrici porose per valutare l'influenza del supporto sulle prestazioni di separazione.

Prove di equilibrio in condizioni batch hanno evidenziato una capacità di legame pari a zero nel caso in cui il B14 venga immobilizzato sulla matrice con protocolli diversi da quello sviluppato dall'Università di Vienna. D'altro canto,

sono stati ottenuti risultati molto promettenti nel caso in cui il B14 è legato mediante il braccio spaziatore TA. Solo quest'ultimo tipo di membrane sono state caratterizzate in condizioni dinamiche e i risultati sono presentati nel seguito.

### 3.3.1 Membrane B14-TA-Sartoepoxy

Sono stati studiati entrambi i lotti delle membrane B14-TA-Sartoepoxy ricevuti. I lotti sono indicati con le sigle SH 502 ed SH 558 (§ 2.3.3.4).

Da prove di adsorbimento in condizioni batch con soluzioni di IgG pura è emersa un'ottima riproducibilità dei dati sperimentali ottenuti con i due lotti. Inoltre non è stata riscontrata una diminuzione della capacità con il numero dei cicli eseguiti e il recupero medio in eluizione è superiore al 90%. I risultati molto promettenti hanno suggerito l'idea di eseguire un'estesa caratterizzazione dinamica sia con soluzioni di IgG pura che con il surnatante industriale.

#### 3.3.1.1 Risultati delle prove con soluzioni di IgG pura

Un numero di 5 membrane sovrapposte del lotto SH 502 sono state sottoposte a numerosi cicli cromatografici di adsorbimento, lavaggio, eluizione e rigenerazione consecutivi a diverse condizioni operative. Esperimenti simili sono stati eseguiti sul lotto SH 558 con 10 membrane sovrapposte. Tutte le condizioni operative sono riassunte in Tabella 3.12 e Tabella 3.13.

Per valutare con precisione la capacità dinamica di questo sistema, la fase di adsorbimento è stata terminata solo dopo che le membrane sono state completamente saturate. La durata dell'adsorbimento dipende quindi dalla concentrazione di IgG nell'alimentazione: per basse concentrazioni è necessario introdurre una quantità maggiore di soluzione e viceversa per alte concentrazioni.

Dato il gran numero di prove sperimentali eseguite è impossibile riportare tutti i dati ottenuti. L'andamento generale delle curve può comunque essere compreso prendendo alcuni risultati a titolo di esempio.

Tabella 3.12: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche per gli esperimenti condotti con soluzioni pure di IgG.

<i>Fase cromatografica</i>	<i>Tampone</i>	<i>V<sub>alim</sub> (ml)</i>
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Adsorbimento	IgG umana diluita in PBS 0.1 M pH 7.4	12 – 65
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Eluizione	glicina 0.1 M pH 2.8	20
Rigenerazione	NaOH 0.6 M	20
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20

Tabella 3.13: Riassunto schematico di tutte le prove dinamiche condotte alle diverse condizioni operative eseguite con il lotto SH 502 (a sinistra) e con il lotto SH 558 (a destra).

$c_0$ (mg/ml) \ F (ml/min)	1	2	5	10
0.32	X	X	X	X
0.56	X	X	X	X
1.11	X	X	X	X
1.61	X	X	X	X
2.13	X	X	X	X

$c_0$ (mg/ml) \ F (ml/min)	1	2	5	10
0.35	X	X	X	X
0.57	X	X	X	X
1.04	X	X	X	X
1.56	X	X	X	X
1.95	X	X	X	X

In Figura 3.15 sono presentati i profili di concentrazione di IgG in uscita dal sistema relativamente agli esperimenti condotti a portata variabile e con concentrazione fissa pari a 0.54 mg/ml. Le curve sono praticamente sovrapposte, indipendentemente dalla portata, e cercare di distinguere una dall'altra è pressoché impossibile. Questa osservazione è valida per qualsiasi concentrazione esaminata e per entrambi i lotti studiati. Se la portata non influenza la curva di adsorbimento è estremamente probabile che i fattori cinetici legati al trasporto di materia e all'adsorbimento siano molto più veloci rispetto alla convezione e la reazione possa essere considerata all'equilibrio. La quantità di proteina adsorbita sulla membrana è pressoché costante con la portata (errore relativo minore del 5%) ed eventuali differenze vanno imputate ad errori di tipo sperimentale.

Diverso è il caso del picco di eluizione (Figura 3.16), che all'aumentare della portata si appiattisce e contemporaneamente si allarga, come peraltro notato in altri sistemi [9]. L'area sottesa dalla curva è comunque identica, quindi la quantità di proteina globalmente recuperata durante questa fase è costante. Al contrario di quanto visto nell'adsorbimento, la dipendenza del profilo dalla portata suggerisce che in questa fase sono in gioco fenomeni dominanti sulla convezione, come per esempio la cinetica di distacco della proteina dal supporto.

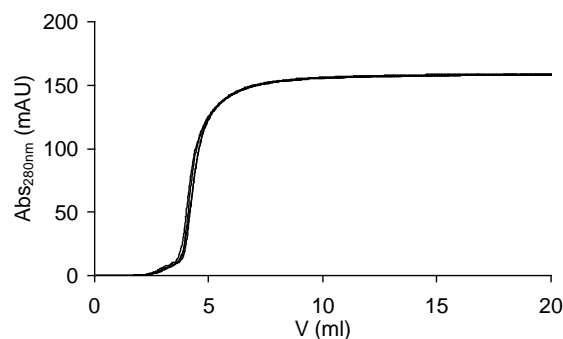


Figura 3.15: Curve di breakthrough per le prove eseguite con il lotto SH 502 ad una concentrazione di IgG pari a 0.54 mg/ml. Portata variabile: 1, 2, 5 e 10 ml/min.

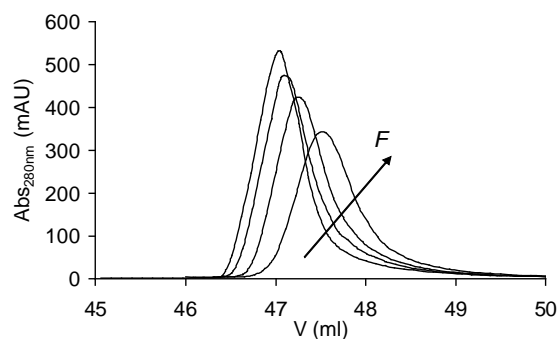


Figura 3.16: Curve di eluizione per le prove eseguite con il lotto SH 502 ad una concentrazione di IgG pari a 1.07 mg/ml. Portata variabile: 1, 2, 5, 10 ml/min.

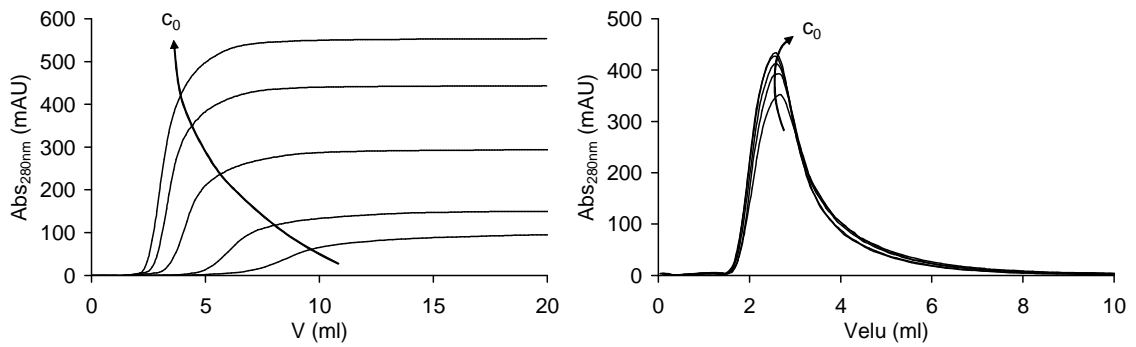


Figura 3.17: Curve di adsorbimento (a sinistra) e di eluizione (a destra) per le prove eseguite con il lotto SH 558 ad una portata di 2 ml/min. Concentrazione di IgG nell'alimentazione variabile: 0.35, 0.57, 1.04, 1.56, 1.95 mg/ml.

La dipendenza delle curve di adsorbimento ed eluizione dalla concentrazione è banale (Figura 3.17). Nella fase di adsorbimento, all'aumentare della concentrazione di IgG la membrana si satura più velocemente e la curva di breakthrough emerge prima; contemporaneamente il segnale di assorbanza registrato è più alto. Per ragioni di equilibrio termodinamico, la quantità di proteina legata sul supporto alla fine della fase di adsorbimento, ovvero la capacità dinamica, cresce con l'aumentare della concentrazione di IgG nell'alimentazione fino a saturazione completa della membrana (si veda § 5.1.2).

Il profilo nella fase di eluizione è leggermente crescente con la concentrazione. Difatti in questa fase la quantità di proteina eluita dipende da quella precedentemente adsorbita, e quindi dalla concentrazione di IgG nell'alimentazione.

Un'osservazione molto interessante può essere fatta riguardo i risultati ottenuti nella fase di lavaggio. Le curve sperimentali relative ai cicli cromatografici si sovrappongono perfettamente con le curve di dispersione nei volumi esterni alla colonna (Figura 3.18). Esiste una sola spiegazione in grado di giustificare questo comportamento: per definizione, la curva di dispersione è condotta in condizioni non adsorbenti e dunque rappresenta il risultato di tutti e solo i fenomeni di trasporto nel sistema, essendo assente qualsivoglia fenomeno cinetico. Se la curva di un ciclo di affinità si sovrappone a quella di dispersione allora è chiaro che nella fase di lavaggio i fenomeni cinetici siano trascurabili rispetto quelli di trasporto. È probabile che le interazioni tra l'IgG ed il ligando B14 siano sufficientemente forti da rendere trascurabile il desorbimento della proteina durante il lavaggio. Questa osservazione sarà ripresa nel § 7.5.1, in cui verrà esposta la strategia risolutiva per eseguire le simulazioni su questo sistema.

I risultati ottenuti con i due lotti possono essere confrontati solo per via indiretta. Si ricorda infatti che le prove sono state condotte con 5 membrane sovrapposte nel caso del lotto SH 502, e con 10 membrane per il lotto SH 558.

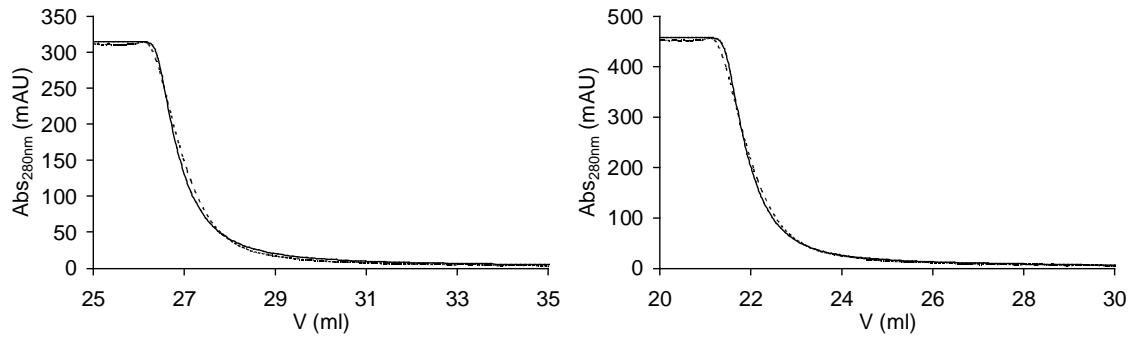


Figura 3.18: Confronto tra le curve di lavaggio di cicli di affinità (linea continua) e di dispersione (linea tratteggiata) per le prove eseguite con il lotto SH 502;  $F = 1 \text{ ml/min}$   $c_0 = 1.07 \text{ mg/ml}$  (a destra);  $F = 2 \text{ ml/min}$   $c_0 = 1.61 \text{ mg/ml}$  (a sinistra).

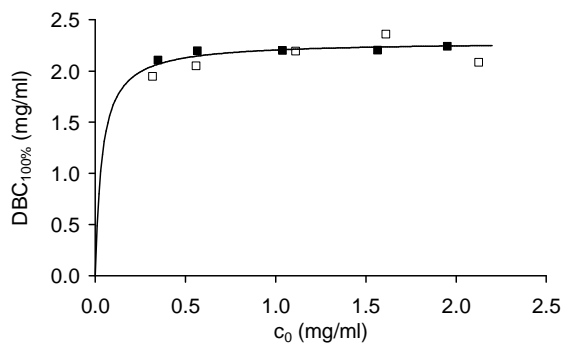


Figura 3.19: Capacità dinamica in funzione della concentrazione di IgG nell'alimentazione per il lotto SH 502 ( $\square$ ) e SH 558 ( $\blacksquare$ ). I dati sono stati approssimati secondo l'isoterma di Langmuir (linea continua).

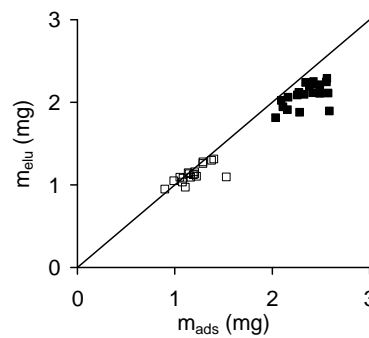


Figura 3.20: Quantità di IgG eluita in funzione della massa precedentemente adsorbita per 5 membrane lotto SH 502 ( $\square$ ) e 10 membrane lotto SH 558 ( $\blacksquare$ ).

Il confronto più efficace che è possibile eseguire si basa sui dati di capacità dinamica. In Figura 3.19 sono riportati i valori della capacità di legame in funzione della concentrazione di IgG nell'alimentazione. Minime differenze tra i risultati ottenuti con i due lotti sono da imputare ad errori di tipo sperimentale. Per interpolazione dei dati sperimentali con l'isoterma di Langmuir sono stati determinati i parametri termodinamici caratteristici, pari a  $2.27 \text{ mg/ml}$  per la capacità massima di adsorbimento,  $DBC_{\max}$  e di  $0.0401$  per la costante di dissociazione di Langmuir  $K_d$ . La capacità massima stimata non ha un valore particolarmente alto, ma la costante di dissociazione è piuttosto bassa rispetto ad altri sistemi [8], indice di una maggiore affinità di questo supporto nei confronti dell'IgG. Questo dato conferma quanto osservato nella fase di lavaggio.

Anche il recupero nella fase di eluizione mostra degli ottimi risultati. In Figura 3.20 è riportata la massa di IgG eluita in funzione dell'IgG precedentemente adsorbita sulla colonna. Quasi tutti i punti si sovrappongono sulla bisettrice,

confermando una resa di eluizione molto alta, che mediamente è del 95% per il lotto SH 502 e di circa il 90% per il lotto SH 558.

### **3.3.1.2 Risultati delle prove con surnatante industriale**

Due lotti diversi del surnatante industriale sono stati usati in queste prove. Il primo lotto, alimentato alle membrane SH 502, ha una concentrazione di IgG di circa 0.12 mg/ml, mentre nel secondo lotto, usato sulle membrane SH 558, la concentrazione di IgG è pari a 0.07 mg/ml. Vista la differenza di concentrazione, i risultati degli esperimenti ottenuti saranno mostrati in termini adimensionali.

Le prove sono state eseguite alle portate di 1 e 5 ml/min su 5 membrane SH 502 sovrapposte; lo stesso numero di membrane del lotto SH 558 è stato testato alle portate di 1, 2, 5 e 10 ml/min. Le soluzioni alimentate e la durata delle fasi cromatografiche sono riportate in Tabella 3.14.

A titolo di esempio, in Figura 3.21 sono riportate le curve di breakthrough in termini di assorbanza totale e di concentrazione di IgG per una prova eseguita sul lotto SH 502. Si ricorda che la curva di assorbanza è registrata dal rivelatore UV e tiene conto di tutte le specie presenti nella miscela; il profilo dell'IgG è determinato grazie alle analisi condotte all'HPLC con colonna ProteinA sulle frazioni raccolte in uscita. Si può osservare che la curva relativa all'IgG emerge qualche ml dopo che il profilo UV è già apparso. Questo è un ottimo segnale, indice dell'effettivo adsorbimento dell'IgG sul supporto. Da un confronto dei risultati ottenuti con i due lotti (Figura 3.22) si nota una piccola differenza tra le due curve sperimentali; tale divergenza è principalmente dovuta alla diversa concentrazione di IgG nella miscela. Infatti negli esperimenti condotti con il lotto SH 502 la concentrazione di IgG nella miscela è maggiore e la curva risulta leggermente più avanzata.

Da un punto di vista quantitativo, la capacità di legame sperimentale è circa il 40% di quella teorica. Infatti la concentrazione di proteina adsorbita sul supporto è mediamente di 0.74 mg/ml per le membrane SH 502 e di 0.50 mg/ml per le SH 558. La capacità di adsorbimento stimata dal modello di Langmuir è invece di 1.69 ed 1.46 mg/ml, valori calcolati usando i parametri di equilibrio determinati per soluzioni pure di IgG in corrispondenza delle concentrazioni di 0.12 e 0.07 mg/ml rispettivamente. Come per gli altri sistemi già studiati, con soluzioni complesse non si riesce a sfruttare l'intera capacità teorica delle membrane B14-TA-Sartoepoxy. Tuttavia il recupero durante la fase di eluizione è completo, con valori della resa che si aggirano intorno al 100%. Questo rappresenta un risultato molto importante, in particolare se si considera che il ligando immobilizzato è di tipo sintetico.

Tabella 3.14: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche per gli esperimenti condotti con il surnatante industriale.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Adsorbimento	surnatante industriale	50
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	50
Eluizione	glicina 0.1 M pH 2.8	20
Rigenerazione	NaOH 0.6 M	20
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20

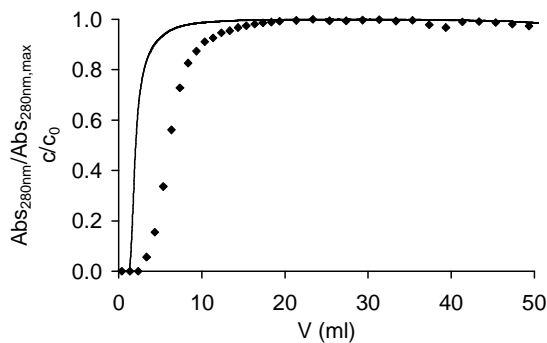


Figura 3.21: Curve di adsorbimento in termini di assorbanza (linea continua) e di concentrazione di IgG (◆) per un esperimento condotto con surnatante industriale alla portata di 5 ml/min con il lotto SH 502. Profili normalizzati ad 1.

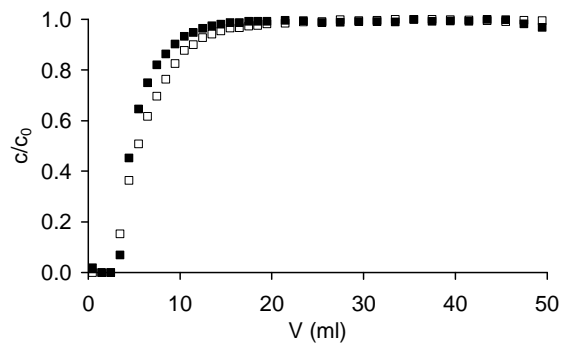


Figura 3.22: Curve di adsorbimento in termini di concentrazione di IgG per gli esperimenti condotti con il surnatante industriale alla portata di 1 ml/min. Lotto SH 502 (□) e SH 558 (■). Profili normalizzati ad 1.

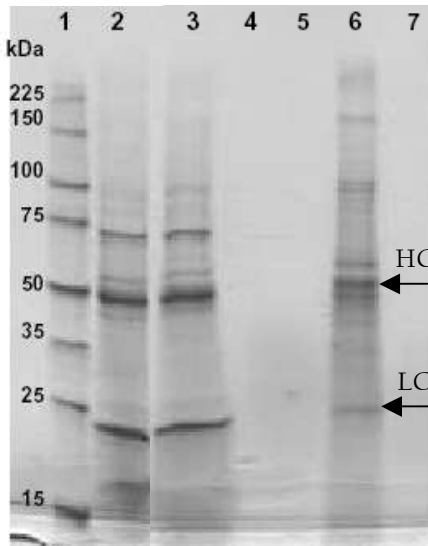
Le ottime caratteristiche evidenziate per le membrane B14-TA-Sartoepoxy trovano conferma nel gel di elettroforesi riportato in Figura 3.23. La corsia 6, relativa ad una frazione raccolta durante l'eluizione, mostra due bande fortemente colorate in corrispondenza delle bande relative alle catene leggere e pesanti dell'IgG (bande a 25 e 50 kDa), indice della presenza di IgG nell'eluato. Le altre bande presenti nella corsia 6 sono da imputare alla presenza di contaminanti. Questa osservazione non deve scoraggiare, infatti raramente si riesce ad ottenere una separazione completa in un solo stadio, e nei processi industriali la cromatografia di affinità riveste solo una delle fasi di purificazione di una biomolecola [10, 11]. Inoltre risultati simili sono ottenuti anche con il ligando biospecifico, la proteina A, come riportato nel gel di elettroforesi di Figura 3.40.

Le frazioni raccolte in uscita dal sistema sono state analizzate anche con colonna ad esclusione di forma. In questo modo si riescono a quantificare le impurità nella miscela e descrivere il loro profilo durante il ciclo cromatografico. I contaminanti presenti sono stati identificati attraverso un'analisi del surnatante alimentato (Figura 3.24): oltre al picco relativo all'IgG, con tempo di ritenzione di



10.9 minuti, si distinguono altri cinque picchi dominanti con tempi di ritenzione di 12.2, 13.8, 14.0, 15.3 e 15.9 minuti.

In Figura 3.25 è riportato il confronto tra il profilo UV e i risultati delle analisi con colonna ad esclusione di forma per i due contaminanti presenti in maggior quantità nel surnatante, rispettivamente con tempo di ritenzione pari a 13.8 e 15.9 minuti. La sovrapposizione dei dati è quasi perfetta, a conferma del fatto che i contaminanti non interagiscono visibilmente con le membrane.



corsia	campione
1	standard pesi molecolari
2	surnatante industriale
3	frazione fine adsorbimento (V = 50 ml)
4	frazione lavaggio (V = 60 ml)
5	frazione eluizione (V = 82 ml)
6	frazione eluizione (V = 83 ml)
7	frazione rigenerazione (V = 102 ml)

Figura 3.23: Gel di elettroforesi in condizioni di denaturazione delle frazioni più rappresentative raccolte dal ciclo condotto con il lotto SH 502 alla portata di 5 ml/min. LC: IgG Light Chain; HC: IgG Heavy Chain.

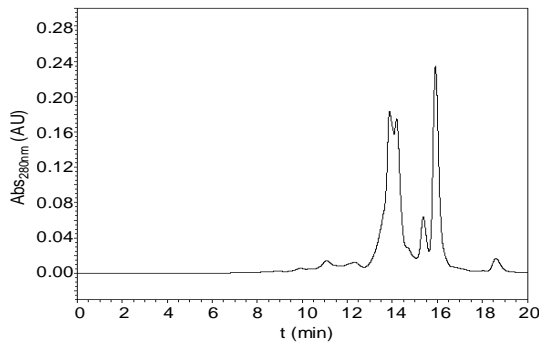


Figura 3.24: Cromatogramma ad esclusione di forma del surnatante industriale.

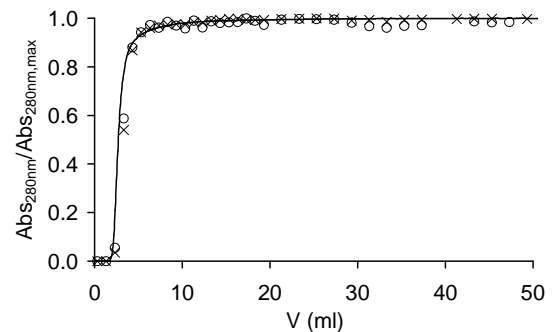


Figura 3.25: Curve di adsorbimento in termini di assorbanza (linea continua) e di concentrazione dei contaminanti con tempo di ritenzione pari a 13.8 (o) e 15.9 (x) minuti. Prova eseguita con il lotto SH 558 alla portata di 10 ml/min. Profili normalizzati ad 1.

### 3.3.2 Membrane B14-TA-Epoxy2

Le membrane B14-TA-Epoxy2 sono il prodotto dell'accoppiamento del ligando sintetico B14 con le membrane di nuova concezione Epoxy2 attraverso il braccio spaziatore TA (§ 2.3.3.4). Anche in questo caso sono stati ricevuti due lotti di

membrane differenti per verificare la riproducibilità del protocollo di attivazione; i due lotti saranno indicati con le sigle SH 503 ed SH 559.

In modo simile a quanto osservato per le B14-TA-Sartoepoxy, queste membrane hanno mostrato un'eccellente riproducibilità dei risultati di adsorbimento con soluzioni pure di IgG in condizioni batch, con valori di recupero in eluizione dell'ordine del 94%.

Si è pensato quindi di ripetere su entrambi i lotti una caratterizzazione dinamica analoga a quella già fatta per le membrane B14-TA-Sartoepoxy, sia con soluzioni pure di IgG che con il surnatante industriale.

### 3.3.2.1 Risultati delle prove con soluzioni di IgG pura

Le condizioni operative e le soluzioni alimentate in queste prove sono del tutto simili a quelle già riportate in Tabella 3.12 e Tabella 3.13. In particolare, le concentrazioni delle soluzioni di IgG pura alimentate al lotto SH 503 sono pari a 0.24, 0.48, 1.05, 1.47 e 2.15 mg/ml, e di 0.14, 0.27, 0.92, 1.34 e 2.03 mg/ml per il lotto SH 559. Un numero di 5 membrane sovrapposte sono state usate in tutti gli esperimenti eseguiti.

I risultati delle prove sono qualitativamente confrontabili con quanto già visto per le membrane B14-TA-Sartoepoxy. Infatti anche in questi esperimenti i profili di concentrazione nella fase di adsorbimento sono indipendenti dalla portata (Figura 3.26), il che suggerisce reazione all'equilibrio; anche il comportamento nella fase di eluizione è simile a quanto già visto, con picchi di eluizione che si allargano e si appiattiscono con l'aumentare della portata (Figura 3.27). L'area sottesa dal picco, equivalente alla quantità di proteina eluita, rimane comunque costante.

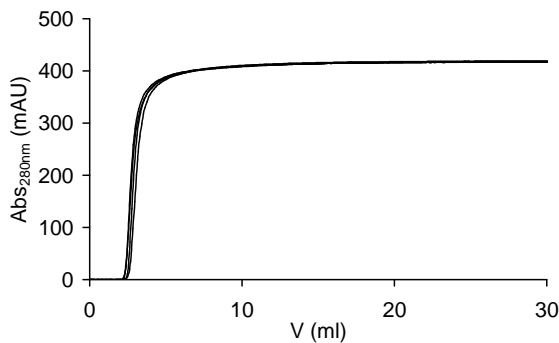


Figura 3.26: Curve di breakthrough per le prove eseguite con il lotto SH 503 ad una concentrazione di IgG pari a 1.47 mg/ml. Portata variabile: 1, 2, 5 e 10 ml/min.

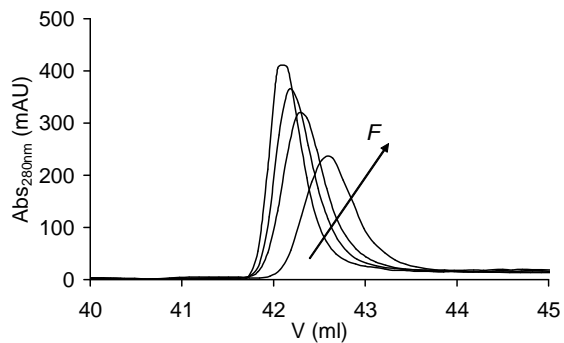


Figura 3.27: Curve di eluizione per le prove eseguite con il lotto SH 559 ad una concentrazione di IgG pari a 1.34 mg/ml. Portata variabile: 1, 2, 5, 10 ml/min.

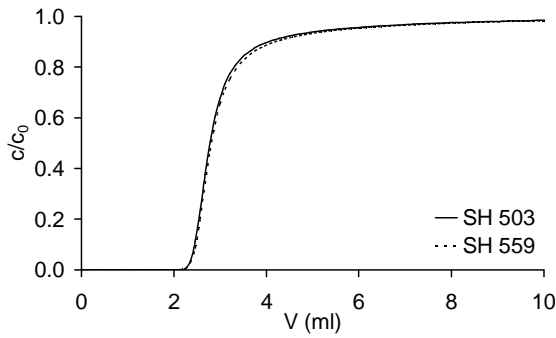


Figura 3.28: Confronto delle curve di breakthrough per la prova eseguita con il lotto SH 503 ad una concentrazione di IgG pari a 2.15 mg/ml e con il lotto SH 509 ad una concentrazione di 2.03 mg/ml. Profili normalizzati ad 1.

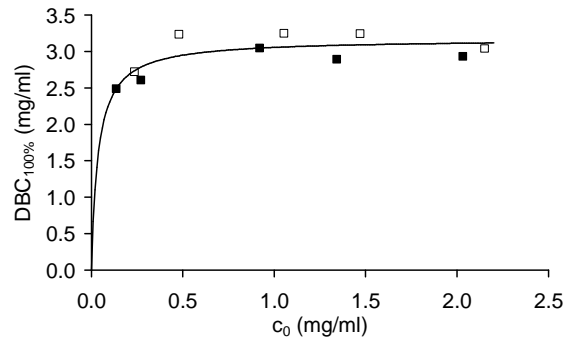


Figura 3.29: Capacità dinamica in funzione della concentrazione di IgG nell'alimentazione per il lotto SH 503 (□) e SH 559 (■). I dati sono stati approssimati secondo l'isoterma di Langmuir (linea continua).

In Figura 3.28 è riportato il confronto della curva di adsorbimento tra due esperimenti condotti alla stessa portata e concentrazione simile. I profili sono normalizzati per favorire il paragone a causa della leggera differenza di concentrazione. È evidente una sovrapposizione praticamente perfetta, ulteriore dimostrazione della ripetitività del protocollo di attivazione formulato.

I dati di capacità dinamica dell'insieme dei risultati a disposizione è stato interpolato utilizzando il modello di Langmuir (Figura 3.29). I parametri di equilibrio stimati sono pari a 3.17 mg/ml per la capacità massima e 0.037 mg/ml per la costante di dissociazione di Langmuir.

Per queste membrane, la resa di eluizione si assesta intorno al 95%, abbastanza alta da poter affermare che il recupero di proteina è completo.

### 3.3.2.2 Risultati delle prove con surnatante industriale

In modo analogo a quanto già descritto per gli esperimenti condotti con le B14-TA-Sartoepoxy, le membrane B14-TA-Epoxy2 sono state caratterizzate usando due diversi lotti del surnatante industriale. Il primo lotto, con concentrazione di IgG di circa 0.12 mg/ml, è stato usato per le prove con le membrane SH 503, ed il secondo lotto, con concentrazione di IgG pari a 0.07 mg/ml, è stato alimentato per le prove eseguite con le membrane SH 559.

Le prove sono state eseguite alle portate di 1 e 5 ml/min su 5 membrane SH 503; lo stesso numero di membrane del lotto SH 559 sono state testate alle portate di 1, 2, 5 e 10 ml/min. Le informazioni sulle fasi cromatografiche sono identiche a quelle usate per le prove eseguite con le membrane B14-TA-Sartoepoxy (Tabella 3.14).

I risultati ottenuti sono qualitativamente simili a quelli già presentati nel § 3.3.1.2 per le membrane B14-TA-Sartoepoxy. A titolo di esempio, in Figura 3.30 è

riportato il confronto tra il profilo di assorbanza e quello di concentrazione di IgG, mentre in Figura 3.31 è visualizzato il comportamento dei due contaminanti presenti in maggior quantità nel surnatante industriale. Anche per le membrane B14-TA-Epoxy2 le impurità attraversano la colonna senza interagire con le membrane.

La capacità di adsorbimento di IgG è mediamente di 1.21 ed 1.00 mg/ml per gli esperimenti condotti con i lotti SH 503 ed SH 559. In entrambi i casi, la capacità di adsorbimento teorica stimata dall'isoterma di equilibrio è pari al doppio di quella sperimentale (2.42 e 2.07 mg/ml rispettivamente). Anche per queste membrane, dunque, si deve ammettere la possibilità di interazioni tra i contaminanti e il ligando, il cui effetto è quello di ridurre la capacità di adsorbimento dell'IgG. La resa di eluizione è ottima, con valori dell'ordine del 100%. Il gel di elettroforesi riportato in Figura 3.32 conferma la presenza di IgG nell'eluato.

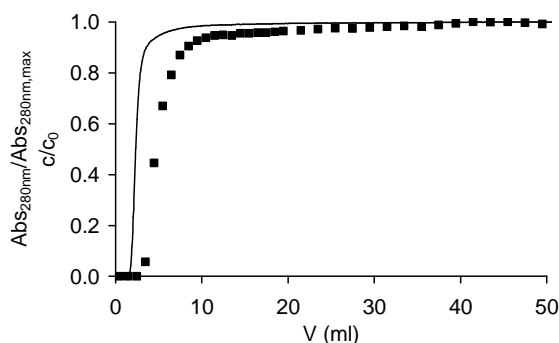


Figura 3.30: Curve di adsorbimento in termini di assorbanza (linea continua) e di concentrazione di IgG (■) per un esperimento condotto con surnatante industriale alla portata di 1 ml/min con il lotto SH 559. Profili normalizzati ad 1.

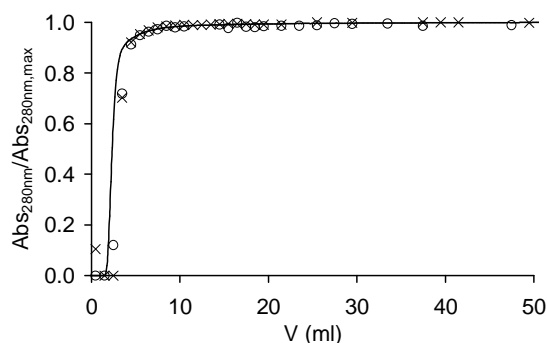
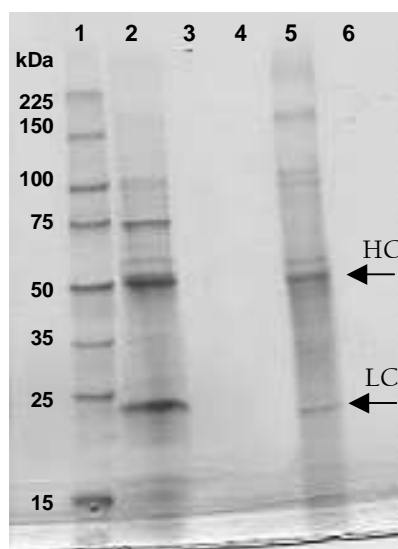


Figura 3.31: Curve di adsorbimento in termini di assorbanza (linea continua) e di concentrazione dei contaminanti con tempo di ritenzione pari a 13.8 (o) e 15.9 (x) minuti. Prova a 1 ml/min con il lotto SH 559. Profili normalizzati ad 1.



corsia	campione
1	standard pesi molecolari
2	frazione fine adsorbimento (V = 50 ml)
3	frazione lavaggio (V = 60 ml)
4	frazione eluizione (V = 82 ml)
5	frazione eluizione (V = 83 ml)
6	frazione rigenerazione (V = 102 ml)

Figura 3.32: Gel di elettroforesi in condizioni di denaturazione delle frazioni più rappresentative raccolte dal ciclo condotto alla portata di 5 ml/min con il lotto SH 503. LC: IgG Light Chain; HC: IgG Heavy Chain.

### **3.3.3 Confronto tra le membrane con ligando B14**

Le membrane B14-TA-Epoxy2 hanno una capacità massima circa il 40% superiore rispetto alle B14-TA-Sartoepoxy, conferma dell'effettiva ottimizzazione della morfologia della nuova matrice Epoxy2 che consente un miglior sfruttamento della superficie interna. La costante di dissociazione di Langmuir ha valori confrontabili per le due membrane studiate, a dimostrazione che l'affinità dell'IgG per il ligando B14 non è influenzata dalla matrice polimerica.

Le membrane B14-TA-Epoxy2 hanno mostrato di avere una resa di eluizione leggermente più alta rispetto le B14-TA-Sartoepoxy; inoltre, nelle prove di adsorbimento eseguite con surnatante industriale, le B14-TA-Epoxy2 mostrano un più efficace sfruttamento del ligando, con una capacità sperimentale di circa il 50% rispetto quella teorica, mentre per le membrane B14-TA-Sartoepoxy è del 40%.

Le membrane B14-TA-Epoxy2 hanno elevate prestazioni per la separazione di IgG; in vista di una futura applicazione in ambito industriale, dovrebbe essere preso in considerazione uno studio di queste membrane su un impianto pilota.

## **3.4 Ligando naturale Proteina A: membrane SartoAIMs Protein A**

Le membrane SartoAIMs ProteinA sono il risultato dell'immobilizzazione della proteina A sulla matrice Epoxy1 (§ 2.3.3.5). Queste sono le uniche membrane studiate nel presente lavoro di tesi ad avere un ligando naturale biospecifico per l'IgG.

Queste membrane sono state inizialmente caratterizzate in esperimenti su scala di laboratorio, sia in condizioni batch che dinamiche. Visti i risultati molto promettenti, sono state successivamente utilizzate in moduli cromatografici per applicazioni analitiche e su scala pilota. È stata così valutata la capacità di scale-up e scale-down del processo di cromatografia di affinità con membrane.

### **3.4.1 Esperimenti su scala di laboratorio**

Due lotti di produzione delle membrane SartoAIMs ProteinA (SA 2665 ed SA 2904) sono stati ricevuti e caratterizzati nel corso del dottorato di ricerca.

Sul primo lotto ricevuto, SA 2665, è stato fatto un esteso lavoro di caratterizzazione dinamica a diverse portate e diverse concentrazioni di IgG nell'alimentazione. Inoltre sono state condotte delle prove anche con il surnatante industriale. Nonostante l'impegno dedicato per eseguire questo studio

sperimentale, il lotto SA 2665 ha mostrato di avere delle prestazioni molto inferiori rispetto a quanto dichiarato dal produttore [12]. È probabile che questo lotto abbia subito una parziale degradazione durante il trasporto e lo stoccaggio. Per questi motivi non saranno esposti i risultati ottenuti con questo sistema.

Il lotto SA 2904 ha mostrato invece delle ottime prestazioni per la separazione di IgG [9]. Saranno quindi presentati i risultati delle prove sperimentali eseguite su questo lotto.

### 3.4.1.1 Risultati delle prove con soluzioni di IgG pura

Oltre ad analizzare il comportamento di queste membrane al variare della portata e della concentrazione di IgG nell'alimentazione, gli esperimenti sono stati condotti con un diverso numero di membrane sovrapposte. In tutte le prove eseguite è stata alimentata una quantità di soluzione sufficiente per saturare le membrane; la durata della fase di adsorbimento dipende quindi non solo dalla concentrazione di IgG ma anche dal numero di membrane inserite nel modulo. Come suggerito dal produttore, la fase di rigenerazione è condotta al termine di cinque cicli consecutivi con un tampone di NaCl 1 M e NaOH 50 mM. In Tabella 3.15 e Tabella 3.16 sono riportati i dettagli operativi di queste prove.

Tabella 3.15: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche per gli esperimenti condotti con soluzioni di IgG pura.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Adsorbimento	IgG umana diluita in PBS 0.1 M pH 7.4	30 – 120
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Eluizione	glicina 0.1 M pH 3.5	20
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Rigenerazione	NaCl 1 M, NaOH 50 mM, ogni cinque cicli	30

Tabella 3.16: Riassunto schematico di tutte le prove dinamiche condotte alle diverse condizioni operative con 10 membrane (a sinistra) e 5 membrane (a destra).

$c_0$ (mg/ml) \ F (ml/min)	1	2	5	10
0.17	X	X	X	X
0.32	X	X	X	X
0.70	X	X	X	X
1.07	X	X	X	X
1.10	X	X	X	X
1.48	X	X	X	X
1.61	X	X	X	X
1.81	X	X	X	X

$C_0$ (mg/ml) \ F (ml/min)	1	2	5	10
0.31	X	X	X	X
0.81	X	X	X	X
1.22	X	X	X	X
1.65	X	X	X	X
2.00	X	X	X	X

### Risultati delle prove sperimentali

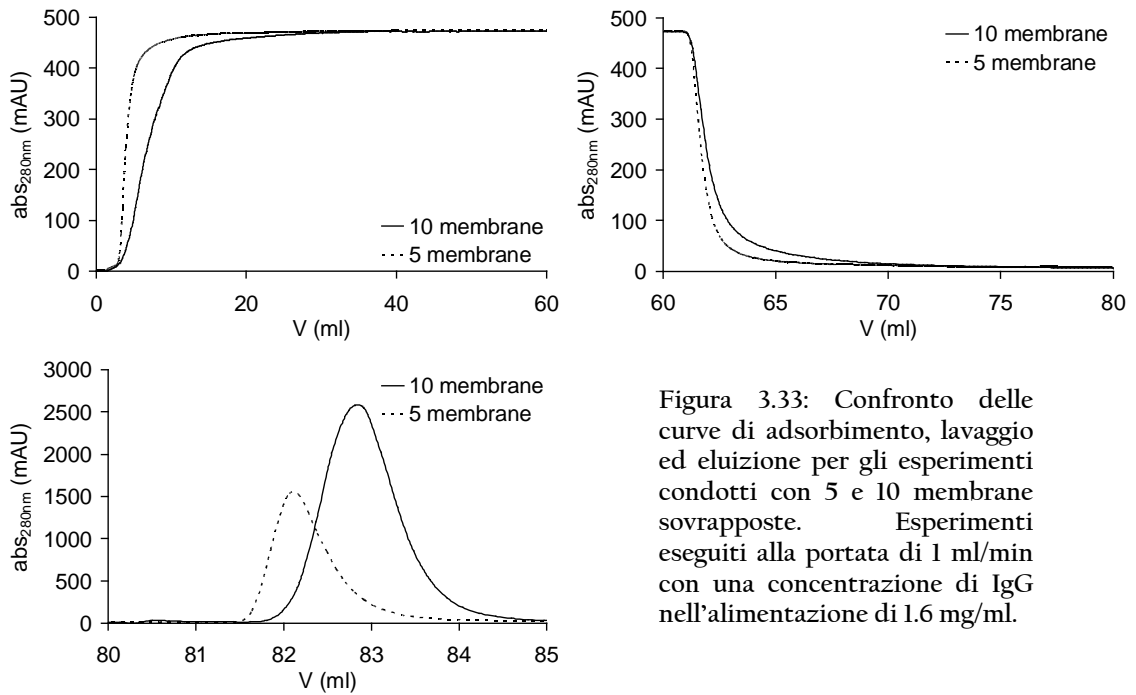


Figura 3.33: Confronto delle curve di adsorbimento, lavaggio ed eluizione per gli esperimenti condotti con 5 e 10 membrane sovrapposte. Esperimenti eseguiti alla portata di 1 ml/min con una concentrazione di IgG nell'alimentazione di 1.6 mg/ml.

La prima e più interessante osservazione che può essere fatta su questa serie di prove è un confronto tra i risultati ottenuti con diverso numero di membrane nel modulo. In Figura 3.33 sono mostrati i profili della concentrazione di IgG in uscita dal sistema nelle fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione; i due esperimenti confrontati sono stati eseguiti alle stesse condizioni operative, ma con 5 e 10 membrane sovrapposte.

Come previsto, una diminuzione del numero di membrane comporta un anticipo della curva di breakthrough a causa della minore quantità di proteina che viene adsorbita sulla colonna. Di conseguenza, con un minor numero di membrane il picco di eluizione risulta più piccolo. Il leggero anticipo che si nota nelle curve di lavaggio ed eluizione è invece dovuto al minor tempo di permanenza associato al volume della colonna.

Queste osservazioni sono comunque meramente qualitative. In termini quantitativi, sia la capacità dinamica di adsorbimento che il recupero in fase di eluizione non dipendono dal numero di membrane considerato; eventuali differenze sono da imputare ad errori di tipo sperimentale poiché confinate ben sotto la soglia del 10%. Questa verifica non è del tutto banale. Difatti, se da un lato la capacità e la resa sono proprietà intensive del supporto, dall'altro la fluidodinamica all'interno del modulo dipende sicuramente dal volume della colonna cromatografica. Ciò potrebbe comportare una insufficiente utilizzazione delle membrane, per cui la stima delle caratteristiche del supporto sarebbe solo una media su tutto il volume considerato e non il valore reale.

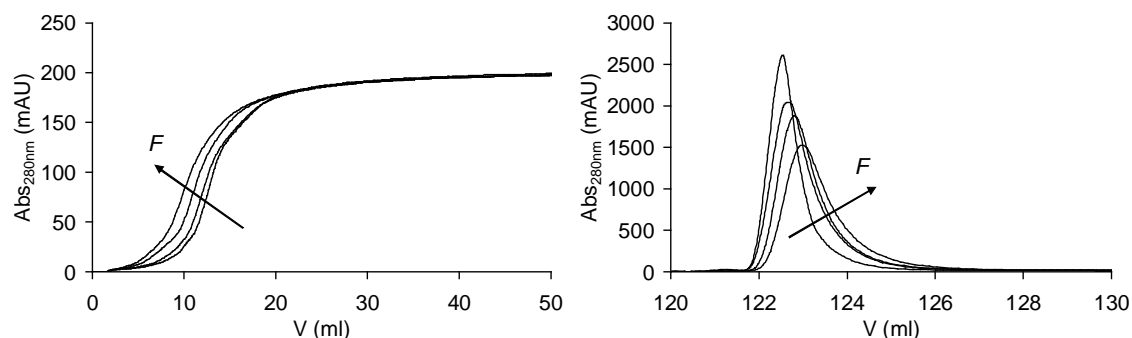


Figura 3.34: Curve di adsorbimento (a sinistra) e di eluizione (a destra) per le prove eseguite con 10 membrane sovrapposte ad una concentrazione di IgG pari a 0.70 mg/ml alle portate di 1, 2, 5 e 10 ml/min.

Nelle prove eseguite è stato notato un leggero calo della capacità dinamica con la portata, effetto più pronunciato alle basse concentrazioni di IgG. Come infatti si può notare in Figura 3.34, la curva di breakthrough anticipa leggermente all'aumentare della portata, con una conseguente diminuzione della capacità dinamica. La spiegazione è da ricercare in un effetto combinato dei fenomeni cinetici e convettivi, entrambi con un contributo non trascurabile alla globalità del processo di adsorbimento. Comunque, per variazioni della portata di un ordine di grandezza (tra 1 e 10 ml/min), la diminuzione di capacità è sempre minore del 21%, calo molto più modesto rispetto quanto riscontrato nelle resine convenzionali, dove la perdita di capacità dinamica si aggira intorno al 50% [13] ed in alcuni casi può addirittura arrivare all'81% [14].

L'effetto della portata sulla curva di eluizione è molto simile a quello già riscontrato per gli altri sistemi studiati, con un picco che si abbassa e si allarga man mano che la portata aumenta (Figura 3.34) [9]. Inoltre, per questa serie di prove le aree sottese dal picco di eluizione calano con l'aumentare della portata: com'è ovvio, la proteina eluita dipende dalla quantità precedentemente adsorbita. Ad ogni modo, per escludere eventuali effetti della portata sulla quantità di proteina eluita, è stata condotta una nuova serie di esperimenti. Le prove consistono in 7 cicli cromatografici consecutivi a fissate condizioni operative nelle fasi di adsorbimento e di lavaggio ( $c_0 = 0.92$  mg/ml,  $F = 10$  ml/min), ed a portata variabile nella fase di eluizione ( $F = 0.5, 1, 2, 5, 7.5, 10, 15$  ml/min). Come previsto, la quantità di proteina adsorbita è indipendente dal ciclo eseguito (errore relativo 1.02%), come anche la quantità successivamente eluita (errore relativo 1.91%). Dunque si può affermare che gli effetti della portata sulla quantità di proteina recuperata e la resa in eluizione sono indipendenti dalle condizioni operative.

In Figura 3.35 è riportata la massa di proteina eluita in funzione di quella precedentemente adsorbita per i cicli cromatografici eseguiti con 5 e 10 membrane. La maggior parte dei punti sperimentali si sovrappongono alla bisettrice,



indicando un recupero pressoché completo. Una media su tutti i cicli eseguiti restituisce una resa pari al 96%.

I dati sperimentali di capacità dinamica sono stati descritti secondo l'isoterma di Langmuir (Figura 3.36). Il risultato dell'interpolazione fornisce una stima della capacità massima di adsorbimento pari a 9.93 mg/ml ed una costante di dissociazione di Langmuir di 0.025 mg/ml.

Le caratteristiche delle SartoAIMs Protein A possono essere meglio apprezzate se si esegue un confronto con le analoghe membrane commerciali Sartobind Protein A. Entrambi i sistemi usano la proteina A come ligando, ma per le ultime la matrice è costituita dalle Sartobind Epoxy.

In Figura 3.37 è riportato un confronto di due cicli cromatografici completi eseguiti sui due supporti alle stesse condizioni operative. Il fatto che la curva di breakthrough relativa alle nuove membrane sia posticipata rispetto quella per le Sartobind Protein A, dimostra che le membrane SartoAIMs Protein A hanno più alta capacità dinamica. Questa conclusione è evidente anche dall'area sottesa dai due picchi di eluizione, che per le SartoAIMs Protein A risulta molto maggiore. In particolare, la resa di eluizione per le membrane Sartobind ProteinA è di circa il 59%, mentre la resa stimata per le SartoAIMs ProteinA è del 96%. Infine, la capacità massima delle membrane Sartobind Protein A è di circa 1.58 mg/ml, mentre la costante di dissociazione di Langmuir è pari a 0.267 mg/ml. Le nuove membrane SartoAIMs Protein A non solo hanno una capacità più di sei volte superiore, ma anche affinità per l'IgG più alta.

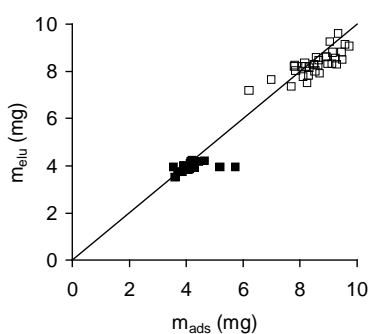


Figura 3.35: Quantità di IgG eluita in funzione della massa precedentemente adsorbita per gli esperimenti condotti con 10 membrane (◆) e con 5 membrane (■).

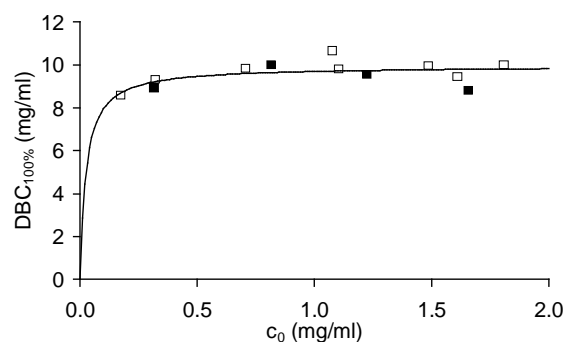


Figura 3.36: Capacità dinamica in funzione della concentrazione di IgG nell'alimentazione per gli esperimenti condotti con 10 membrane (◆) e con 5 membrane (■). I dati sono stati approssimati secondo l'isoterma di Langmuir (linea continua).

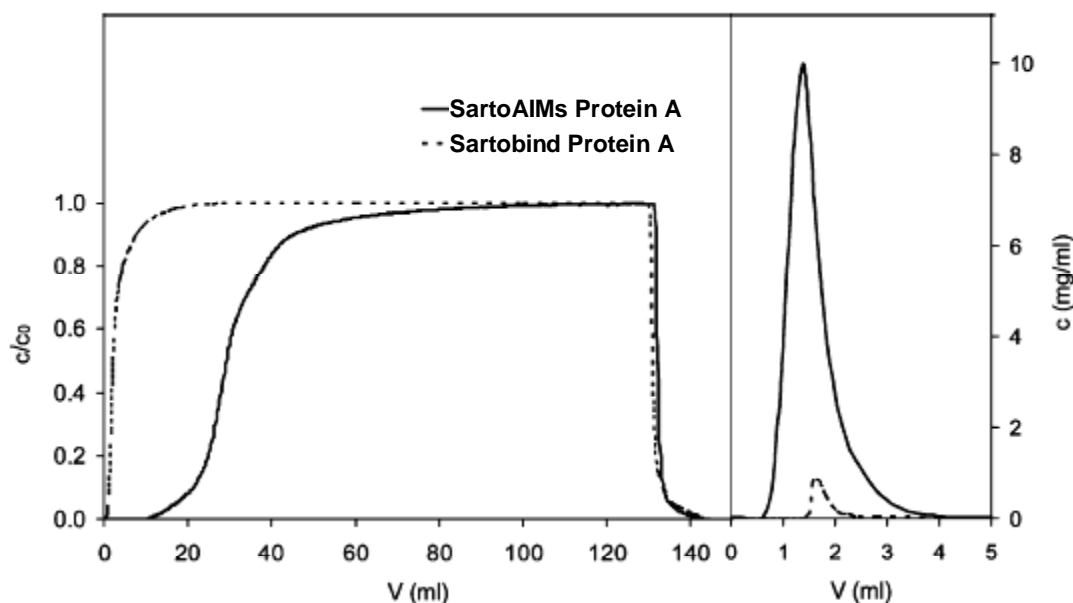


Figura 3.37: Confronto di due cicli cromatografici eseguiti sulle membrane SartoAIMs ProteinA e Sartobind Protein A alle stesse condizioni operative:  $c_0 = 0.30$  mg/ml,  $F = 1$  ml/min, 10 membrane sovrapposte.

### 3.4.1.2 Risultati delle prove con surnatante industriale

Le considerazioni fatte nel precedente paragrafo indicano che le SartoAIMs Protein A sono membrane caratterizzate da ottime prestazioni; infatti l'alta capacità dinamica e la bassa costante di dissociazione le rendono un supporto ideale per la separazione e la purificazione delle IgG. Tuttavia, risulta indispensabile verificare questa possibilità con soluzioni complesse come il surnatante industriale.

Le prove con miscela complessa sono state eseguite alle portate di 1, 2 e 5 ml/min con 5 membrane anziché 10 per evitare l'eccessivo spreco di surnatante; la fase di rigenerazione è stata eseguita alla fine di ogni ciclo cromatografico. La concentrazione di IgG nella miscela è pari a 0.12 mg/ml. Maggiori dettagli sulle fasi cromatografiche sono riportati in Tabella 3.17.

Tabella 3.17: Tamponi usati e volume alimentato nelle fasi cromatografiche per gli esperimenti condotti con il surnatante industriale.

Fase cromatografica	Tampone	$V_{alim}$ (ml)
Equilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20
Adsorbimento	surnatante industriale	100
Lavaggio	PBS 0.1 M pH 7.4	50
Eluizione	glicina 0.1 M pH 2.8	10
Rigenerazione	NaCl 1 M, NaOH 50 mM	20
Riequilibratura	PBS 0.1 M pH 7.4	20

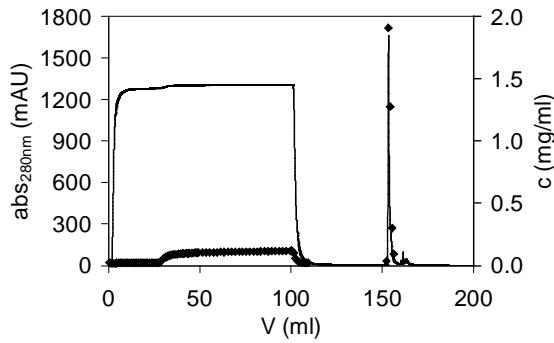


Figura 3.38: Profili in termini di assorbimento (linea continua) e di concentrazione di IgG (◆) per il ciclo condotto con surnatante industriale alla portata di 1 ml/min.

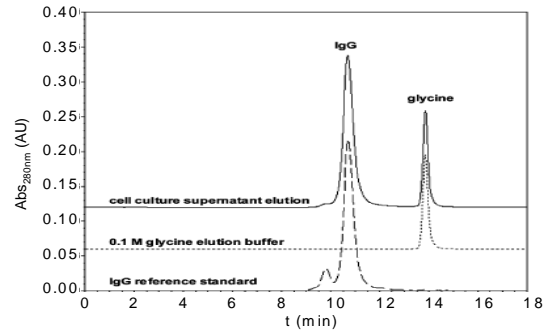


Figura 3.39: Risultati dell'analisi all'HPLC con colonna ad esclusione di forma di una frazione di eluizione (linea continua). Per confronto sono riportate anche le analisi di una soluzione di IgG (linea punteggiata) e del tampone di eluizione (linea tratteggiata).

In Figura 3.38 è riportato il confronto tra i profili in termini di assorbimento e di concentrazione di IgG per uno degli esperimenti condotti con surnatante industriale. È interessante notare come la curva di breakthrough per l'IgG sia visibilmente posticipata rispetto al profilo UV.

In media la capacità dinamica è pari a 8.32 mg/ml, valore coerente con la capacità calcolata dall'isoterma di Langmuir alla concentrazione di IgG nel surnatante (8.14 mg/ml). Si può quindi assumere che i ligandi immobilizzati sulla matrice non interagiscano con i contaminanti presenti in soluzione, e che la capacità della membrana resti invariata quando si alimentano soluzioni complesse. Usando altri termini, si può dire che le membrane SartoAIMs Protein A sono altamente selettive nei confronti dell'IgG.

Quest'affermazione trova riscontro anche in Figura 3.39, in cui un'analisi condotta all'HPLC con colonna ad esclusione di forma su una frazione di eluizione rivela solo la presenza di IgG. Infatti il secondo picco che si osserva ad un tempo di ritenzione di circa 13.8 minuti è relativo al tampone di eluizione e non ad una specie inquinante.

Un'ulteriore conferma è data dal risultato del gel di elettroforesi riportato in Figura 3.40. Si può notare che non solo le frazioni di eluizione analizzate mostrano solo la presenza di IgG, ma che la sua concentrazione nelle frazioni centrali del picco (corsie 4, 5 e 6) è addirittura superiore rispetto alla concentrazione di IgG nell'alimentazione (corsie 2 e 3).

Le membrane SartoAIMs Protein A non solo hanno ottime caratteristiche in termini di capacità e affinità nei confronti dell'IgG, ma sono anche altamente selettive. Queste membrane rappresentano un ottimo supporto per la separazione di IgG da miscele complesse.

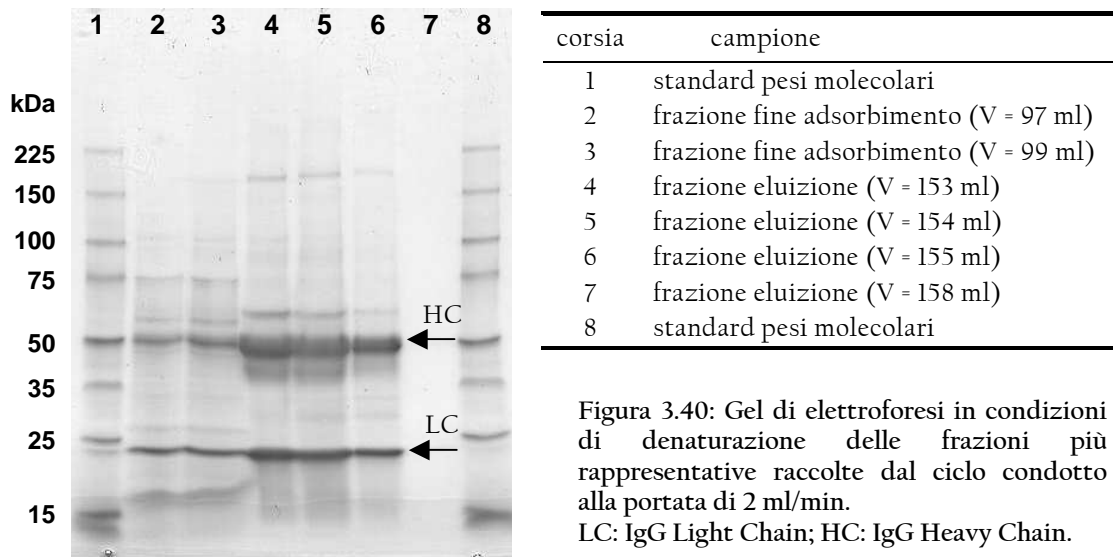


Figura 3.40: Gel di elettroforesi in condizioni di denaturazione delle frazioni più rappresentative raccolte dal ciclo condotto alla portata di 2 ml/min. LC: IgG Light Chain; HC: IgG Heavy Chain.

### 3.4.2 Esperimenti con modulo analitico

I risultati molto promettenti hanno spinto il produttore delle membrane alla realizzazione di moduli cromatografici per applicazioni su scala analitica, in modo da offrire un'alternativa alle classiche colonne cromatografiche Proteina A usate per la quantificazione dell'IgG. I moduli sono costituiti da 15 membrane sovrapposte del diametro di circa 7 mm, per un volume totale di 0.1 ml. Un apposito contenitore è stato realizzato per l'alloggiamento del modulo e la connessione all'impianto (Figura 3.41).

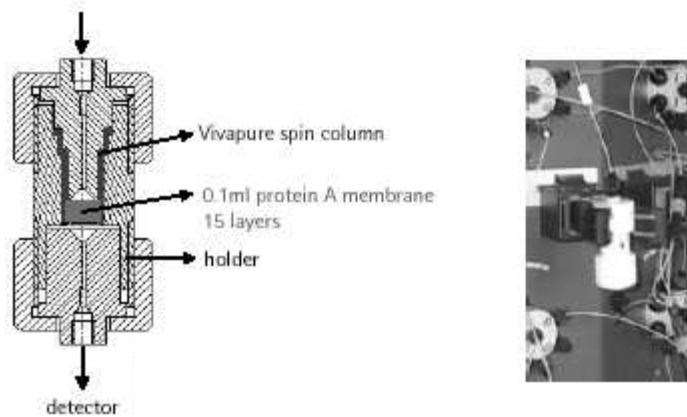


Figura 3.41: Modulo per applicazioni analitiche, relativo contenitore e sua connessione all'impianto.

Allo scopo di verificare la riproducibilità dei risultati descritti nei paragrafi precedenti, il modulo per applicazioni analitiche è stato considerato per una caratterizzazione dinamica al variare della concentrazione di IgG e della portata. Le prove sono state eseguite secondo il procedimento già descritto in Tabella 3.15; quattro le concentrazioni esaminate, 0.27, 0.54, 1.07 ed 1.54 mg/ml, mentre le

portate considerate sono di 1, 2 e 4 ml/min, corrispondenti ad una velocità superficiale di 167, 333 e 667 cm/h.

In Figura 3.42 è mostrata la quantità di proteina adsorbita sul modulo al variare della portata per due delle concentrazioni considerate. Al contrario degli esperimenti condotti con il modulo di scala di laboratorio, si osserva una forte dispersione dei dati, e non si riesce a stabilire se esiste una dipendenza della capacità dinamica con la portata. L'origine della scarsa affidabilità dei risultati ottenuti deve essere ricercata nel set-up del sistema sperimentale. Difatti il volume dei vuoti delle membrane nella colonna è di circa 50  $\mu$ l, mentre i volumi del sistema cromatografico sono più di un ordine di grandezza più grandi, circa 800  $\mu$ l. Piccole imprecisioni nella stima del volume morto del sistema comportano di conseguenza grandi errori nella valutazione della quantità di proteina adsorbita.

Tuttavia, una media della capacità dinamica alle diverse portate fornisce un valore più affidabile. In Figura 3.43 è riportato un confronto tra i valori medi di capacità dinamica e l'isoterma di Langmuir determinata attraverso gli esperimenti eseguiti con il modulo di scala di laboratorio, isoterma già presentata in Figura 3.36. Si nota un ottimo accordo tra i dati sperimentali ottenuti con i due moduli, in cui l'errore massimo è del 10%. Si può quindi affermare che l'utilizzazione delle membrane SartoAIMs Protein A è ottimizzata sia nel modulo di laboratorio che nel modulo per applicazioni analitiche. Questa verifica è necessaria per provare che le prestazioni delle membrane siano sempre pienamente sfruttate, a prescindere dal modulo usato.

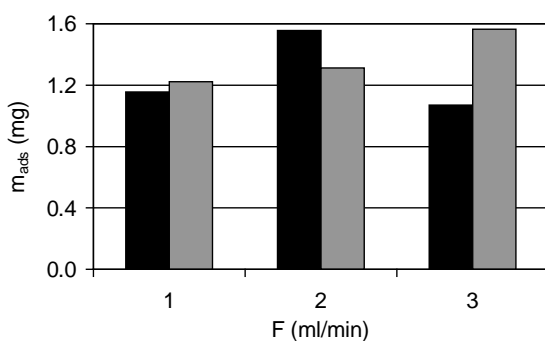


Figura 3.42: Quantità di IgG adsorbita per gli esperimenti eseguiti ad una concentrazione di IgG nell'alimentazione di 0.27 mg/ml (■) e 1.07 mg/ml (▨) alle diverse portate studiate.

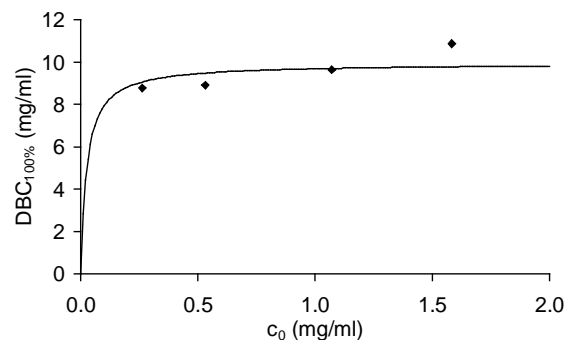


Figura 3.43: Capacità dinamica in funzione della concentrazione di IgG nell'alimentazione per gli esperimenti condotti con il modulo di scala analitica (◆). I dati sono confrontati con l'isoterma di Langmuir determinata dagli esperimenti condotti con il modulo di scala di laboratorio (linea continua, come da Figura 3.36).

### 3.4.3 Esperimenti con il modulo pilota

Durante il progetto europeo AIMs, in collaborazione con la Bayer Technology Services è stato realizzato il set-up di un impianto cromatografico per la sperimentazione di un modulo di scala pilota (Figura 3.44). Il modulo, progettato da Sartorius, rientra nella classe dei moduli a flusso radiale (si veda Figura 4.2c) in cui 20 membrane tra loro sovrapposte sono avvolte su un apposito cuore cilindrico. Il volume totale delle membrane è di 34 ml.

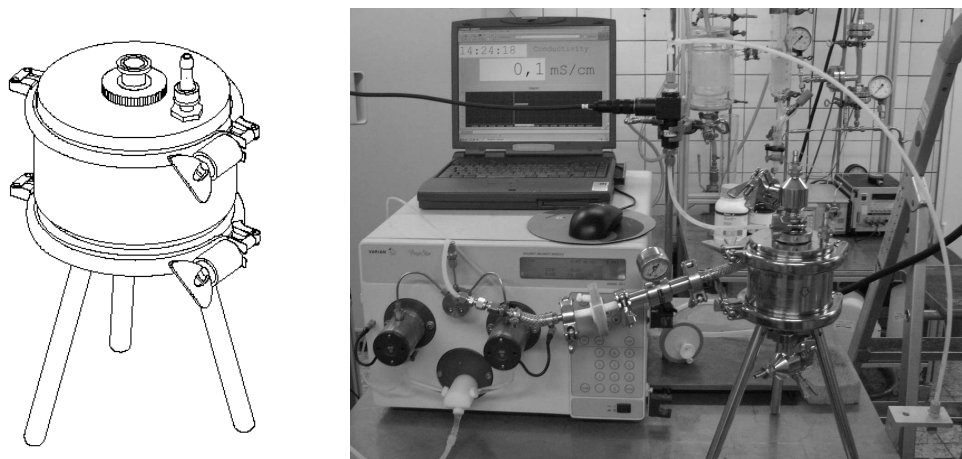


Figura 3.44: Rappresentazione del modulo pilota e fotografia del impianto realizzato per eseguire le prove sperimentali.

L'impianto è composto da una pompa peristaltica per applicazioni industriali necessaria per la movimentazione dei tamponi nel sistema. A monte del modulo pilota è posto un prefiltro con dimensione dei pori di  $1\ \mu\text{m}$  (Sartoclear, Sartorius Stedim Biotech), mentre in uscita dal modulo un conduttimetro registra il segnale di conducibilità elettrica. Non è stato possibile inserire anche un rivelatore UV a causa delle alte portate utilizzate in queste prove.

In tutti gli esperimenti condotti su questo impianto è stata alimentata una miscela composta da un surnatante industriale e Gammanorm in proporzione tale da avere concentrazione totale di IgG pari a  $0.35\ \text{mg/ml}$ ; le portate considerate sono quattro, pari a 4, 8, 12 e  $18\ \text{l/h}$ , rispettivamente corrispondenti ad una velocità lineare di 62.5, 125, 192 e  $288\ \text{cm/h}$ . Le prove sono state ripetute in doppio per ogni condizione operativa studiata.

Le fasi di equilibratura e lavaggio sono state eseguite con PBS  $0.1\ \text{M}$  pH 7.4, mentre l'eluizione con una soluzione di glicina  $0.1\ \text{M}$  pH 2.8. Il passaggio da una fase cromatografica alla successiva è stato eseguito manualmente, per cui la loro durata è variabile da una prova all'altra.

L'assenza di un rivelatore UV non ha permesso di registrare il segnale di assorbanza della soluzione in uscita. Per determinare degli attendibili profili di

concentrazione, la soluzione in uscita dal sistema è stata raccolta in frazioni che sono state analizzate all'HPLC. La miscela è stata schematizzata come una soluzione composta da IgG e da un unico contaminante. Il profilo della concentrazione di IgG è stato determinato tramite analisi all'HPLC con colonna Proteina A, mentre la concentrazione di contaminante è stata stimata tramite integrazione dei cromatogrammi ottenuti con colonna ad esclusione di forma.

A titolo di esempio, in Figura 3.45 sono riportati i profili di concentrazione dell'IgG e del contaminante in termini adimensionali. Si osserva che la curva di breakthrough per l'IgG è visibilmente ritardata rispetto quella del contaminante, indice dell'effettivo adsorbimento dell'IgG sulle membrane.

La capacità di adsorbimento per i cicli eseguiti è riportato in Figura 3.46 insieme ai dati di recupero nella fase di eluizione. La capacità dinamica è praticamente costante con il susseguirsi degli esperimenti, nonostante non venga eseguita la fase di rigenerazione tra un ciclo ed il successivo. La capacità di adsorbimento media è di 4.73 mg/ml, un valore piuttosto basso rispetto alla capacità teorica di 9.27 mg/ml stimata dall'isoterma di Langmuir alla concentrazione di 0.35 mg/ml. Nel § 3.4.1.2 è stata elogiata l'eccellente selettività delle membrane SartoAIMs Protein A, quindi è da escludere che la bassa capacità di legame sia dovuta ad interazioni non specifiche tra le impurità presenti nella miscela e la proteina A immobilizzata sul supporto. Piuttosto, questo problema potrebbe essere legato alla non efficiente progettazione del modulo a flusso radiale. Il modulo presenta infatti dei grossi volumi morti al suo interno, in cui fenomeni di miscelamento potrebbero non garantire un completo sfruttamento delle membrane.

Il recupero in eluizione è mediamente del 90%; anche questa caratteristica è indipendente dal ciclo considerato. Quest'osservazione conferma il fatto che i contaminanti non interagiscono con il supporto.

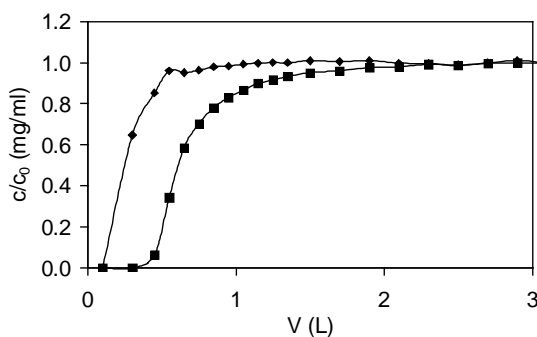


Figura 3.45: Curve di adsorbimento relative all'IgG (■) ed al contaminante (◆) per la prova condotta ad una portata di 12 l/h. Profili normalizzati ad 1.

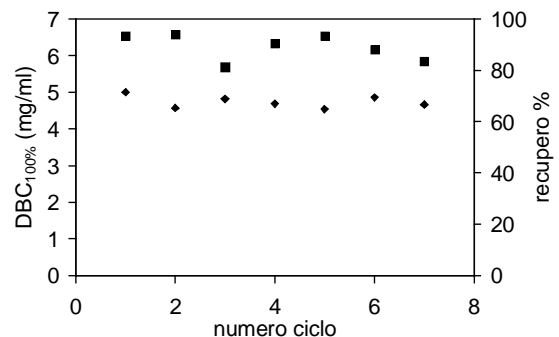


Figura 3.46: Capacità dinamica (◆) e recupero in eluizione (■) per i cicli eseguiti con il modulo pilota.

Il modulo pilota studiato in questa sede non è capace di sfruttare pienamente le potenzialità delle membrane SartoAIMs Protein A. Dovrebbe essere indirizzata una maggiore attenzione per un'efficace progettazione del modulo allo scopo di limitare i problemi legati alle miscele nei volumi morti al suo interno.

### 3.5 Confronto tra le membrane studiate

Tra tutti i sistemi sperimentali studiati, le membrane più promettenti sono quelle che supportano il ligando sintetico B14 e il ligando naturale proteina A. In Tabella 3.18 sono riassunte le proprietà determinate dagli esperimenti dinamici eseguiti con soluzioni pure di IgG e con il surnatante industriale.

Tabella 3.18: Tabella riassuntiva delle caratteristiche principali associate alle membrane più promettenti.

Membrana	Soluzioni pure di IgG			Surnatante Industriale	
	$DBC_{max}$ (mg/ml)	$K_d$ (mg/ml)	Recupero (%)	$DBC_{100\%}^a$ (mg/ml)	Recupero (%)
B14-TA-Sartoepoxy	2.27	0.041	93	0.74	≈100
B14-TA-Epoxy2	3.17	0.037	95	1.21	≈100
SartoAIMs Protein A	9.93	0.025	96	8.32	≈100

<sup>a</sup> per una concentrazione di IgG nel surnatante industriale di 0.12 mg/ml.

Le membrane osservate presentano valori simili della costante di dissociazione di Langmuir. Nonostante il ligando B14 sia un prodotto di sintesi ha un'elevata affinità per l'IgG, confrontabile con quella della proteina A.

Il recupero di proteina durante l'eluizione è prossimo al 100%, sia negli esperimenti condotti con soluzioni pure di IgG che nel caso di surnatante industriale. È quindi lecito affermare che tali supporti consentono di recuperare tutta la proteina legata durante la fase di adsorbimento.

La principale differenza si osserva nella capacità dinamica. Quando si considerano esperimenti condotti con soluzioni pure di IgG, le membrane SartoAIMs Protein A esibiscono una capacità di legame da tre a quattro volte maggiore rispetto alle membrane con ligando B14; per gli esperimenti eseguiti con il surnatante industriale questo distacco sale, e le membrane con il ligando naturale mostrano una capacità da sette a undici volte maggiore rispetto alle altre due membrane considerate.

Per approfondire queste osservazioni è utile considerare i parametri strutturali delle membrane, come l'area superficiale e la densità di ligando immobilizzata; per comodità queste caratteristiche sono riassunte in Tabella 3.19.



Tabella 3.19: Area superficiale e densità di ligando delle membrane più promettenti.

Membrana	$A_S$ (m <sup>2</sup> /ml)	$\rho_l$ (μmol/ml)
B14-TA-Sartoepoxy	0.93	0.033 <sup>a</sup>
B14-TA-Epoxy2	2.37	0.016 <sup>a</sup>
SartoAIMs Protein A	1.47	0.048

a) media dei valori di densità di ligando per i due lotti ricevuti.

In Figura 3.47 è riportata la capacità dinamica massima per soluzioni di IgG pura,  $DBC_{max}$ , in funzione della densità di ligando,  $\rho_l$ . Per le membrane SartoAIMs ProteinA e B14-TA-Epoxy2 si osserva un aumento della capacità dinamica proporzionale alla densità di ligando. Questo andamento non è seguito dalle membrane B14-TA-Sartoepoxy, con una capacità dinamica più bassa rispetto al ligando immobilizzato sul supporto.

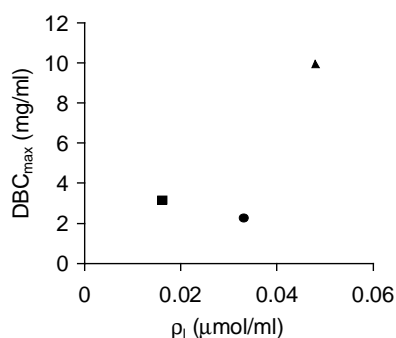


Figura 3.47: Capacità dinamica massima per soluzioni di IgG pura,  $DBC_{max}$ , in funzione della densità di ligando,  $\rho_l$ , per le membrane B14-TA-Sartoepoxy (●), B14-TA-Epoxy2 (■) e SartoAIMs ProteinA (▲).

Per comprendere meglio questo aspetto, risulta conveniente introdurre due interessanti parametri: la densità superficiale di ligando,  $\rho_{l,s}$  definita come il rapporto tra la densità di ligando e l'area superficiale, e l'utilizzazione di ligando,  $\chi$ , definita come il rapporto tra la capacità massima e la densità di ligando. In formule:

$$\rho_{l,s} = \frac{\rho_l}{A_S} \quad 3.1$$

$$\chi = \frac{DBC_{max}}{\rho_l} \quad 3.2$$

La densità superficiale di ligando esprime il grado di funzionalizzazione della superficie interna, mentre l'utilizzazione di ligando è un termine che dà

un'indicazione dello sfruttamento dei ligandi immobilizzati. In Tabella 3.20 sono riportate queste due grandezze per le membrane considerate.

Tabella 3.20: Densità superficiale di ligando e utilizzazione di ligando delle membrane più promettenti.

Membrana	$\rho_{l,s}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	$\chi$ ( $\text{mg}/\mu\text{mol}$ )
B14-TA-Sartoepoxy	$35.5 \cdot 10^{-3}$	69
B14-TA-Epoxy2	$6.8 \cdot 10^{-3}$	198
SartoAIMs Protein A	$32.7 \cdot 10^{-3}$	207

Si osserva che l'utilizzazione di ligando per le membrane B14-TA-Sartoepoxy è decisamente inferiore rispetto alle altre membrane, indice che la morfologia delle membrane Sartoepoxy è tale che non tutto il ligando immobilizzato è disponibile per formare un legame con l'IgG. Invece le membrane SartoAIMs ProteinA e B14-TA-Epoxy2 hanno simile utilizzazione di ligando, a dimostrazione che le corrispondenti matrici Epoxy1 ed Epoxy2 consentono una maggiore accessibilità dell'IgG per interagire con i siti di legame.

Molto interessanti i dati di densità superficiale di ligando. Per le membrane B14-TA-Epoxy2, questo parametro è ben cinque volte più basso che per le altre due membrane di affinità. Questo confronto dimostra che è teoricamente possibile incrementare la densità di ligando superficiale delle B14-TA-Epoxy2, con un conseguente aumento della capacità dinamica. Uno studio approfondito del protocollo di funzionalizzazione potrebbe comportare un'ulteriore ottimizzazione delle prestazioni delle B14-TA-Epoxy2; è dunque possibile che in futuro queste membrane diventino competitive rispetto le SartoAIMs ProteinA.

Bisogna inoltre ricordare che il ligando sintetico B14 è meno costoso rispetto la proteina A. Fattori come la durata delle fasi cromatografiche, i costi per l'acquisto dei consumabili, la vita utile delle membrane di affinità ecc. potrebbero porre le basi per uno studio economico atto alla determinazione del sistema cromatografico con maggiore produttività.

## Bibliografia

1. Etzel, M. R., *Layered Stacks*, in: Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z., *Monolithic Materials*, Journal of Chromatography Library, 2003, 67, 213–233.
2. Boi, C., Sarti, G. C., *Development and characterization of affinity membranes for immunoglobulin purification*, Separation Science and Technology, 2007, 42, 2987–3001.

3. Bruschi, M., *Sviluppo di membrane di affinità per la purificazione di anticorpi monoclonali*, 2007, Tesi di laurea, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.
4. Zamolo, L., Busini, V., Moiani, D., Moscatelli, D., Cavallotti, C., *Molecular dynamic investigation of the interaction of supported affinity ligands with monoclonal antibodies*, *Biotechnology Progress*, 2008, 24, 527–539.
5. Boi, C., Dimartino, S., Van Beijeren, P., Sarti, G. C., *Evaluation of affinity membrane adsorbers for antibody purification*, AICHE Annual Meeting and Fall Showcase Conference Proceedings on CD. AICHE Annual Meeting 2006. San Francisco, California. 12-17 Novembre 2006.
6. Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G. C., *Modelling and simulation of affinity membrane adsorption*, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1162, 24–33.
7. Dancette, O. P., Taboureau, J. L., Tournier, E., Charcosset, C., Blond, P., *Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography*, *Journal of Chromatography B*, 1999, 723, 61–68.
8. Castilho, L. R., Anspach, F. B., Deckwer, W. D., *Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins*, *Journal of Membrane Science*, 2002, 207, 253–264.
9. Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G. C., *Performance of a New Protein A Affinity Membrane for the Primary Recovery of Antibodies*, *Biotechnology Progress*, 2008, 24, 640–647.
10. Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., Low, D., *Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches*, *Journal of Chromatography B*, 2007, 848, 28–39.
11. Low, D., O’Leary, R., Pujar, N. S., *Future of antibody purification*, *Journal of Chromatography B*, 2007, 848, 48–63.
12. Dimartino, S., Boi, C., Sarti, G. C., *Dynamic characterization of affinity membranes for monoclonal antibodies purification*. AICHE Annual Meeting and Fall Showcase Conference Proceedings on CD. AICHE Annual Meeting 2007. Salt Lake City, Utah, 4-9 Novembre 2007.
13. Swinnen, K., Krul, A., Van Goidsenhoven, I., Van Tichelt, N., Roosen, A., Van Houdt, K., *Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies*, *Journal of Chromatography B*, 2007, 848, 97–107.

14. Hahn, R., Schlegel, R., Jungbauer, A., *Comparison of protein A affinity sorbents*, Journal of Chromatography B, 2003, 790, 35-51.

---

# CAPITOLO 4

---

## PROGETTAZIONE, REALIZZAZIONE E VERIFICA DI UN MODULO PER MEMBRANE

### Introduzione

Il principale vantaggio della cromatografia con membrane è la predominanza del trasporto di materia per convezione, grazie al quale il processo di separazione è più rapido. Affinché questo beneficio venga sfruttato al massimo è importante che il flusso sia ben distribuito nelle membrane contenute nel modulo e che siano assenti zone inutilizzate nella colonna.

Nei moduli esistenti sono state spesso riscontrate delle mal distribuzioni nel flusso di soluto, con una conseguente caduta delle prestazioni dell'impianto cromatografico. Per ovviare a questo inconveniente è imperativa una progettazione razionale ed efficace del modulo contenente le membrane [1].

Per un corretto utilizzo dell'area attiva delle membrane, l'alimentazione in ingresso dovrebbe toccare tutti i punti della superficie della prima membrana nello stesso istante e scorrere uniformemente all'interno del mezzo poroso. Inoltre, la soluzione in uscita dall'ultima membrana dovrebbe essere raccolta omogeneamente. Tali richieste possono essere facilmente soddisfatte quando il diametro del modulo è piccolo rispetto alla sua lunghezza (Figura 4.1a) [2]. In campo analitico, ad esempio, le colonne cromatografiche riempite con resine porose soddisfano questa condizione, con un rapporto tra diametro ed altezza che normalmente è circa 1:10 [3]. Viceversa, i moduli per membrane presentano una sezione trasversale molto maggiore rispetto l'altezza e, dunque, in corrispondenza

dell'ingresso e dell'uscita si ha un improvviso aumento dell'area frontale (Figura 4.1b). Queste rappresentano delle zone critiche alle quali è possibile imputare la maggior parte delle inefficienze delle attuali colonne cromatografiche [4].

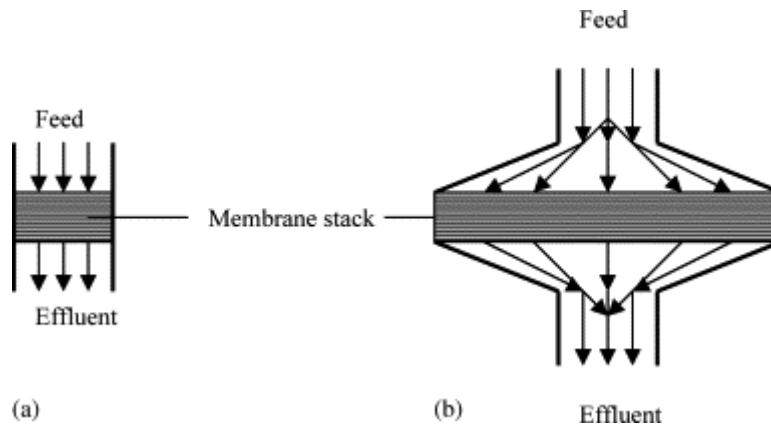


Figura 4.1: Esempi della distribuzione dell'alimentazione e raccolta della soluzione in uscita in moduli con membrane piane.

Un altro serio problema, poco trattato in letteratura, è dovuto ad effetti di bypass dovuti ad una inefficiente tenuta tra il bordo delle membrane e la parete del modulo. La presenza di un seppur minimo spazio non occupato dalle membrane costituisce un percorso preferenziale per la soluzione che attraversa le membrane. Ne consegue una scarsa utilizzazione delle membrane, ed in alcuni casi estremi le membrane potrebbero essere escluse dal flusso della soluzione.

Dopo una breve introduzione sulle configurazioni dei moduli per membrane esistenti, in questo capitolo sarà descritto il modulo scelto come riferimento per la progettazione di un nuovo modulo per membrane. Quest'ultimo modulo è stato attentamente studiato in prove dinamiche al fine di determinare la configurazione ottimale per garantire un corretto sfruttamento delle membrane inserite al suo interno. Saranno infine presentati i risultati in cui il nuovo modulo dimostra di avere una maggior efficienza di separazione rispetto al modulo di riferimento.

Per evitare confusione tra i due moduli questi saranno denotati nel testo con le sigle ModA e ModB per indicare rispettivamente il modulo di riferimento e il nuovo modulo.

## 4.1 Moduli cromatografici con membrane

Tre principali tipi di moduli con membrane sono usati per processi di bioseparazione: membrane piane, fibre cave ed a flusso radiale. In Figura 4.2 sono schematizzati i regimi di flusso per i tre moduli descritti [5, 6].

Singole membrane piane sono usate raramente; spesso si opera con diverse membrane sovrapposte tra loro. Nei moduli a membrane piane l'alimentazione è

introdotta in direzione ortogonale alla superficie delle membrane stesse; il flusso convettivo trasporta i soluti attraverso i pori che si assume siano disposti con direzione principale perpendicolare rispetto alla sezione trasversale. Di conseguenza il flusso globale avviene in direzione normale (Figura 4.2a). A causa della tortuosità dei pori, le considerazioni fatte sul flusso globale non sono necessariamente valide sul flusso locale. Nelle condizioni operative solitamente adoperate il regime di flusso è di tipo laminare. Questo tipo di modulo è attualmente il più usato, in particolare su scala di laboratorio.

Il modulo a fibre cave consiste in un insieme di diverse centinaia di fibre disposte con configurazione del tutto simile a quella di uno scambiatore di calore a fascio tubiero. Le membrane all'interno del modulo hanno geometria cilindrica con diametro della fibra che varia da 0,25 a 2,5 mm. L'alimentazione inizialmente fluisce parallelamente alla superficie della membrana, ma gradualmente passa attraverso i pori spinta dalla differenza di pressione (Figura 4.2b). Il principale vantaggio legato all'uso di fibre cave è l'alto rapporto tra la superficie e il volume della membrana. Nonostante sia molto diffuso in tecnologie come la microfiltrazione, l'ultrafiltrazione e la dialisi, il modulo a fibre cave è poco impiegato in ambito cromatografico.

Infine, i moduli con flusso radiale sono preparati avvolgendo una membrana piana su un'anima porosa. Il modulo con flusso radiale è preferibilmente usato in applicazioni industriali.

Il sistema studiato in questo lavoro di tesi è relativo ad un modulo con membrane piane sovrapposte, quindi in seguito si farà sempre riferimento a questo tipo di sistema, tranne quando espressamente specificato.

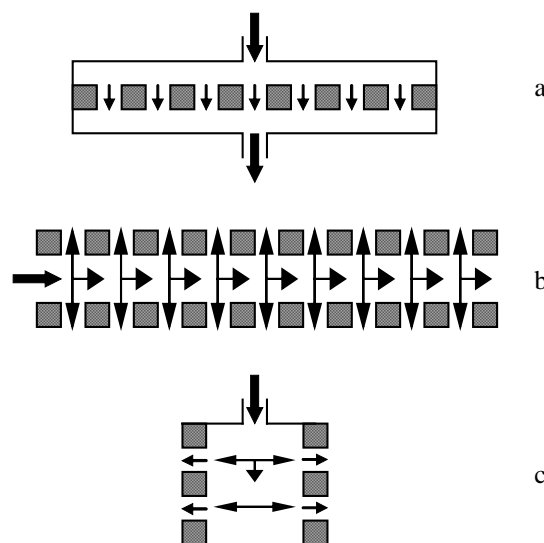


Figura 4.2: Regimi di flusso nel caso di: (a) membrane piane; (b) fibre cave; (c) modulo con flusso radiale.

## 4.2 Modulo di riferimento: ModA

Il modulo a membrane piane con cui sono state eseguite la maggior parte delle prove sperimentali di questo lavoro di tesi è mostrato in Figura 4.3.



Figura 4.3: Fotografia del ModA.

Il modulo consiste in una femmina in cui vengono inserite le membrane, ed in un maschio necessario per mantenere le membrane nella loro sede. Le due parti presentano un'opportuna zigrinatura per favorire la chiusura a mano del modulo che è perfezionata grazie ad una filettatura. Nelle superfici a contatto con le membrane sono realizzati dei profili con solchi concentrici e radiali per favorire la distribuzione del fluido in ingresso e la raccolta della soluzione in uscita (Figura 4.4).

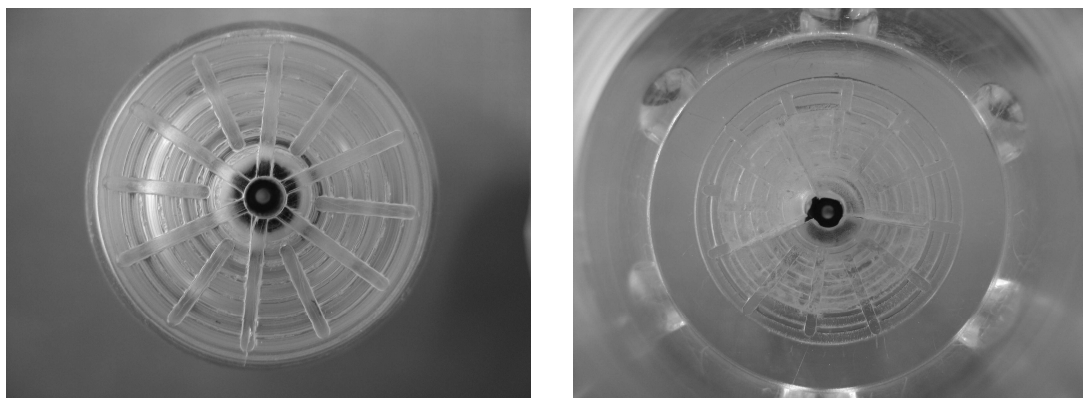


Figura 4.4: Particolare del profilo del distributore nel ModA nel maschio (a sinistra) e nella femmina (a destra).

La gola della femmina è profonda circa 22 mm con diametro di circa 25 mm. Per 12 mm la gola è occupata dalla filettatura, quindi possono essere sovrapposte membrane fino ad uno spessore complessivo massimo di 10 mm. La tenuta tra maschio e femmina è garantita da un'apposita guarnizione inserita nello smusso del maschio.



## **4.3 Nuovo modulo: ModB**

Il nuovo modulo per membrane è stato ideato prendendo spunto dal ModA. Dopo una valutazione di diversi materiali si è scelto di realizzare il nuovo modulo in acciaio inox per due motivi principali:

- garantire una resistenza meccanica a pressioni maggiori rispetto quelle tollerate da una materia plastica. In questo modo si possono eseguire prove cromatografiche a portate elevate e con un numero maggiore di membrane sovrapposte;
- basso adsorbimento di tipo non specifico tra le biomolecole ed il materiale. Per un corretto bilancio di materia infatti è necessario evitare errori nel quantificare la massa di proteina adsorbita sulle membrane eliminando la possibilità di adsorbimento sulle pareti del modulo.

### **4.3.1 Fase di progettazione**

La progettazione è stata eseguita in collaborazione con il tacchificio Monti di Marzabotto (BO), esperti nella lavorazione dell'acciaio inox, con il supporto tecnico dell'AZ Studio, studio di progettazione meccanica con sede a Borgonuovo di Sasso Marconi (BO).

Il progetto ha preso come riferimento il ModA esistente, in particolare per il disegno del distributore. In Figura 4.5 sono riportati i disegni delle due parti del ModB.

Come per il ModA, l'accoppiamento delle due parti avviene tramite opportuna filettatura. La connessione del modulo con il sistema di tubazioni è realizzato mediante un raccordo con ferula adatto per tubi del diametro di 1/16 di pollice.

Da notare il foro passante nella femmina lungo 25 mm e del diametro di solo 1 mm, indispensabile per ridurre i volumi morti nonostante le difficoltà per la realizzazione.

Due copie del ModB sono state costruite. Rispetto le specifiche descritte in Figura 4.5, la gola della femmina risulta essere di 25.4 mm, mentre l'altezza del maschio è di 24.8 mm. La causa di questa differenza potrebbe essere dovuta alla lavorazione con tecnica di elettroerosione a tuffo che ha asportato parte di materiale sia dal maschio che dalla femmina. Dunque, bisogna tenere sempre in mente che nel ModB esiste uno spazio di 0.6 mm quando maschio e femmina sono a battuta. In tutte le prove eseguite si farà sempre attenzione che lo spessore minimo occupato dalle membrane sia di 0.6 mm.

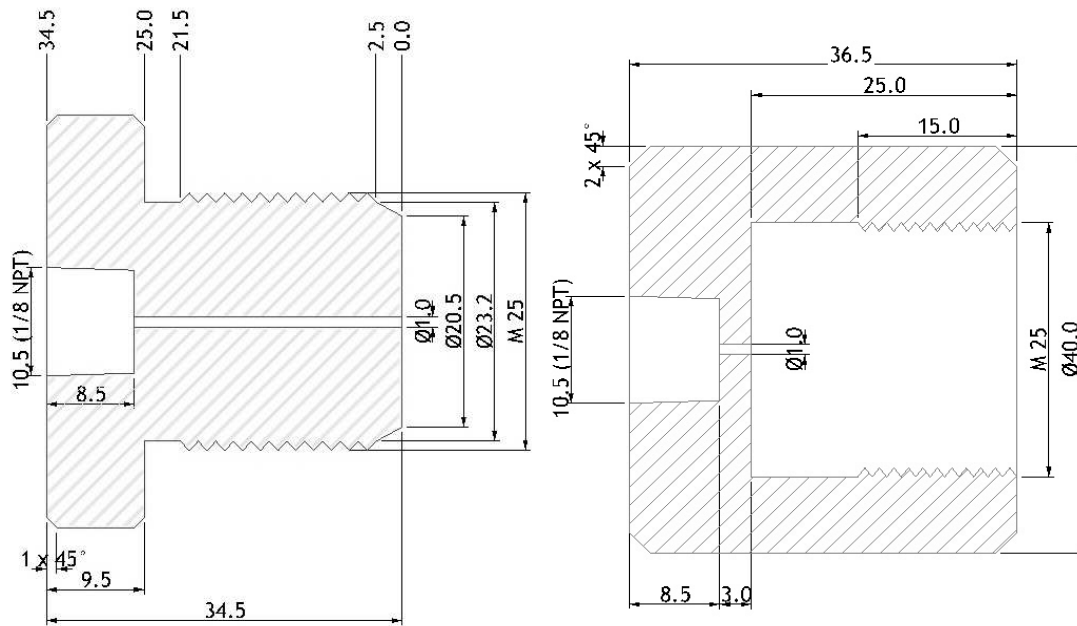


Figura 4.5: Disegni con quote della sezione lungo un diametro del maschio (a sinistra) e della femmina (a destra).

### 4.3.2 Modifiche al pezzo originale

Il ModB realizzato secondo le specifiche del disegno è stato successivamente soggetto ad alcune modifiche per migliorarne il funzionamento. Le modifiche sono state eseguite su entrambe le copie dall'AZ Studio.

- 1) Il raccordo fornito presenta un elevato volume morto al suo interno. Si è pensato di limitare tale volume inserendo un profilato in acciaio con foro di 1 mm. Tra la superficie esterna del profilato e l'interno del raccordo sono state inserite delle opportune guarnizioni. Il risultato è mostrato in Figura 4.6.

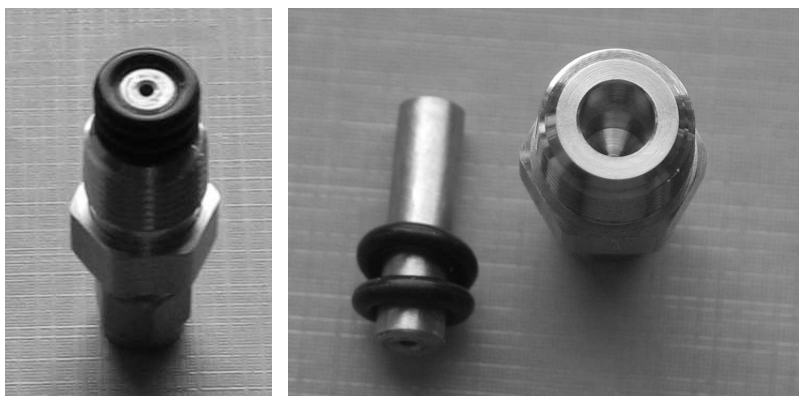


Figura 4.6: Particolari del raccordo, del profilato forato e delle guarnizioni usate.

- 2) Le membrane tagliate con un diametro di 25 mm non si adagiavano perfettamente sul fondo della gola della femmina. La sede di 25 mm esatti è risultata leggermente sottostimata, impedendo alle membrane di disporsi in

maniera ottimale. La sede è stata quindi allargata fino ad un diametro leggermente superiore di 26 mm.

- 3) Sia sul maschio che sulla femmina sono stati incisi due solchi per permettere la chiusura del modulo con chiave inglese.

Dopo le modifiche sopra elencate è stato notato un altro problema: il modulo è serrato grazie alla filettatura, in cui il maschio è vincolato a ruotare relativamente alla femmina. I distributori però presentano una superficie rugosa, per cui le membrane inserite all'interno del modulo durante la chiusura subiscono degli sforzi di taglio che ne compromettono la superficie. La soluzione scelta è stata quella di eliminare la filettatura in modo che la chiusura avvenga per sola compressione attraverso un sistema di morse (Figura 4.7). Affinché le membrane nel modulo siano compresse sempre con la stessa forza, i bulloni della morsa devono essere chiusi con l'ausilio di una chiave dinamometrica. Quest'ultima modifica è stata eseguita solo su uno dei due moduli.

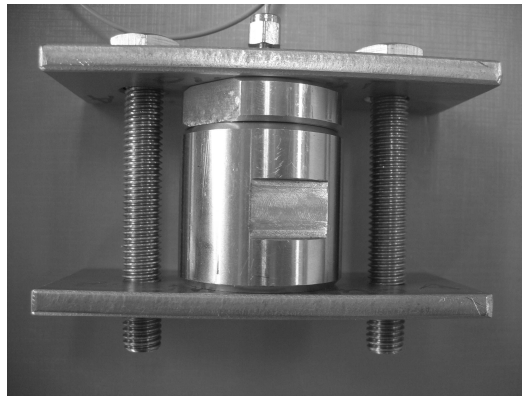


Figura 4.7: Fotografia del sistema di morse realizzato per la chiusura del modulo in cui è stata asportata la filettatura. È possibile notare anche i solchi per le chiavi inglesi necessari per l'originaria chiusura con filettatura.

### **4.3.3 Verifica e determinazione della configurazione ottimale**

Nella fase successiva alle modifiche sono state valutate le prestazioni del modulo nelle condizioni tipiche in cui è eseguito un ciclo cromatografico. In questo lavoro rientra anche la determinazione della configurazione ottimale, in modo da garantire l'assenza di flussi preferenziali lungo i bordi del modulo e assicurare che il flusso in ingresso ed in uscita al modulo sia distribuito in maniera uniforme.

Il sistema sperimentale realizzato per eseguire le prove di verifica consiste in una pompa peristaltica che movimentata il fluido attraverso il modulo; la pressione a monte del modulo è indicata attraverso un manometro. L'impianto è molto semplice e una sua schematizzazione è riportata in Figura 4.8.

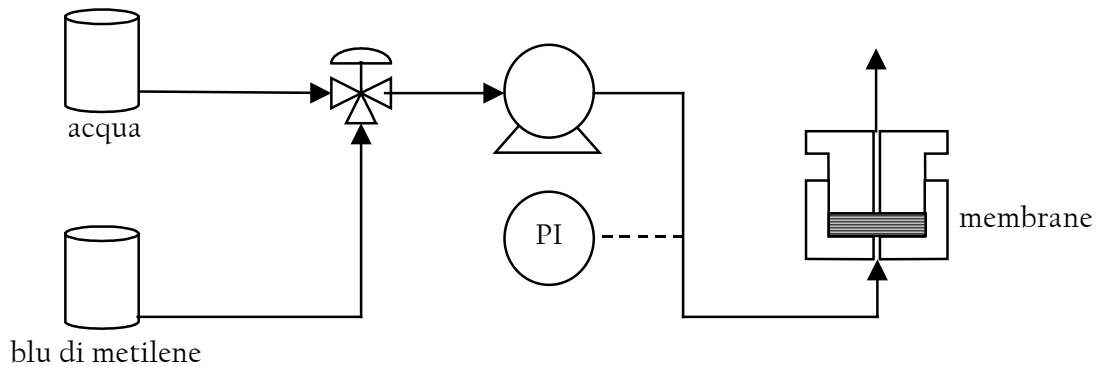


Figura 4.8: Schema del sistema sperimentale usato per le prove di verifica del ModB.

Le prove sono state eseguite usando come fluidi di servizio acqua ed una soluzione di blu di metilene. Questa è stata usata come tracciante per studiare il percorso seguito dalla corrente lungo le membrane, e stabilire così la presenza di imperfezioni nella distribuzione del flusso o percorsi preferenziali lungo i bordi.

Con l'impianto descritto sono state eseguite numerose prove su un ampio spettro di condizioni operative:

1) Membrane:

diversi tipi di membrane microporose, ciascuna con le sue caratteristiche in termini di diametro dei pori, porosità e altezza nominale, sono state considerate per verificare la funzionalità del modulo al variare del mezzo poroso usato. Il numero delle membrane inserite nel modulo è un altro parametro analizzato in questo lavoro. La distribuzione del flusso infatti potrebbe subire delle variazioni a seconda dell'altezza totale del riempimento. Inoltre è stato preso in considerazione l'effetto provocato da una diversa compressione delle membrane.

2) Portata:

le prove sono state svolte per una serie di velocità di rotazione della pompa per studiare eventuali effetti della portata sulla distribuzione del flusso all'interno del modulo. Inoltre, a parità di portata, sono state eseguite iniezioni di colorante di diversa durata per seguire l'evoluzione della corrente nel tempo.

3) Configurazione:

Sono state valutate diverse configurazioni alternative, tra loro diverse per i seguenti fattori:

- modulo con chiusura attraverso sistema a morse oppure con filettatura per determinare quale dei due sistemi di accoppiamento fosse il più funzionale e comodo;

- tipo, posizione e numero delle guarnizioni usate, al fine di evitare eventuali perdite dal modulo ed eliminare la possibilità di un flusso preferenziale lungo le pareti;
- inserimento di un mezzo poroso a ridosso dei profili dei distributori sul maschio e sulla femmina per favorire ed incrementare l'uniformità del flusso in ingresso ed in uscita. I materiali presi in considerazione sono ottone sinterizzato, acciaio sinterizzato e PAT<sup>1</sup> poroso.
- ingresso della soluzione dalla femmina o dal maschio per determinare possibili differenze imputabili al verso di scorrimento della soluzione.

Come si capisce da queste premesse, l'insieme delle prove eseguite è frutto di una lunga campagna sperimentale. Per brevità si riporterà in questo lavoro di tesi solo qualche esempio sulle prove più interessanti. Per una trattazione più dettagliata si può far riferimento al lavoro di tesi di laurea di Fabio Morselli [7].

Nelle prove preliminari, 5 membrane sovrapposte Whatman 541 sono state inserite nel modulo con chiusura a morsa. La tenuta del modulo è garantita da una guarnizione posta tra l'ultima membrana e il maschio. Il risultato dell'iniezione della soluzione di blu di metilene ad una portata di 24 ml/min per 30 secondi è riportato in Figura 4.9.

È evidente la caratteristica figura a forma di stella che sembra ricalcare il profilo dell'intaglio del distributore. Il modulo ha delle scarse prestazioni, i distributori non sono in grado di garantire un pieno sfruttamento di nessuna delle membrane utilizzate, il che comporta una insufficiente utilizzazione dell'area attiva del riempimento. Inoltre, dopo l'apertura del modulo le membrane presentano un'evidente deformazione che mostra l'esatto disegno con solchi radiali e concentrici del distributore. Il problema è certamente dovuto ad un'eccessiva compressione del letto poroso, che occupa parzialmente gli incavi del distributore impedendone il funzionamento ottimale.

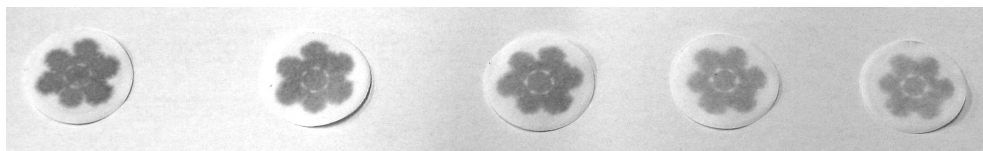


Figura 4.9: Fotografia di 5 membrane Whatman 541 dopo un'iniezione di colorante alla portata di 24 ml/min per 30 secondi. ModB con chiusura con sistema di morse. L'ingresso della soluzione avviene dalla femmina. Le membrane sono poste in ordine progressivo da sinistra verso destra.

---

<sup>1</sup> PAT è la sigla commerciale di uno dei materiali più usati in campo biomedico per la sua ottima biocompatibilità e alta resistenza chimica. PAT è l'acronimo di "PEEK Alloyed with Teflon", ovvero una lega di poli-etero-etero-chetone e poli-tetrafluoro-etilene.

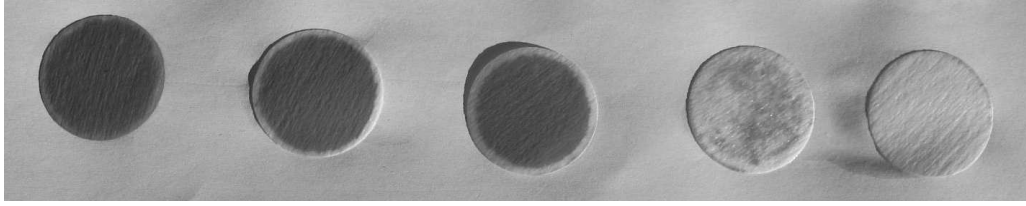


Figura 4.10: Fotografia di 5 membrane Sartoadheyde dopo un'iniezione di colorante alla portata di 10 ml/min per 2 minuti. ModB con chiusura con sistema di morse. Dischi forati in acciaio ( $\varnothing$  26 mm) a ridosso dei distributori del maschio e della femmina. L'ingresso della soluzione avviene dalla femmina. Le membrane sono poste in ordine progressivo da sinistra verso destra.

Per ovviare a tale inconveniente si è pensato di migliorare la distribuzione in ingresso ed in uscita ponendo due dischi metallici forati uno davanti la prima membrana e il secondo in uscita dal modulo. In questo modo le membrane non si trovano a diretto contatto con i distributori. Un esempio del risultato ottenuto è riportato in Figura 4.10.

Si può osservare che la colorazione è uniforme, particolarmente per le prime membrane. Si nota però che l'area bagnata varia da una membrana alla successiva. Inoltre, le ultime membrane presentano una leggera colorazione lungo il bordo, a testimonianza di un flusso preferenziale lungo le pareti del modulo. Questa configurazione può essere presa come punto di partenza per le successive, ma è di fondamentale importanza risolvere il problema relativo al bypass esterno.

Un'altra complicazione riscontrata in questa serie di prove è legata alla scarsa capacità di controllo della compressione del riempimento all'interno del modulo. Nonostante la chiusura con sistema a morse sia eseguita con l'ausilio di una chiave dinamometrica, sulle membrane si nota chiaramente un calco dei fori presenti nel disco metallico, indicazione dell'eccessiva compressione del letto poroso.

I dischi forati sono stati sostituiti con dei dischi porosi del diametro di 21 mm e spessore di 2 mm. Lo spazio vuoto tra il disco e le pareti della gola della femmina (diametro 26 mm) è occupato da una guarnizione con corda compatibile con il diametro esterno e lo spessore del disco stesso (Figura 4.11). Anche in questo caso i due dischi sono posti a ridosso dell'ingresso e dell'uscita del modulo.

La compressione delle membrane è controllata ponendo degli opportuni spessori tra la testa del maschio e la femmina. A tal proposito sono stati adoperati degli anelli di rasamento con spessore di 0.2 mm e 0.5 mm. Il diametro interno degli anelli è di 25 mm in modo da poter essere inseriti nel corpo del maschio. Lo spessore dei distanziali da interporre è facilmente stimato per sottrazione dell'altezza totale delle membrane e lo spazio vuoto tra maschio e femmina (0.6 mm, si veda § 4.3.1). Sovrapponendo combinazioni diverse degli anelli è possibile ottenere praticamente qualsiasi spessore desiderato.



Figura 4.11: Particolare della sede della femmina nel ModB. In fondo si nota il disco poroso con la relativa guarnizione.

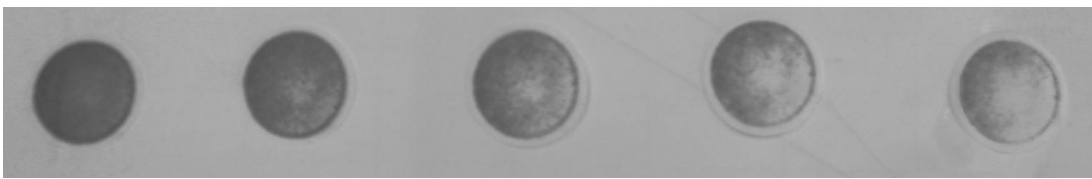


Figura 4.12: Fotografia di 5 membrane Schleicher & Schuell n° 589/3 dopo un'iniezione di colorante alla portata di 10 ml/min per 30 secondi. ModB con chiusura con sistema di morse. Dischi porosi in acciaio sinterizzato ( $\varnothing$  21 mm, spessore 2 mm) a ridosso dei distributori del maschio e della femmina. L'ingresso della soluzione avviene dalla femmina. Le membrane sono poste in ordine progressivo da sinistra verso destra.

Con queste osservazioni sono state eseguite delle nuove prove con colorante; un esempio caratteristico è riportato in Figura 4.12.

È facile notare i vantaggi ottenuti con questa nuova configurazione. Le membrane sono bagnate in modo sensibilmente più uniforme e l'area interessata dal flusso è costante su tutti gli elementi. Tuttavia si osserva che solo un lato delle ultime membrane è bagnate, inoltre è presente un anello di colorante in corrispondenza del bordo esterno del disco poroso.

Un momento critico per il corretto posizionamento del modulo è quello della chiusura dei due bulloni della morsa (si veda Figura 4.7). Dal punto di vista operativo, è inevitabile che una delle due viti sia leggermente più stretta, provocando una maggiore compressione del letto poroso in un lato piuttosto che nell'altro. Di conseguenza il lato meno compresso offrirà una minor resistenza al flusso e la soluzione scorrerà in questa zona.

L'anello di colorante, visibile in particolare nelle ultime membrane, è dovuto alla guarnizione posta intorno al sinterizzato, che non è sufficiente a riempire tutto lo spazio compreso tra il disco poroso e le pareti della femmina. Si verifica quindi un flusso preferenziale a ridosso dei bordi del disco, proprio laddove rimane una posizione non occupata dalla guarnizione.

L'alternativa scelta è stata di usare il modulo con chiusura filettata, garanzia di un perfetto accoppiamento sullo stesso asse di maschio e femmina. Inoltre il disco

in acciaio sinterizzato è stato sostituito con un disco poroso in PAT. Questo presenta uno spessore pari a 1.7 mm, minore rispetto i 2 mm del disco metallico; in questo modo lo spazio libero tra il disco e la sede della femmina sarà completamente occupato dalla guarnizione. Si è scelto di usare un materiale plastico perché più tenero rispetto all'acciaio, quindi sono esclusi problemi di abrasione del disegno del distributore da parte del disco durante la chiusura del modulo. Alcuni risultati degli esperimenti con colorante sono riportati in Figura 4.13 e Figura 4.14.



Figura 4.13: Fotografie di 5 membrane Schleicher & Schuell n° 589/3 dopo un'iniezione di colorante alla portata di 10 ml/min per 10 secondi. ModB serrato con filettatura. Dischi porosi in PAT ( $\varnothing$  21 mm, spessore 1.7 mm) a ridosso dei distributori del maschio e della femmina. L'ingresso della soluzione avviene dalla femmina. Le membrane sono poste in ordine progressivo da sinistra verso destra.



Figura 4.14: Fotografie di 10 membrane Schleicher & Schuell n° 589/3. Le altre condizioni sperimentali sono identiche di quelle in Figura 4.13.

Le prove eseguite con quest'ultima configurazione hanno restituito dei risultati più che soddisfacenti. Sono stati risolti i problemi legati al flusso preferenziale e la colorazione risulta praticamente uniforme su tutta l'area frontale. Da notare che una membrana è interessata dal flusso di colorante solo dopo che la precedente è stata completamente bagnata.

Le fotografie sopra riportate dimostrano che non ci sono differenze sostanziali se nel modulo sono inserite 5 o 10 membrane. Infatti nelle due prove considerate sono state mantenute le stesse condizioni operative in termini di portata e durata dell'iniezione; in entrambi i casi le prime tre membrane sono completamente bagnate mentre la quarta è solo parzialmente investita dal flusso di colorante.

L'area attiva del mezzo poroso è stata stimata da misure dirette dell'area colorata sulle membrane e risulta pari a  $3.8 \text{ cm}^2$ , corrispondente ad un diametro di 22 mm.

La determinazione della configurazione ottimale è un eccellente risultato che ci permette di eseguire prove sperimentali accurate, riproducibili e senza che l'esito dipenda dall'operatore. Inoltre l'utilizzazione dell'area attiva delle membrane è



massimizzata, con un conseguente aumento delle prestazioni globali del processo di separazione.

## 4.4 Confronto sperimentale tra i due moduli

La determinazione della configurazione ottimale, pur costituendo un elemento di primaria importanza per l'applicazione pratica del nuovo modulo, non è sufficiente per dimostrare gli effettivi miglioramenti introdotti rispetto al modulo precedente.

Per un opportuno confronto tra i due moduli, ModA e ModB, devono essere eseguiti degli esperimenti di adsorbimento in condizioni operative simili, ed evidenziare se e quali sono le differenze nei risultati ottenuti.

Piuttosto che eseguire delle nuove prove sul ModA si è pensato di sfruttare i risultati di uno dei supporti promettenti visti nel Capitolo 3. Il sistema di riferimento scelto è la caratterizzazione dinamica eseguita con 5 membrane SartoAIMs sovrapposte presentata nel § 3.4.1.1. Una caratterizzazione del tutto simile è stata condotta sul ModB, anche in questo caso con 5 membrane SartoAIMs sovrapposte, il cui le prove sono state eseguite alle stesse condizioni operative riportate in Tabella 3.15 e Tabella 3.16.

Prima di confrontare i risultati dei cicli cromatografici condotti con IgG vale la pena osservare le curve di dispersione. Si ricorda che questo tipo di esperimenti sono eseguiti in condizioni non adsorbenti, quindi è esclusa la possibilità di interazioni tra il soluto e la membrana. I dati di dispersione forniscono delle informazioni preziose riguardo i volumi morti e l'entità dei miscelamenti nel sistema.

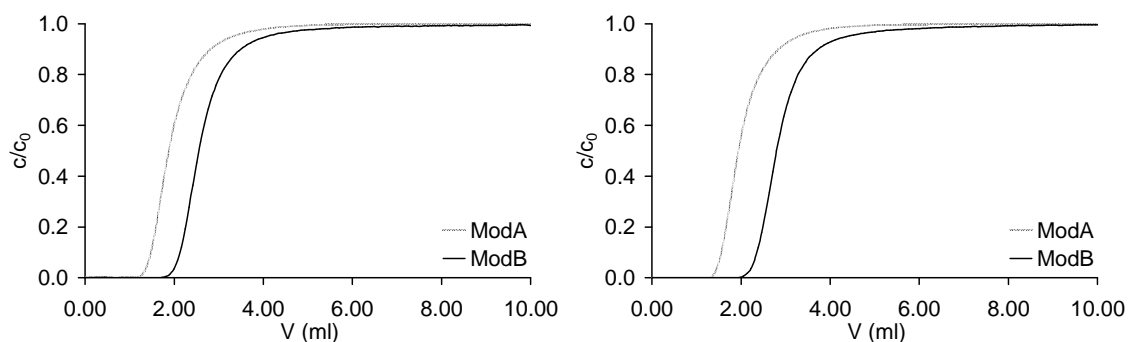


Figura 4.15: Confronto delle curve di dispersione nei volumi esterni alla colonna ottenute con i due moduli alla portata di 1 ml/min (a sinistra) e 5 ml/min (a destra). Profili normalizzati ad 1.

In Figura 4.15 sono riportati alcuni esempi di curve di dispersione eseguite sui due moduli. Si può notare che il ModB ha dei volumi morti più alti rispetto al ModA, stimati in circa 0.56 ml, che si riflettono in un ritardo della curva di

dispersione. Si osserva inoltre che le due curve sono pressoché equidistanti, dunque non c'è nessun evidente aumento dei fenomeni di miscelamento. Il maggior volume morto associato al ModB è da imputare principalmente alla presenza dei due dischi porosi in PAT.

In Figura 4.16, Figura 4.17 e Figura 4.18 sono riportate rispettivamente le curve di adsorbimento, lavaggio ed eluizione relativamente a due cicli cromatografici condotti con i due moduli. I confronti sono eseguiti a parità di condizioni operative.

Le prestazioni del nuovo modulo sono evidenti: le curve di adsorbimento per il ModB sono molto ripide nel tratto iniziale, tanto da incrociare e superare le curve di breakthrough degli esperimenti condotti con il ModA. In un sistema cromatografico ideale la curva di adsorbimento presenta uno scalino in corrispondenza della saturazione delle membrane. Dunque, quanto più un sistema mostra una curva di breakthrough ripida, tanto più si approssima alla condizione di idealità [8].

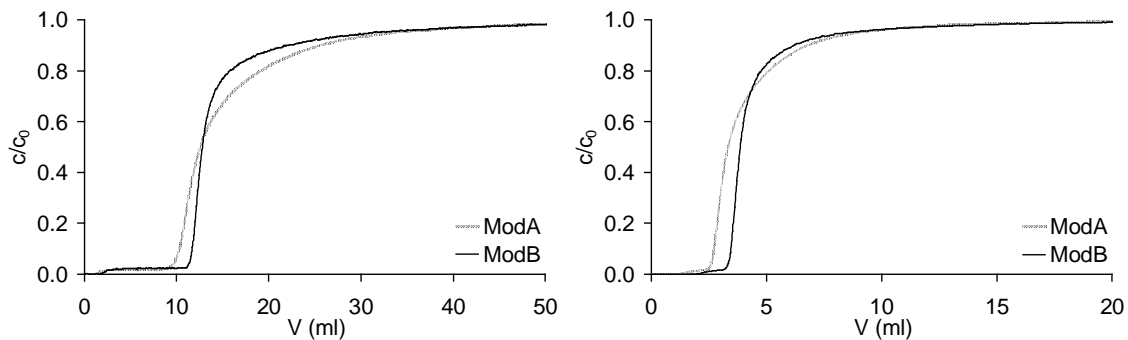


Figura 4.16: Confronto delle curve di adsorbimento ottenute con i due moduli alle seguenti condizioni operative:  $F = 1 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 0.3 \text{ mg/ml}$  (a sinistra) e  $F = 2 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 2.0 \text{ mg/ml}$  (a destra). Profili normalizzati ad 1.

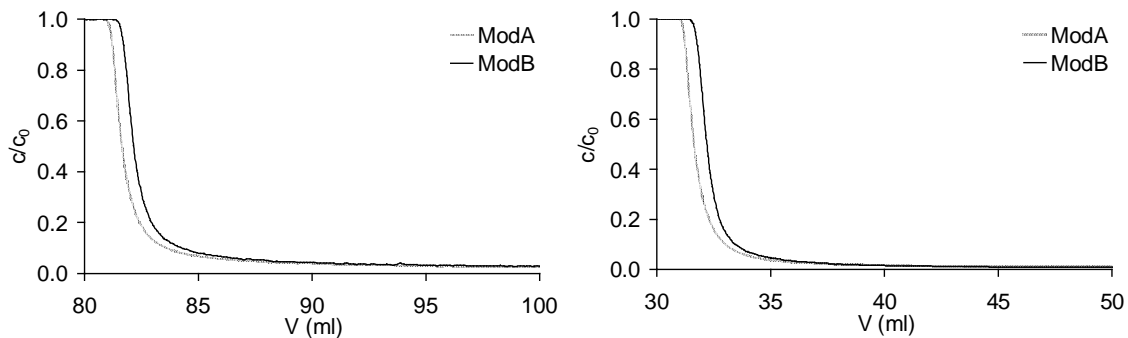


Figura 4.17: Confronto delle curve di lavaggio ottenute con i due moduli alle seguenti condizioni operative:  $F = 1 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 0.3 \text{ mg/ml}$  (a sinistra) e  $F = 2 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 2.0 \text{ mg/ml}$  (a destra). Profili normalizzati ad 1.

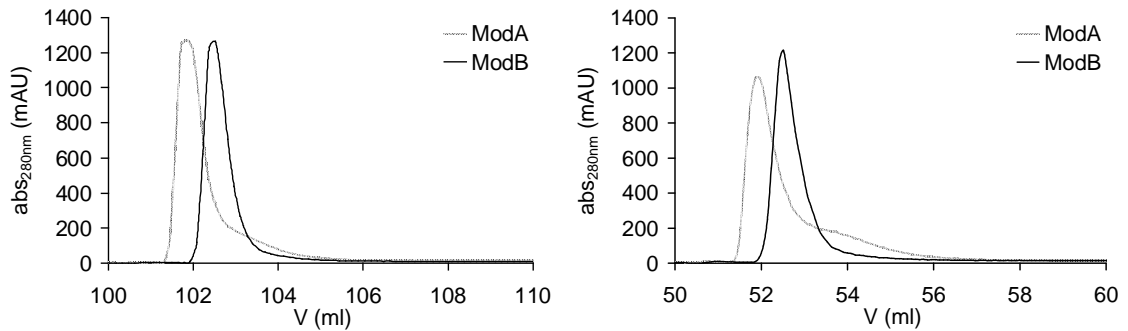


Figura 4.18: Confronto delle curve di eluizione ottenute con i due moduli alle seguenti condizioni operative:  $F = 1 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 0.3 \text{ mg/ml}$  (a sinistra) e  $F = 2 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 2.0 \text{ mg/ml}$  (a destra).

A causa del maggiore volume morto associato al ModB, le fasi di lavaggio ed eluizione risultano leggermente traslate lungo l'asse tempi. I profili di eluizione ci forniscono degli ottimi spunti di osservazione: in uscita dal ModB si registra un picco alto e ben definito, mentre nel vecchio ModA il picco presenta una coda molto pronunciata. Questa differenza riflette dei problemi di tipo fluidodinamico presenti nel ModA, che sono invece risolti nel nuovo ModB.

Per concludere, è stato studiato un nuovo modulo per membrane piane, progettato al fine di ottenere alte efficienze di utilizzazione della fase stazionaria. Un dettagliato studio sperimentale ha dimostrato che questo modulo consente di eseguire prove di adsorbimento affidabili e ripetibili.

## Bibliografia

1. Zou, H., Luo, Q., Zhou, D., *Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001, 49, 199–240.
2. Ghosh, R., Wong, T., *Effect of module design on the efficiency of membrane chromatographic separation processes*, Journal of Membrane Science, 2006, 281, 532–540.
3. Hahn, R., Bauerhansl, P., Shimahara, K., Wizniewski, C., Tscheliessnig, A., Jungbauer, A., *Comparison of protein A affinity sorbents II. Mass transfer properties*, Journal of Chromatography A, 2005, 1093, 98–110.
4. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R., *Analysis of affinity separations II: the characterization of affinity column by pulse techniques*, The Chemical Engineering Journal, 1985, 30, B25–B36.

5. Ghosh, R., *Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges*, Journal of Chromatography A, **2002**, 952, 13–27.
6. Roper, D. K., Lightfoot, E. N., *Separation of biomolecules using adsorptive membranes*, Journal of Chromatography A, **1995**, 702, 3–26.
7. Morselli, F., *Caratterizzazione di membrane di affinità per IgG umana*, **2008**, Tesi di laurea, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.
8. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R., *Analysis of affinity separations I: predicting the performance of affinity adsorbers*, The Chemical Engineering Journal, **1985**, 30, B9–B23.

---

# CAPITOLO 5

---

## MODELLAZIONE MATEMATICA: STATO DELL'ARTE

### Introduzione

Un buon modello matematico fornisce una soluzione pratica per evitare numerose prove sperimentali, e può essere applicato per ottenere previsioni accurate del comportamento dinamico del sistema considerato, sia in fase di progettazione del processo che per lo scale up dell'impianto.

In letteratura sono presentati diversi metodi per modellare il processo di cromatografia di affinità. L'approccio più frequentemente usato consiste nel risolvere l'equazione di bilancio di materia per il soluto di interesse, accoppiato al sistema costituito dalle equazioni di trasporto, cinetiche di adsorbimento o leggi di equilibrio all'interfaccia. Il problema formulato deve essere accoppiato con opportune condizioni iniziali e al contorno [1].

In una generica colonna di affinità, il trasporto di materia è il prodotto di numerosi contributi: dispersione assiale, convezione nei pori passanti, trasporto di materia nello strato limite, diffusione molecolare e di superficie nei macropori e nei micropori. Il modello che considera tutti questi fattori è solitamente indicato con il termine "generale" e fornisce una descrizione molto dettagliata del processo. L'inconveniente associato a questo modello è la presenza di numerose variabili, alcune delle quali di difficile determinazione sperimentale che sono considerate parametri aggiustabili o il cui valore numerico è determinato tramite correlazioni empiriche. A seconda del sistema esaminato, uno o più di questi fenomeni può essere assunto molto più veloce rispetto agli altri, e dunque il suo contributo alla cinetica del trasporto di materia complessivo può essere trascurato.

Oltre gli effetti legati al trasporto di materia anche la cinetica di reazione riveste un ruolo di primaria importanza, in quanto definisce il tipo di interazione tra il soluto e la fase stazionaria. Se però la cinetica di reazione è molto più veloce rispetto ai fenomeni di trasporto, allora la reazione può essere considerata all'equilibrio, con una conseguente semplificazione della descrizione matematica [2].

Uno schema dei modelli più comunemente usati è esposta in Tabella 5.1.

Tabella 5.1: Tipi di modelli esistenti per processi di cromatografia di affinità [1].

Modello	Coefficiente TMSL <sup>a</sup>	Cinetica di adsorbimento	Modello di flusso	Sistema <sup>b</sup>
Generale	finito	finito	disp. assiale	R, P, M
Parametro globale	finito	finito	disp. assiale	R
Generale di equilibrio	finito	infinito	disp. assiale	R, P, M
Cinetico	infinito	finito	flusso pistone	R, M
Semplificato di equilibrio	finito	infinito	flusso pistone	R

<sup>a</sup> Trasporto di materia nello strato limite.

<sup>b</sup> R: sistemi con resine porose; P: sistemi perfusivi; M: sistemi con membrane.

Il modello generale considera tutti i fenomeni legati al trasporto di materia, oltre all'adsorbimento ed alla dispersione assiale. A differenza del modello generale, il modello con parametro globale riunisce in un unico coefficiente di trasporto sia la diffusione nei pori che il trasporto di materia nello strato limite. Con questo accorgimento si riduce la complessità delle equazioni. Per sistemi con veloci cinetiche di adsorbimento è spesso usato il più semplice modello di equilibrio.

Nel caso in cui sia possibile trascurare la dispersione assiale la descrizione matematica si semplifica notevolmente: modello cinetico per sistemi in cui il comportamento della BTC è controllato solo dalla cinetica di adsorbimento, e modello di equilibrio semplificato, in cui il meccanismo di trasporto è descritto da un unico coefficiente di trasporto di materia globale. In alcuni casi particolari questi modelli ammettono una soluzione analitica.

La maggior parte dei modelli descritti in letteratura si riferisce a sistemi cromatografici basati su interazioni di tipo non specifico (es. scambio ionico) in quanto sono stati i primi a essere stati studiati e sviluppati [3]. Tali tecniche di separazione cromatografica non seguono gli stadi caratteristici elencati per la cromatografia di affinità, ovvero adsorbimento, lavaggio ed eluizione. La modellazione della cromatografia di affinità rappresenta un caso del tutto particolare, e solo negli ultimi due decenni si osserva un progressivo aumento degli sforzi in questa direzione al fine di avere dei modelli sempre più accurati ed affidabili.

## 5.1 Modello di trasporto

In prima approssimazione, una colonna cromatografica è schematizzabile come un mezzo poroso in cui la fase mobile e la fase stazionaria interagiscono continuamente. Per una corretta ed esauriente descrizione matematica di un processo di cromatografia di affinità si devono studiare i seguenti aspetti:

- la fluidodinamica nel sistema che caratterizza il flusso della fase mobile e il trasporto dei soluti;
- la descrizione delle interazioni dei soluti con la fase stazionaria attraverso opportune equazioni cinetiche o di equilibrio.

I soluti contenuti nell'alimentazione sono trasportati attraverso la colonna di affinità dal flusso del solvente (flusso convettivo). Idealmente, il flusso convettivo trasporta i soluti verso l'uscita secondo lo schema del flusso a pistone. Di conseguenza, nella descrizione fisico - matematica delle colonne di affinità, la velocità interstiziale viene assunta costante ed uniforme.

Nella colonna le biomolecole nella fase mobile sono protagoniste di due fenomeni di trasporto, la dispersione e la diffusione molecolare, che costituiscono delle resistenze al trasporto verso i siti di affinità posti sulla superficie interna della fase stazionaria [4].

Infatti nonostante il flusso convettivo sia in prima approssimazione il fenomeno rilevante per il trasporto dei soluti lungo la colonna, questi sono dispersi a causa di fenomeni su scala microscopica che avvengono nella fase fluida: mescolamenti dovuti ad ostruzioni per il flusso, interconnessioni incomplete, vortici e ricircolazioni prodotti dalle tortuosità della struttura interna del mezzo poroso. Il risultato di tutti questi fenomeni è indicato in letteratura come dispersione vorticoso, e dipende esclusivamente dalla geometria del sistema considerato e dalla velocità della fase mobile. Il tipo di fase mobile e fase stazionaria e il coefficiente di diffusione molecolare del soluto possono non avere effetti su questo fenomeno [5, 6]. Una descrizione completa della dispersione include inoltre gli effetti della diffusione molecolare nella direzione longitudinale e radiale, come evidenziato da Taylor [7] e Aris [8] e successivamente approfondito da Carbonell e Whittaker nel caso di flusso in mezzi porosi [9].

### 5.1.1 Miscelazione nei volumi esterni alla colonna

Prima di continuare con la trattazione teorica sulla modellazione di colonne di affinità con membrane, risulta importante introdurre il fenomeno della miscelazione nei volumi esterni alla colonna.

Considerando l'intero impianto, le prestazioni di un processo cromatografico possono essere fortemente peggiorate dalla miscelazione che si ha nei volumi esterni alla colonna, ovvero in tutte le tubazioni, apparati accessori e strumenti di misura necessari per l'esecuzione della prova. Tutti questi elementi causano un allargamento della BTC, fenomeno particolarmente significativo nel caso di membrane di affinità, ed in alcuni casi pratici può essere predominante sugli altri fenomeni di trasporto [10].

La miscelazione nei volumi esterni alla colonna sarà anche indicata come “dispersione nel sistema”. In questo caso comunque, la dispersione è riferita ai fenomeni di miscelazione che avvengono in qualsiasi unità del sistema, e non limitatamente ai volumi dei vuoti nelle membrane; non la si deve quindi confondere con la dispersione che si ha su scala microscopica in seno al fluido che attraversa le membrane.

Dal punto di vista sperimentale le prove per la determinazione della dispersione esterna sono eseguite come in un comune ciclo cromatografico in cui è però eliminata la possibile interazione tra soluto e fase stazionaria, cioè in condizioni non adsorbenti. Normalmente si possono eseguire esperimenti di dispersione con un soluto poco costoso che non interagisce con il supporto come per esempio acetone<sup>1</sup> [11], si può alimentare una soluzione della biomolecola di interesse nel buffer di eluizione [12] o in un tampone con condizioni di pH o forza ionica che impediscano l'adsorbimento [10] oppure si possono usare membrane in cui i gruppi funzionali siano stati precedentemente disattivati [13].

Il modello sviluppato per descrivere la dispersione nel sistema prende in considerazione il volume dell'intero sistema usato per eseguire le prove sperimentali,  $V_{sis}$ . Oltre al volume dei vuoti della membrana,  $V_{mem,vuoti}$ , il volume del sistema include il volume degli apparati esterni,  $V_{ext}$ , costituito dai distributori di flusso in ingresso e in uscita dal modulo, tubi e raccordi, valvole, pompe, celletta ottica del rivelatore, ecc., quindi:

$$V_{sis} = V_{mem,vuoti} + V_{ext} \quad 5.1$$

Il modello più semplice per descrivere con buona approssimazione il comportamento del sistema è la combinazione in serie di una fase perfettamente miscelata (CSTR) ed una con flusso a pistone (PFR) [10, 14]. Secondo questo modello quindi il volume del sistema è:

$$V_{sis} = V_{CSTR} + V_{PFR} \quad 5.2$$

---

<sup>1</sup> Per applicare questa soluzione bisogna prima verificare che la miscelazione nei volumi esterni alla colonna è dovuta principalmente ad effetti di dispersione vorticoso e dunque può essere trascurato il contributo della diffusione molecolare.



dove è evidente il significato dei termini presenti.

Consideriamo l'equazione caratteristica di un CSTR

$$\frac{dc_{out}^{CSTR}}{dt} = \frac{F}{V_{CSTR}} (c_{in}^{CSTR} - c_{out}^{CSTR}) \quad 5.3$$

dove  $c_{in}^{CSTR}$  e  $c_{out}^{CSTR}$  sono rispettivamente le concentrazioni del fluido in entrata e in uscita dal CSTR e  $F$  è la portata volumetrica (costante). La condizione iniziale associata a questo problema dipende dalla fase cromatografica considerata; nella fase di adsorbimento l'impianto risulta privo di qualsiasi biomolecola, per cui:

$$c_{out}^{CSTR} = 0 \quad \text{per } t = 0 \quad 5.4$$

mentre nell'istante di inizio della fase di lavaggio,  $t_w$ , si suppone che la concentrazione di proteina all'interno dell'impianto coincida con la concentrazione dell'alimentazione:

$$c_{out}^{CSTR} = c_0 \quad \text{per } t = t_w \quad 5.5$$

Anche se dal punto di vista matematico non è necessario introdurre delle condizioni al contorno, affinché il problema non risulti indeterminato bisogna definire la grandezza  $c_{in}^{CSTR}$  per ogni fase cromatografica. Nella fase di adsorbimento viene alimentata all'impianto la soluzione da separare, per cui:

$$c_{in}^{CSTR} = c_0 \quad \text{per } 0 < t < t_w \quad 5.6$$

mentre nel lavaggio non viene più introdotto il campione e la concentrazione di proteina è nulla:

$$c_{in}^{CSTR} = 0 \quad \text{per } t > t_w \quad 5.7$$

Come verrà spiegato alla fine del presente paragrafo, nella fase di eluizione non è necessario implementare il modello di dispersione nella colonna per cui non sono necessarie condizioni iniziali e al contorno per questo stadio.

Nel CSTR, il contenuto è perfettamente miscelato e quindi uniforme in composizione; ne viene che il fluido uscente dal CSTR ha la stessa concentrazione del liquido in esso contenuto.

L'effetto del PFR è invece quello di traslare la risposta del sistema lungo l'asse dei tempi. Infatti la risposta è ritardata di un tempo morto che corrisponde al tempo di riempimento del PFR. Matematicamente è rappresentato dall'equazione:

$$c_{out}^{PFR} = \begin{cases} 0 & \text{per } t < t_d \\ c_{in}^{PFR} & \text{per } t \geq t_d \end{cases} \quad 5.8$$

dove  $c_{in}^{PFR}$  e  $c_{out}^{PFR}$  sono rispettivamente le concentrazioni del fluido in entrata e in uscita dal PFR, e  $t_d$  è il tempo di ritardo legato al volume del PFR dalla semplice relazione:

$$t_d = \frac{V_{PFR}}{F} \quad 5.9$$

Nel PFR non sono contemplati i fenomeni di miscelazione e diffusione assiale, cosicché il tempo di permanenza è lo stesso per tutti gli elementi di fluido. Inoltre è del tutto ininfluyente la posizione del PFR rispetto quella del CSTR, in quanto l'unico risultato è quello di spostare la risposta del sistema di un tempo pari al ritardo associato al suo volume. È quindi indifferente se il sistema sia descritto da un CSTR e da un PFR in serie o viceversa.

Se il tracciante in ingresso subisce un disturbo a gradino dalla concentrazione nulla alla concentrazione  $c_0$ , il sistema di equazioni 5.3 – 5.8 ammette la seguente soluzione analitica:

$$c_{DS} = \begin{cases} 0 & \text{per } t < t_d \\ c_0 \left[ 1 - \exp\left(-\frac{F}{V_{CSTR}}(t - t_d)\right) \right] & \text{per } t_d \leq t < t_w \end{cases} \quad 5.10$$

Quest'equazione è utile per descrivere la dispersione nei volumi esterni alla colonna nella fase di adsorbimento. Nella fase di lavaggio invece il tracciante subisce il disturbo opposto, e la sua concentrazione in alimentazione cambia bruscamente da  $c_0$  a zero; anche in questo caso il sistema di equazioni 5.3 – 5.8 ammette soluzione analitica:

$$c_{DS} = \begin{cases} 1 & \text{per } t_w < t < t_d + t_w \\ c_0 \exp\left(-\frac{F}{V_{CSTR}}(t - t_d - t_w)\right) & \text{per } t \geq t_d + t_w \end{cases} \quad 5.11$$

A partire da curve sperimentali di dispersione nel sistema, tramite minimizzazione della somma degli scarti quadratici si possono determinare i parametri  $V_{CSTR}$  e  $t_d$ . Da notare che i volumi associati al CSTR ed al PFR sono gli stessi per le fasi di adsorbimento e lavaggio, dato che il sistema cromatografico non subisce variazioni tra i due stadi.

Per una corretta descrizione dei dati sperimentali, la miscelazione nei volumi esterni alla colonna è un fenomeno che va considerato in tutte le fasi cromatografiche. Tuttavia bisogna precisare che nella fase di eluizione non c'è un disturbo in ingresso del soluto di interesse; esiste comunque un disturbo dovuto al cambio di tampone che potrebbe influire nella fase di eluizione. Quest'effetto non è stato ad oggi considerato in letteratura; nel § 6.3 è proposto un semplice metodo per tener conto della dispersione anche nella fase di eluizione.

### 5.1.1.1 Implementazione del modello di miscelazione nei volumi esterni per sistemi adsorbenti

Come si vedrà più avanti in questo paragrafo, la colonna cromatografica è descritta dall'equazione di un PFR in cui è incluso il termine generativo, dunque in condizioni di adsorbimento la colonna non comporta un puro ritardo. Quando però si eseguono prove di dispersione nel sistema è esclusa la possibilità di adsorbimento e il termine generativo è eliminato. Ne consegue che il volume della colonna rappresenta una quota parte del volume del PFR del modello di dispersione nel sistema.

Questa osservazione fa capire che, quando si applica il modello di miscelazione nei volumi esterni alla colonna al caso di prove di adsorbimento, si devono considerare i soli volumi esterni alla colonna assimilabili ad un PFR, ovvero  $V_{PFR} - V_{mem, vuoti}$ .

Come già detto comunque, l'effetto del PFR è un semplice ritardo della risposta del sistema, e la sua posizione rispetto al CSTR o rispetto la colonna è irrilevante. Ben diverso è invece il caso del CSTR, la cui posizione relativa rispetto al modulo cromatografico modifica la soluzione del problema matematico.

Una trattazione completa ed esatta dovrebbe suddividere gli effetti dei miscelamenti nei volumi a monte e a valle della colonna, in modo da poter considerare i due distinti contributi alla dispersione. In teoria andrebbero fatti degli esperimenti di dispersione in cui è inserito un rivelatore del tracciante tra il distributore di flusso della colonna e la prima membrana ed un altro rivelatore tra l'ultima membrana e il collettore del modulo. È chiaro che tale sistema sperimentale è impossibile da realizzare e, comunque, il risultato sarebbe invalidato dalla stessa presenza del rivelatore a cui a sua volta sono associati un ritardo ed una miscelazione.

Visti i limiti imposti dal sistema sperimentale, nelle trattazioni matematiche si preferisce accorpare tutti i fenomeni di miscelazione in un unico CSTR. La posizione di quest'elemento rispetto la colonna cromatografica non è univoca. Ad esempio si può considerare il CSTR a valle del modulo, scelta da cui consegue una

diminuzione della complessità delle equazioni<sup>2</sup> [10], oppure si possono confrontare i volumi sperimentali a monte e a valle del modulo e scegliere di posizionare il CSTR dove questi hanno un peso maggiore [11].

/—/

Il modello generale per la cromatografia è stato sviluppato nel corso degli anni con l'obiettivo di descrivere in maggior dettaglio i processi cromatografici con colonne impaccate con resine. In linea di principio i fenomeni fondamentali di trasporto e cinetici sono indipendenti dal supporto considerato, per cui il modello generale può essere esteso semplicemente al caso di membrane con il solo accorgimento di descrivere la nuova geometria in esame.

Il modello proposto da Suen ed Etzel [15] non è altro che una semplificazione del modello generale in cui viene trascurata la diffusione molecolare e superficiale nei pori. Infatti, a differenza dei riempimenti convenzionali, le membrane non presentano pori ciechi in cui la diffusione è il solo meccanismo di trasporto, bensì una maglia di pori tra loro interconnessi attraverso cui il trasporto è principalmente convettivo.

Sulla base di uno studio di tempi caratteristici, Suen e Etzel hanno inoltre concluso che nel caso di membrane porose è possibile trascurare il trasporto di materia nello strato limite rispetto alla convezione nella direzione assiale. Questa semplificazione è di pratica comune e ammissibile praticamente in tutti i casi sperimentali. A sostegno di quest'affermazione, nel § 6.2 sarà proposto un modello in cui è considerato anche il trasporto di materia nello strato limite; affinché gli effetti di questo fenomeno siano manifesti il coefficiente di trasporto di materia deve assumere valori fisicamente irrealistici. Ciò nonostante, qualche autore ha supposto che il trasporto di materia nello strato limite sia il fenomeno di trasporto dominante nel processo di separazione [16].

Una schematizzazione della colonna cromatografica con membrane è proposta in Figura 5.1: la soluzione è alimentata con concentrazione  $c_0$  e fluisce con velocità interstiziale costante  $v$ , mentre la sua concentrazione  $c$  varia lungo la direzione assiale. Le caratteristiche geometriche del supporto sono la lunghezza complessiva  $L$  e il grado di vuoto  $\varepsilon$ . La capacità della membrana, ovvero la concentrazione di ligando immobilizzato sulla fase stazionaria per unità di volume di solido, è indicata con  $c_l$ , mentre la concentrazione di soluto adsorbito viene indicata con  $c_s$ . Sia  $c$  che  $c_s$  sono funzioni dello spazio e del tempo.

---

<sup>2</sup> Se il CSTR è posizionato a valle del modulo, la concentrazione in ingresso alla colonna subisce un gradino in corrispondenza dell'arrivo del soluto. Questo artificio rende il problema più semplice ed in alcuni casi particolari è possibile ottenere una soluzione analitica.

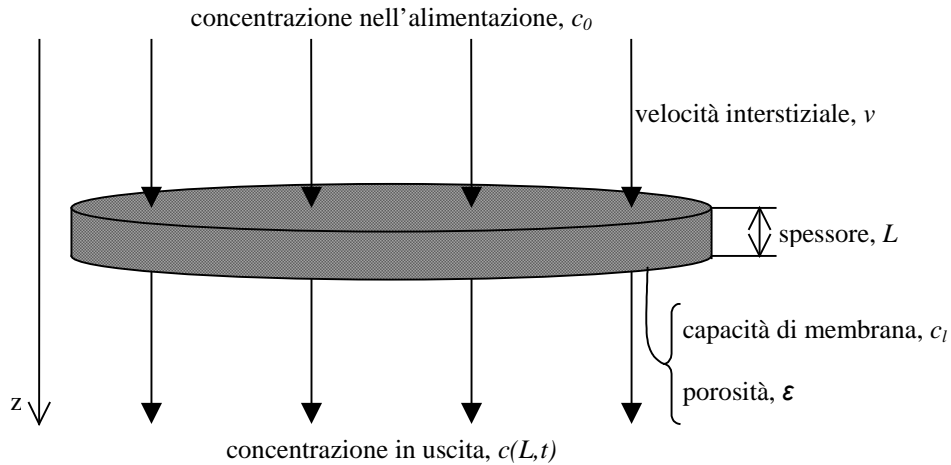


Figura 5.1 Schema semplificato del processo di cromatografia con membrane. La soluzione proteica passa attraverso i pori della membrana in modo che la proteina venga adsorbita dal ligando.

Come già indicato, per una corretta descrizione della colonna cromatografica bisogna considerare il trasporto di materia dei soluti e l'interazione tra biomolecola e matrice. Questi due aspetti sono espressi matematicamente da due equazioni, un bilancio di materia nella fase fluida e la cinetica della reazione di legame sulla superficie.

Supponendo di poter trascurare il profilo di concentrazione nella direzione radiale, su una generica sezione della membrana è possibile scrivere la seguente equazione di bilancio per la biomolecola:

$$\varepsilon \frac{\partial c}{\partial t} + \varepsilon v \frac{\partial c}{\partial z} = \varepsilon D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - (1 - \varepsilon) \frac{\partial c_s}{\partial t} \quad 5.12$$

dove  $D_L$  è il coefficiente di dispersione longitudinale. Da sinistra verso destra si riconoscono il termine di accumulo, convezione, dispersione assiale e infine quello generativo, necessario per descrivere le interazioni tra biomolecola e ligando.

Nel caso di un sistema multicomponente in cui sono presenti  $n$  specie in soluzione, la 5.12 assume la seguente forma:

$$\varepsilon \frac{\partial c_i}{\partial t} + \varepsilon v \frac{\partial c_i}{\partial z} = \varepsilon D_L \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} - (1 - \varepsilon) \frac{\partial c_{s,i}}{\partial t} \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.13$$

È importante notare che il coefficiente di dispersione assiale  $D_L$  può non dipendere dal soluto considerato. A rigore la dispersione assiale comprende gli effetti della dispersione molecolare e della dispersione vorticoso. In prima approssimazione i contributi di questi due fenomeni è additiva, e il coefficiente di dispersione assiale può essere espresso come [3]:

$$D_L = \gamma D_m + \alpha v \quad 5.14$$

dove  $D_m$  è il coefficiente di diffusione molecolare,  $\gamma$  dipende dalla geometria e dalla velocità interstiziale ed il coefficiente  $\alpha$  è una costante geometrica caratteristica del sistema. Il coefficiente di diffusione molecolare per proteine di grandi dimensioni è tale che il primo termine a destra nella 5.14 è trascurabile rispetto al secondo [17], per cui risulta:

$$D_L = \alpha v \quad 5.15$$

e si ha l'indipendenza del coefficiente di dispersione assiale dalla specie considerata. Il fattore  $\alpha$  è molto importante, e solitamente viene indicato come coefficiente di dispersività.

Bisogna notare che il tipo di equazione di trasporto è indipendente dalla fase del processo cromatografico considerata, poiché al variare della fase cambia solo il termine di interazione con i siti attivi. Pertanto sarà sempre utilizzata la 5.12 (o la 5.13) per le fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione.

All'equazione di bilancio bisogna associare un'opportuna equazione cinetica capace di descrivere il meccanismo di reazione tra biomolecola e ligando immobilizzato sul supporto.

## 5.1.2 Fase di adsorbimento

L'adsorbimento è il risultato di forze di legame tra la biomolecola e il supporto cromatografico. Tali forze possono essere di svariati tipi, come ad esempio forze elettrostatiche, forze di London e di van der Waals e interazioni idrofobiche [18].

I primi studi fatti in materia risalgono all'inizio del secolo scorso da Langmuir, che propose un modello per l'adsorbimento di gas su superfici solide [19]. Nonostante l'età e il diverso campo di applicazione considerato in origine, questo modello risulta essere estremamente attuale, e in letteratura l'adsorbimento di una biomolecola su una matrice di affinità è spesso descritto proprio dal modello di Langmuir [20, 21, 22].

In alcuni sistemi il meccanismo di reazione da rappresentare non verifica le ipotesi su cui si basa il modello di Langmuir, l'esempio tipico è quello dell'adsorbimento eterogeneo. Nel corso degli anni sono state proposte altre equazioni cinetiche per descrivere i sistemi adsorbenti che si discostano dal modello di Langmuir; tra queste si ricordano i modelli di Freundlich [23], di Redlich e Peterson [24], di Dubinin e Radushkevich [25] e di Toth [26]. Le generalità di diverse utili isoterme sono state riassunte da Sorci [18] e da Suen [27].

Altri autori hanno proposto cinetiche di adsorbimento che prendono in considerazione gli effetti derivanti dall'impedimento sterico [28, 29] e dal cambio di conformazione della biomolecola una volta adsorbita sul supporto [29, 30].

Arve e Liapis [31] hanno postulato la possibilità di un'interazione multivalente tra la proteina d'interesse e uno o più ligandi tra loro adiacenti. Inoltre hanno ampiamente trattato l'adsorbimento multicomponente in condizioni competitive.

Nel caso della cromatografia convenzionale con resine impaccate la formazione del complesso soluto – ligando è spesso più veloce rispetto la diffusione della biomolecola attraverso i pori. Di conseguenza è pratica assai comune considerare la reazione di adsorbimento all'equilibrio, e viene quindi trascurata la cinetica di reazione rispetto ai fenomeni di trasporto [32, 33, 34]. Nel caso della cromatografia con membrane si ha spesso la situazione opposta, e la cinetica di adsorbimento potrebbe essere il fenomeno controllante dell'intero processo [15], per cui risulta imperativa la ricerca di un'equazione cinetica che descriva dettagliatamente la reazione di adsorbimento.

### 5.1.2.1 Modello di Langmuir

Il modello di Langmuir suppone che l'interazione tra proteina e ligando sia monovalente, che il legame sia reversibile e che non ci siano interazioni tra le molecole già adsorbite. Inoltre si ipotizza che il supporto sia omogeneo, ovvero che in tutte le interazioni sia coinvolta la stessa energia di legame. Sotto queste ipotesi si può formulare la seguente reazione:



Il bilancio di materia associato all'eq. 5.16 per la proteina adsorbita sulla membrana può essere scritto come somma di due termini: uno relativo alla reazione di formazione del complesso proteina-ligando (reazione di adsorbimento) ed uno relativo alla sua scissione (reazione di desorbimento).

Dal momento che la formazione del complesso proteina-ligando dipende direttamente dall'interazione della proteina con il supporto, sembra ragionevole supporre che la velocità della reazione di adsorbimento dipenda linearmente dalla concentrazione di proteina in soluzione. Inoltre, poiché una biomolecola non può interagire con un sito di legame già occupato da altre proteine, la velocità dell'adsorbimento deve essere proporzionale anche alla concentrazione di siti di legame liberi. Combinando questi due effetti si ottiene la seguente equazione del secondo ordine:

$$R_a = k_a c(c_l - c_s) \quad 5.17$$

dove  $R_a$  rappresenta la velocità della reazione di adsorbimento,  $c$  è la concentrazione locale di proteina ad un generico istante di tempo,  $c_s$  è la corrispondente concentrazione di proteina immobilizzata sul supporto,  $c_l$  è la concentrazione di ligando equivalente alla capacità massima di adsorbimento della membrana e  $k_a$  è la costante cinetica della reazione di adsorbimento.

Considerazioni analoghe si possono fare per la reazione di desorbimento, la cui velocità si suppone proporzionale alla concentrazione di proteina sulla membrana, e quindi si può scrivere la seguente equazione del primo ordine:

$$R_d = k_d c_s \quad 5.18$$

dove  $R_d$  rappresenta la velocità della reazione di desorbimento,  $k_d$  è la relativa costante cinetica e  $c_s$  ha il medesimo significato della 5.17.

Considerando globalmente la reazione, ovvero accoppiando le due velocità della reazione diretta ed inversa, si ottiene:

$$\frac{dc_s}{dt} = k_a c(c_l - c_s) - k_d c_s \quad 5.19$$

In condizioni di equilibrio le velocità delle due reazioni, diretta ed inversa, si eguagliano, pertanto:

$$k_a c(c_l - c_s) = k_d c_s \quad 5.20$$

da cui con semplici passaggi si ricava la concentrazione di proteina adsorbita:

$$c_s = \frac{c_l c}{K_d + c} \quad 5.21$$

L'equazione 5.21 rappresenta l'isoterma di adsorbimento secondo il modello di Langmuir. Il parametro  $K_d$  è la costante di dissociazione di Langmuir ed è pari al rapporto tra la costante cinetica di desorbimento e di adsorbimento:

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} \quad 5.22$$

Il modello cinetico di Langmuir contiene tre parametri,  $c_l$ ,  $K_d$  e  $k_a$ , mentre è capace di descrivere l'equilibrio di adsorbimento mediante due soli parametri,  $c_l$  e  $K_d$ . Questi possono essere facilmente calcolati a partire da dati di equilibrio, minimizzando la somma degli errori quadratici calcolati tra il risultato del modello



e i dati sperimentali. In alternativa, si può ricorrere ad una rappresentazione lineare della 5.21, di cui citiamo la forma più famosa proposta da Scatchard [35]:

$$\frac{c_s}{c} = -\frac{c_s}{K_d} + \frac{c_l}{K_d} \quad 5.23$$

in cui la retta è riportata con ordinata  $c_s/c$  e ascissa  $c_s$ , con coefficiente angolare  $-1/K_d$  e ordinata all'origine  $c_l/K_d$ .

### 5.1.2.2 Semplificazioni del modello di Langmuir

Nel caso in cui la concentrazione dei ligandi sia molto più grande rispetto alla concentrazione di proteina in soluzione si può supporre che il numero di siti attivi occupati sia trascurabile rispetto il totale dei siti di legame, quindi:

$$c_l - c_s \cong c_l \quad 5.24$$

Inglobando la capacità massima,  $c_l$ , nella costante cinetica di reazione si ottiene la seguente equazione cinetica reversibile del primo ordine:

$$\frac{dc_s}{dt} = k_a'c - k_d c_s \quad 5.25$$

Questa cinetica è spesso usata nei sistemi a scambio ionico data l'alta densità di ligando che caratterizza tali supporti [36, 37]. Nel caso di alimentazioni complesse in cui le impurità non competono con i siti di legame, l'equazione 5.25 può descrivere le interazioni di tipo non specifico tra i contaminanti presenti in soluzione e la fase stazionaria [2].

In condizioni di equilibrio la 5.25 si riduce ad una semplice correlazione lineare tra la concentrazione di soluto nella fase mobile e quella nella fase stazionaria:

$$c_s = \frac{c}{K_d} = K_a c \quad 5.26$$

dove  $K_a$  è la costante di associazione di Langmuir, equivalente al reciproco della costante di dissociazione  $K_d$ .

### 5.1.2.3 Modello bi-Langmuir

In alcuni sistemi sperimentali è stato osservato un tipo di adsorbimento più complesso, in cui la biomolecola interagisce con più siti di legame diversi tra loro

[11]. In generale, ogni sito è caratterizzato da una specifica energia di legame e da un meccanismo di attacco differente.

Se si considera che esistano solo due siti di legame e che la proteina di interesse interagisca con ognuno di questi secondo il meccanismo teorizzato da Langmuir, si può formulare il modello bi-Langmuir [38, 39]. In questo caso, la concentrazione di proteina complessivamente adsorbita sul supporto,  $c_s$ , è composta dalla somma delle concentrazioni relative a ciascun sito di legame,  $c_{s,1}$  e  $c_{s,2}$ :

$$c_s = c_{s,1} + c_{s,2} \quad 5.27$$

dunque, il termine generativo della 5.12 deve essere riscritto tenendo conto delle due velocità di reazione:

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = \frac{\partial c_{s,1}}{\partial t} + \frac{\partial c_{s,2}}{\partial t} \quad 5.28$$

L'interazione della proteina con i due siti di legame è caratterizzato da diversi parametri cinetici ( $k_a$  e  $k_d$ ) e termodinamici ( $K_d$  e  $c_l$ ), quindi per ogni sito può essere riscritta l'equazione cinetica 5.19 nell'analogia forma:

$$\frac{dc_{s,i}}{dt} = k_{a,i}c(c_{l,i} - c_{s,i}) - k_{d,i}c_{s,i} \quad \text{dove } i=1,2 \quad 5.29$$

Accoppiando la 5.27 con le isoterme di equilibrio per i due siti di legame, si ottiene l'isoterma di equilibrio per il modello bi-Langmuir,

$$c_s = \frac{c_{l,1}c}{K_{d,1} + c} + \frac{c_{l,2}c}{K_{d,2} + c} \quad 5.30$$

#### 5.1.2.4 Modello di Langmuir per soluzioni multicomponente

Come già detto nel primo capitolo, a partire da una miscela complessa si può purificare una particolare biomolecola sfruttando l'alta specificità che questa mostra nei confronti di uno specifico ligando. I contaminanti presenti in soluzione possono essere classificati in tre gruppi, a seconda del tipo di interazione con il supporto:

- soluti che non interagiscono in alcun modo con la fase stazionaria. Questi sono trasportati attraverso il mezzo poroso dal flusso dell'alimentazione ma non sono adsorbiti in alcun modo;

- impurità che vengono adsorbite in maniera non specifica dal supporto. In questo caso le interazioni possono essere descritte dalla 5.25;
- contaminanti che competono con la biomolecola di interesse per il sito attivo del ligando.

Se le prime due classi di impurità sono facilmente allontanate durante la fase di lavaggio, la terza classe di contaminanti può rappresentare un serio problema per il raggiungimento di elevate purezze della sostanza d'interesse.

Nel caso di adsorbimento competitivo, il numero di siti di legame liberi è pari alla differenza dei ligandi totali e quello dei siti già occupati sia da un legame con la biomolecola di interesse sia da un contaminante. Se  $n$  è il numero di soluti che competono per l'attacco ai ligandi presenti, la cinetica di reazione per la specie  $i$ -esima può essere espressa come:

$$\frac{dc_{s,i}}{dt} = k_{a,i}c_i \left( c_l - \sum_{i=1}^n c_{s,i} \right) - k_{d,i}c_{s,i} \quad \text{dove } i=1,2,\dots,n \quad 5.31$$

che in condizioni di equilibrio conduce alla forma dell'isoterma di Langmuir multicomponente:

$$c_{s,i} = \frac{K_{a,i}c_l c_i}{1 + \sum_{j=1}^n K_{a,j}c_j} \quad \text{dove } i=1,2,\dots,n \quad 5.32$$

dove  $K_{a,i}$  è la costante di associazione di Langmuir relativa al componente  $i$ -esimo.

Una forma leggermente diversa rispetto alla cinetica espressa dalla 5.31 suppone che anche la capacità massima dipenda dalla specie considerata [40], quindi  $c_l$  è sostituito con  $c_{l,i}$ . Questa particolare cinetica non soddisfa la consistenza termodinamica, quindi deve essere applicata solo come pura correlazione tra i dati e senza validità generale, anche se in letteratura è stata comunque usata con discreto successo [27, 41].

### 5.1.2.5 Condizioni iniziali e al contorno associate alla fase di adsorbimento

Il bilancio di materia rappresentato dalla 5.12 (o dalla 5.13) accoppiato ad un'opportuna equazione cinetica per la fase di adsorbimento rappresenta un sistema di due equazioni differenziali alle derivate parziali non lineare. Affinché si possa determinare la soluzione unica del problema si devono specificare le condizioni iniziali e al contorno.

Le condizioni iniziali impongono che all'avvio del ciclo cromatografico sia la proteina di interesse sia gli eventuali contaminanti siano assenti nella fase mobile e nella fase stazionaria:

$$c_i = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = 0 \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.33$$

$$c_{s,i} = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = 0 \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.34$$

Le condizioni al contorno più usate sono quelle di Danckwerts [42], che considerano la diffusione assiale all'ingresso della membrana e il miscelamento in uscita:

$$\varepsilon v c_i - \varepsilon D_L \frac{\partial c_i}{\partial z} = \varepsilon v c_{in,i} \quad \text{per } z = 0, \quad t > 0 \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.35$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial z} = 0 \quad \text{per } z = L, \quad t > 0 \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.36$$

Va notato che nella 5.35, contrariamente a quanto spesso riportato in letteratura [43, 44], la concentrazione in ingresso al modulo cromatografico non è la concentrazione di soluto nella soluzione alimentata all'impianto,  $c_0$ , bensì è la concentrazione reale, indicata con  $c_{in,i}$ , che è il risultato dei fenomeni di dispersione nei volumi a monte della colonna cromatografica (si veda § 5.1.1.1). È infatti estremamente importante inserire le giuste condizioni al contorno per una corretta descrizione del sistema ed evitare errori grossolani [3].

### 5.1.3 Fase di lavaggio

Nella pratica comune delle separazioni cromatografiche di affinità, la fase di lavaggio è eseguita con un tampone che presenta caratteristiche simili a quello usato nella fase di adsorbimento. Ne consegue che, da un punto di vista teorico, la cinetica di reazione nella fase di lavaggio è identica a quella considerata nella fase di adsorbimento.

In letteratura pochi autori hanno considerato questa fase cromatografica, e la maggior parte dei lavori disponibili sono riferiti a sistemi con resine convenzionali [2, 31, 45]. Quasi tutte le trattazioni fanno leva sull'uguaglianza delle caratteristiche delle fasi mobili di adsorbimento e lavaggio, e assumono che la cinetica di reazione sia la stessa indipendentemente da quale delle due fasi sia analizzata.

Nel 1994 Suen e Etzel hanno proposto una diversa cinetica nella fase di lavaggio [46] supponendo che la proteina adsorbita sul supporto non interagisca con la fase mobile e quindi rimanga costante durante il lavaggio, in formule:

$$\frac{dc_s}{dt} = 0 \quad 5.37$$

Nel loro studio, Suen e Etzel hanno considerato due soluti: chimosina e pepsina. Il modello che considera la reazione di adsorbimento – desorbimento nella fase di lavaggio non è in grado di descrivere i dati sperimentali in nessuno dei due casi, sovrastimando la concentrazione in uscita dalla colonna a causa della dissociazione della proteina dal supporto. In assenza di reazione, il modello è in ottimo accordo nel caso della pepsina e sottostima leggermente i dati sperimentali nel caso della chimosina. Non è fornita nessuna spiegazione per motivare questo comportamento che, anche se descrive quanto osservato, appare alquanto anomalo.

Questo fenomeno è stato giustificato in altri lavori introducendo la possibilità di isteresi tra la fase di adsorbimento e desorbimento (lavaggio) dovuta ad un meccanismo di reazione a più stadi [47] o alla formazione di complessi più stabili [48].

Nel caso di sistemi multicomponenti possono essere scelte diverse cinetiche di lavaggio, a seconda delle interazioni che interessano la specie  $i$ -esima.

### 5.1.3.1 Condizioni iniziali e al contorno associate alla fase di lavaggio

Dopo un tempo  $t_w$  ritenuto sufficiente per la fase di adsorbimento ha inizio la fase di lavaggio. Se l'adsorbimento è terminato nel punto di breakthrough, ovvero quando non tutta la capacità della colonna è stata sfruttata, le concentrazioni di proteina nella fase mobile e nella fase stazionaria avranno un determinato profilo lungo la coordinata assiale  $z$ . Nel caso multicomponente, anche le impurità presenti nell'alimentazione avranno un ben determinato profilo di concentrazione lungo la direzione assiale. Le condizioni iniziali possono essere espresse come:

$$c_i = p_i(z) \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_w \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.38$$

$$c_{s,i} = q_i(z) \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_w \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.39$$

dove  $p_i$  e  $q_i$  sono le funzioni che descrivono il profilo di concentrazione della specie  $i$ -esima rispettivamente nella fase mobile e nella fase stazionaria all'inizio del lavaggio. Tali funzioni sono le soluzioni di  $c_i(z)$  e  $c_{s,i}(z)$  del modello usato nella fase di adsorbimento al tempo  $t_w$ ,

Se invece la fase di adsorbimento è terminata dopo un tempo sufficiente per saturare la colonna, si può ritenere che siano state raggiunte le condizioni di equilibrio e quindi le condizioni iniziali sono così semplificate:

$$c_i = c_{0,i} \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_w \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.40$$

$$c_{s,i} = a_i(c_{0,i}) \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_w \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.41$$

dove  $a_i(c)$  è la funzione che descrive l'isoterma di equilibrio relativa al meccanismo di reazione scelto nella fase di adsorbimento per il componente  $i$ -esimo.

Nella fase di lavaggio le condizioni al contorno sono praticamente identiche a quelle già presentate nel § 5.1.2.5 per la fase di adsorbimento:

$$\varepsilon v c_i - \varepsilon D_L \frac{\partial c_i}{\partial z} = \varepsilon v c_{in,i} \quad \text{per } z = 0, \quad t > t_w \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.42$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial z} = 0 \quad \text{per } z = L, \quad t > t_w \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.43$$

Anche in questa sede si fa notare che a causa della dispersione nei volumi esterni alla colonna cromatografica la concentrazione in ingresso alla colonna non è zero ma  $c_{in}$  (si veda § 5.1.1.1), nonostante la concentrazione di proteina in ingresso all'impianto cromatografico sia nulla.

### 5.1.4 Fase di eluizione

Nella fase di eluizione le caratteristiche del tampone utilizzato sono tali da permettere la distruzione del complesso proteina – ligando e quindi il recupero della biomolecola purificata. La cinetica di reazione da considerare in questo stadio deve tenere conto delle nuove interazioni del soluto tra fase mobile e fase stazionaria.

Come per il lavaggio, anche per la fase di eluizione gli studi disponibili in letteratura sono molto più limitati rispetto a quelli relativi all'adsorbimento, nonostante l'eluizione sia una fase cruciale per l'intero processo cromatografico. In particolare per sistemi con membrane gli studi a disposizione sono molto scarsi.

Gli studi teorici condotti su resine hanno proposto diverse soluzioni per descrivere il meccanismo di distruzione del legame biospecifico.

Arnold e collaboratori [2] hanno considerato il caso in cui la velocità della reazione di eluizione è più bassa rispetto alla velocità caratteristica degli altri fenomeni in gioco, e dunque il distacco della proteina dalla matrice è lo stadio

controllante nella fase di eluizione. L'equazione cinetica coincide con il modello di Langmuir, in cui però i parametri cinetici e termodinamici sono diversi rispetto a quelli relativi alle fasi di adsorbimento e lavaggio.

Un approccio razionale è quello di determinare la dipendenza di  $K_d$  e  $q_m$  dalle condizioni di pH e forza ionica del mezzo. In questo modo si descrive il cambiamento della forza e del tipo di interazione durante la fase di eluizione con parametri di derivazione sperimentale [45].

Arve e Liapis [49] hanno fornito una trattazione molto accurata della fase di eluizione, considerando diverse equazioni cinetiche per descrivere il meccanismo della reazione di desorbimento. Nel caso di eluizione non specifica si deve ritenere che l'interazione tra proteina e ligando sia distrutta solo quando la concentrazione di eluente<sup>3</sup>,  $c_{eluente}$ , raggiunge una data soglia critica,  $c_{eluente}^{crit}$ . Una volta che questo limite viene oltrepassato ha inizio il desorbimento della proteina.

Tre diversi meccanismi di desorbimento sono proposti: uno, già visto, assume un meccanismo reversibile del secondo ordine come da modello di Langmuir:

$$\frac{dc_s}{dt} = k_e^1 c(c_l - c_s) - k_e^2 c_s \quad \text{se} \quad c_{eluente} \geq c_{eluente}^{crit} \quad 5.44$$

dove  $k_e^1$  e  $k_e^2$  rappresentano rispettivamente la costante cinetica della reazione diretta e della reazione inversa nella fase di eluizione.

Un altro meccanismo considera che sia presente la sola reazione di desorbimento, quindi:

$$\frac{dc_s}{dt} = -k_e c_s \quad \text{se} \quad c_{eluente} \geq c_{eluente}^{crit} \quad 5.45$$

dove  $k_e$  è la costante cinetica della reazione di eluizione.

La terza equazione cinetica suppone invece che, una volta superata la soglia critica, la concentrazione di proteina adsorbita sul supporto sia istantaneamente nulla:

$$c_s = 0 \quad \text{se} \quad c_{eluente} \geq c_{eluente}^{crit} \quad 5.46$$

Questo è il caso di reazione di desorbimento irreversibile ed infinitamente veloce.

In uno studio condotto su membrane a scambio ionico, Sarfert ed Etzel [10] hanno supposto che la cinetica di eluizione sia istantanea ed irreversibile, in cui il legame di affinità viene distrutto non appena il tampone di eluizione attraversa la

---

<sup>3</sup> La concentrazione di eluente può essere espressa in termini di concentrazione di ioni  $H^+$  od  $OH^-$  nel caso di cambio di pH, in termini di concentrazione di ioni disciolti se si modifica la forza ionica, ecc.

colonna. Quest'ipotesi è tradotta matematicamente con una costante di dissociazione di Langmuir prossima ad infinito:

$$\lim_{K_d \rightarrow \infty} c_s = \lim_{K_d \rightarrow \infty} \left( \frac{c_1 c}{K_d + c} \right) = 0 \quad 5.47$$

In assenza di fenomeni di trasporto diversi dalla convezione, il risultato di quest'ipotesi è una funzione di Dirac, ovvero un picco di eluizione di larghezza nulla e altezza infinita, corrispondente all'uscita della prima goccia di tampone di eluizione dalla colonna. L'allargamento del picco di eluizione è imputato ad un coefficiente globale di trasporto di materia il cui effetto è quello di rallentare l'uscita del soluto dalla colonna.

In un recente studio condotto su membrane di affinità [16], la fase di eluizione è stata descritta secondo un approccio molto simile rispetto quello proposto da Sarfert ed Etzel. I risultati ottenuti sono in ottimo accordo con i dati sperimentali, tuttavia gli autori hanno completamente trascurato il fenomeno della dispersione nei volumi esterni alla colonna. Per tener conto del ritardo dovuto ai volumi morti, i risultati del modello sono arbitrariamente traslati lungo l'asse dei tempi, mentre gli effetti della miscelazione sono inclusi nel coefficiente globale di trasporto di materia.

Per sistemi multicomponenti possono essere scelte diverse cinetiche di eluizione, una per ogni specie ancora adsorbita sul supporto alla fine della fase di lavaggio.

#### 5.1.4.1 Condizioni iniziali e al contorno associate alla fase di eluizione

Dopo la fase di lavaggio, al tempo  $t_e$  si inizia ad alimentare all'impianto un appropriato tampone di eluizione per il recupero della proteina di interesse. Per sistemi multicomponenti, anche i competitori sono ancora adsorbiti specificamente sul supporto. Nel caso più generale inoltre, la fase di lavaggio potrebbe terminare prima che la concentrazione dei contaminanti legati non specificamente sia nulla. Infatti una fase di lavaggio lunga potrebbe causare un'eccessiva dissociazione della biomolecola di interesse dal supporto e dunque una sua perdita non ammissibile; in alcuni casi questo problema può essere limitato eseguendo una serie di brevi lavaggi [31]. In questo caso, alla fine della fase di lavaggio le concentrazioni delle specie presentano un determinato profilo lungo la colonna, tradotto in formule:

$$c_i = r_i(z) \quad \text{per } z \geq 0 \quad , \quad t = t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.48$$



$$c_{s,i} = s_i(z) \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.49$$

dove  $r_i$  e  $s_i$  sono le funzioni che descrivono rispettivamente il profilo di concentrazione nella fase mobile e nella fase stazionaria all'inizio dell'eluizione. Tali funzioni sono le soluzioni di  $c_i(z)$  e  $c_{s,i}(z)$  del modello usato nella fase di lavaggio al tempo  $t_e$ ,

Le relazioni 5.48 e 5.49 sono del tutto generali, ma nei casi pratici possono essere notevolmente semplificate. Per sistemi con alta affinità ad esempio, le molecole adsorbite non sono influenzate durante il lavaggio (eq. 5.37), e le condizioni iniziali possono essere riscritte come segue:

$$c_i = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.50$$

$$c_{s,i} = a_i(c_{0,i}) \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.51$$

Da notare che la 5.51 è formalmente identica alla 5.41, in quanto la concentrazione di proteina adsorbita sul supporto non è variata in seguito alla fase di lavaggio.

Per molti sistemi di affinità nella fase di eluizione non si riesce a recuperare tutta la proteina adsorbita, ma solo una quota parte quantificabile per integrazione del picco di eluzione. Dividendo la massa eluita per il volume solido delle membrane si ottiene la concentrazione media di proteina che può desorbire, nelle condizioni considerate,  $c_{s,i}^{elu}$ . Dunque nella condizione iniziale 5.51 risulta spesso opportuno sostituire la concentrazione totale di proteina adsorbita valutata dall'isoterma,  $a_i(c_{0,i})$ , con la sola frazione di proteina che sperimentalmente è stata recuperata,  $c_{s,i}^{elu}$ :

$$c_{s,i} = c_{s,i}^{elu} \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.52$$

Nella fase di eluizione le condizioni al contorno sono leggermente diverse rispetto quelle già proposte nei § 5.1.2.5 e 5.1.3.1. L'impianto cromatografico è supposto privo di biomolecole negli elementi esterni alla colonna, quindi la concentrazione in ingresso al modulo è effettivamente pari a zero; la condizione in uscita invece è la stessa.

$$\epsilon v c_i - \epsilon D_L \frac{\partial c_i}{\partial z} = 0 \quad \text{per } z = 0, \quad t > t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.53$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial z} = 0 \quad \text{per } z = L, \quad t > t_e \quad \text{dove } i = 1, 2, \dots, n \quad 5.54$$

Prima di concludere bisogna osservare che, affinché la trattazione esposta abbia senso, la concentrazione di eluente costituisce una variabile aggiuntiva nel problema. Pertanto deve essere scritta una opportuna equazione di bilancio per l'eluente, del tutto simile alla 5.12, in cui però è assente il termine generativo. In questo modo è possibile valutare se localmente la concentrazione di eluente è superiore alla soglia critica e dunque quando ha inizio l'eluizione. Le condizioni iniziali ed al contorno da scrivere per l'eluente sono le seguenti:

$$c_{\text{eluente}} = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = t_e \quad 5.55$$

$$\epsilon v c_{\text{eluente}} - \epsilon D_L \frac{\partial c_{\text{eluente}}}{\partial z} = c_{\text{eluente}}^{\text{in}} \quad \text{per } z = 0, \quad t > t_e \quad 5.56$$

$$\frac{\partial c_{\text{eluente}}}{\partial z} = 0 \quad \text{per } z = L, \quad t > t_e \quad 5.57$$

in cui  $c_{\text{eluente}}^{\text{in}}$  rappresenta la concentrazione di eluente in ingresso al modulo e tiene conto degli effetti della dispersione secondo la 5.10.

Una notevole semplificazione del problema può essere ottenuta nel caso in cui venga trascurata la dispersione assiale nella colonna e la concentrazione critica sia istantaneamente raggiunta non appena l'eluente entra in contatto con il supporto. Sotto queste ipotesi è possibile sostituire il bilancio di materia per l'eluente con la seguente condizione

$$\frac{\partial c_{s,i}}{\partial t} = \begin{cases} 0 & \text{per } t < t_e + t_d + \frac{z}{v} \\ \epsilon_i(c_i, c_{s,i}) & \text{per } t \geq t_e + t_d + \frac{z}{v} \end{cases} \quad 5.58$$

dove  $\epsilon_i$  è l'equazione cinetica scelta per la fase di eluizione ed è tenuto in conto il ritardo dovuto alla dispersione nei volumi esterni alla colonna  $t_d$ .

### 5.1.5 Forme adimensionali e semplificate del modello di trasporto

Numerose forme adimensionali delle equazioni appena discusse sono presenti in letteratura. Per brevità, in questo lavoro di tesi sarà riportata quella che viene utilizzata più di frequente.

Limitando l'attenzione alla fase di adsorbimento, per un'alimentazione contenente solo la biomolecola di interesse, possono essere applicate le equazioni

5.12 e 5.19 accoppiate alle condizioni iniziali e al contorno 5.33 – 5.36. Queste possono essere adimensionalizzate introducendo i seguenti parametri:

$$\tau = \frac{t\nu}{L} \quad 5.59 \qquad c_{in}^* = \frac{c_{in}}{c_0} \quad 5.62 \qquad m = \frac{(1-\varepsilon)c_l}{\varepsilon c_0} \quad 5.65$$

$$\zeta = \frac{z}{L} \quad 5.60 \qquad c_s^* = \frac{c_s}{c_l} \quad 5.63 \qquad n = \frac{(1-\varepsilon)L}{\varepsilon \nu} c_l k_a \quad 5.66$$

$$c^* = \frac{c}{c_0} \quad 5.61 \qquad Pe = \frac{\nu L}{D_L} \quad 5.64 \qquad s = \frac{c_0}{K_d} \quad 5.67$$

dove  $Pe$  è il numero di Péclet assiale<sup>1</sup>,  $m$  è il fattore di saturazione<sup>2</sup>,  $n$  è il numero di unità di trasporto<sup>3</sup> ed  $s$  è il fattore di separazione<sup>4</sup>.

Sostituendo i gruppi adimensionali nelle equazioni 5.12 e 5.19 e nelle condizioni iniziali e al contorno 5.33 – 5.36 si ottiene il seguente sistema di equazioni:

$$\frac{\partial c^*}{\partial \tau} + \frac{\partial c^*}{\partial \zeta} = \frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 c^*}{\partial \zeta^2} - m \frac{\partial c_s^*}{\partial \tau} \quad 5.68$$

$$\frac{\partial c_s^*}{\partial \tau} = \frac{n}{m} c^* (1 - c_s^*) - \frac{n}{ms} c_s^* \quad 5.69$$

$$c^* = 0 \quad \text{per } \zeta \geq 0, \quad \tau = 0 \quad 5.70$$

$$c_s^* = 0 \quad \text{per } \zeta \geq 0, \quad \tau = 0 \quad 5.71$$

$$c^* - \frac{1}{Pe} \frac{\partial c^*}{\partial \zeta} = c_{in}^* \quad \text{per } \zeta = 0, \quad \tau > 0 \quad 5.72$$

$$\frac{\partial c^*}{\partial \zeta} = 0 \quad \text{per } \zeta = 1, \quad \tau > 0 \quad 5.73$$

<sup>1</sup>  $Pe$  esprime il rapporto tra la scala dei tempi caratteristici per la dispersione assiale,  $L^2/D_L$ , e per la convezione,  $L/\nu$ .

<sup>2</sup>  $m$  esprime il rapporto fra il massimo numero di moli adsorbibili sul solido ed il massimo numero di moli presenti nella fase mobile contenuta nei pori della membrana nel caso in cui la concentrazione di proteina in soluzione sia ovunque pari alla concentrazione dell'alimentazione.

<sup>3</sup>  $n$  esprime il rapporto tra la scala dei tempi caratteristici per la convezione,  $L/\nu$ , e per la reazione,  $1/(c_0 k_a)$ , moltiplicato per il numero adimensionale  $m$ .

<sup>4</sup>  $s$  esprime il rapporto tra la scala dei tempi caratteristici per la reazione di desorbimento,  $1/k_d$ , e per la reazione di adsorbimento,  $1/(c_0 k_a)$ .

Le equazioni del problema costituiscono un sistema di equazioni differenziali alle derivate parziali da risolvere simultaneamente, in cui la 5.69 è non lineare. Data la complessità delle equazioni non esiste una soluzione analitica di validità generale, anche se il problema può comunque essere risolto con metodi numerici. Sotto opportune condizioni, però, il sistema di equazioni si può semplificare notevolmente così da consentire una soluzione analitica.

### 5.1.5.1 Modello di Thomas

Le equazioni 5.68 – 5.73 possono essere notevolmente semplificate nel caso in cui sia possibile trascurare la dispersione assiale e la dispersione nei volumi esterni alla colonna<sup>5</sup>. Tali posizioni rendono il problema un caso molto particolare che è stato risolto analiticamente da Thomas [50], e la soluzione relativamente alla sezione di uscita è la seguente:

$$c^*(\zeta=1) = \frac{J(n/r, nT)}{J(n/r, nT) + [1 - J(n, nT/r)] \exp[(1 - 1/r)(n - nT)]} \quad 5.74$$

dove  $T$  rappresenta il volume in uscita dal modulo in termini adimensionali:

$$T = \frac{\varepsilon K_d r}{(1 - \varepsilon) c_l} (\tau - 1) \quad 5.75$$

mentre  $r$  è un'espressione alternativa del fattore di separazione pari a:

$$r = s + 1 \quad 5.76$$

e la funzione  $J$  è così definita:

$$J(x, y) = 1 - \exp(-y) \int_0^x \exp(-\psi) I_0(2\sqrt{\psi y}) d\psi \quad 5.77$$

in cui  $I_0$  è la funzione di Bessel modificata di ordine zero.

Suen ed Etzel [15] hanno dimostrato che per poter trascurare il termine dispersivo è sufficiente che il numero di Péclet assiale sia maggiore di quaranta.

---

<sup>5</sup> Ciò equivale a sostituire 1 al posto di  $c_m^*$  nella condizione al contorno 5.72.

## 5.2 Metodo dei momenti

Il metodo dei momenti è un potente strumento teorico utile per la determinazione di grandezze strutturali della colonna, come la porosità del mezzo, e dei parametri caratterizzanti i fenomeni coinvolti nei sistemi cromatografici, come il coefficiente di dispersione assiale ed il coefficiente di trasporto di materia. È stato per primo introdotto da Kubin [51] e Kučera [52] negli anni '70, e viene tuttora ampiamente usato [53, 54].

Il metodo dei momenti è stato inizialmente proposto per sistemi cromatografici convenzionali impaccati con resine porose, per cui si introdurrà la teoria sviluppata su questo tipo di supporti dopodiché saranno apportati i necessari adattamenti al caso della cromatografia di affinità con membrane.

### 5.2.1 Definizioni e generalità

Per definizione, il momento  $n$ -esimo del profilo di concentrazione in uscita da una colonna cromatografica in seguito ad un disturbo ad impulso è (momento di un picco cromatografico):

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t) t^n dt \quad 5.78$$

il momento  $n$ -esimo assoluto o normalizzato è:

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t) t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} \quad 5.79$$

ed infine il momento  $n$ -esimo centrale assoluto è:

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t) (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} \quad 5.80$$

Nel caso di isoterma lineare (eq. 5.26), attraverso calcoli laboriosi della soluzione del modello generale nel dominio di Laplace [3], è possibile ricavare un'espressione analitica dei primi cinque momenti. Le espressioni per i primi due momenti sono riportate di seguito:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon_c \delta_0 \quad 5.81$$

$$\bar{\mu}_2 = \frac{2L}{u} \varepsilon_c (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d) \quad 5.82$$

dove

$$\delta_0 = 1 + \frac{(1 - \varepsilon_c)}{\varepsilon_c} (\varepsilon_p + \rho_p K_a) \quad 5.83$$

$$\delta_{ax} = \frac{D_L}{u^2} \varepsilon_c^2 \delta_0^2 \quad 5.84$$

$$\delta_f = \frac{(1 - \varepsilon_c)}{\varepsilon_c} \frac{R_p}{3k_f} (\varepsilon_p + \rho_p K_a)^2 \quad 5.85$$

$$\delta_d = \frac{(1 - \varepsilon_c)}{\varepsilon_c} \frac{R_p^2}{15D_c} (\varepsilon_p + \rho_p K_a)^2 \quad 5.86$$

in cui  $\varepsilon_c$  è la porosità esterna della colonna<sup>6</sup>,  $\varepsilon_p$  e  $\rho_p$  sono rispettivamente la porosità e la densità del materiale di riempimento,  $R_p$  è il raggio delle particelle,  $k_f$  il coefficiente di trasporto di materia nello strato limite e  $D_c$  la diffusività effettiva all'interno dei pori della resina.  $D_L$  e  $K_a$  sono grandezze già incontrate e rappresentano il coefficiente di dispersione assiale e la costante di equilibrio di adsorbimento. I termini  $\delta_{ax}$ ,  $\delta_f$  e  $\delta_d$  sono rispettivamente i contributi al momento secondo centrale della dispersione assiale, il trasporto di materia nel film esterno alle particelle e la diffusione all'interno della resina.

Per i momenti di ordine maggiore le relazioni sono più complesse e possono essere reperite in letteratura [51, 52]. Non trovano comunque applicazione pratica a causa degli inevitabili errori commessi durante la loro valutazione a partire da dati sperimentali [3].

Il significato statistico dei momenti espressi dalle equazioni 5.81 e 5.82 è rispettivamente la media,  $\mu$ , e la varianza,  $\sigma^2$ , della distribuzione che coincide con il picco registrato in uscita. Da un punto di vista pratico, i momenti rappresentano il tempo di ritenzione del componente iniettato,  $t_r$ , e l'allargamento del fronte dei soluti legato all'efficienza della colonna cromatografica [55].

---

<sup>6</sup> Ovvero la porosità della colonna se la resina nella colonna non fosse porosa.

Una semplificazione del metodo dei momenti è costituita dal ben noto metodo dell'altezza equivalente ad un piatto teorico, HETP, proposto da van Deemter e collaboratori [56], in cui la colonna cromatografica è trattata analogamente ad una colonna di distillazione. Affinché la teoria dell'altezza equivalente ad un piatto teorico possa essere applicata, è indispensabile che il picco registrato in uscita dalla colonna sia approssimabile con una gaussiana [12]. Solo in questo caso il tempo di ritenzione, ovvero il momento primo, coincide con il tempo corrispondente all'altezza massima del picco, ed il momento secondo può essere valutato a partire dall'ampiezza del picco in corrispondenza dei flessi.

Il metodo dell'altezza equivalente ad un piatto teorico è semplice e rapido, e soprattutto molto accurato. Infatti, un'applicazione diretta della definizione di momento secondo centrale ai dati sperimentali, eq. 5.80, comporta spesso degli errori grossolani nella valutazione del momento secondo. La sorgente maggiore degli errori è legata all'interferenza del rumore sul segnale del rivelatore, che rende difficoltosa la scelta di dove concludere l'integrazione del picco per il calcolo dei momenti. Da notare che tanto più alto è l'ordine del momento considerato, tanto maggiori sono i contributi delle zone periferiche alla determinazione di tale momento [53]. Considerazioni numeriche mostrano che, per acquisire il 99% del momento di ordine zero e uno, l'integrazione deve essere eseguita nell'intervallo  $\mu_1 - 2.55\sigma \div \mu_1 + 2.55\sigma$ ; per computare il momento secondo con la stessa precisione, l'integrazione deve essere estesa all'intervallo  $\mu_1 - 3.35\sigma \div \mu_1 + 3.35\sigma$ . Alle estremità di tali intervalli il segnale è rispettivamente il 3.9% ed il 0.34% del massimo del picco. È necessario dunque che il rapporto tra il segnale ed il rumore<sup>7</sup> sia inferiore a 100 e 1000 rispettivamente, altrimenti il calcolo dei momenti non può essere considerato affidabile.

### 5.2.2 Applicazione del metodo dei momenti su sistemi cromatografici con membrane di affinità

Una membrana microporosa può essere schematizzata come una resina cromatografica in cui sono assenti i pori diffusivi. Di conseguenza la porosità delle particelle è nulla e la porosità esterna è uguale alla porosità totale della colonna,  $\varepsilon$ . Chiaramente il contributo di diffusione all'interno dei pori è assente, mentre quello per il trasporto di materia è trascurabile, come sarà dimostrato nel § 6.2.

Le equazioni 5.81 e 5.82 dunque si semplificano come segue:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon \left[ 1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \rho_m K_a \right] \quad 5.87$$

<sup>7</sup> In terminologia anglosassone signal to noise ratio, SNR.

$$\bar{\mu}_2 = 2L \frac{D_L}{u^3} \varepsilon^3 \left[ 1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \rho_m K_a \right]^2 \quad 5.88$$

Il metodo dei momenti potrebbe essere applicato a sistemi cromatografici con membrane per determinare la costante di equilibrio di associazione e le altre grandezze presenti nelle 5.87 e 5.88. Si potrebbe infatti eseguire un disturbo ad impulso con un campione, e calcolare i momenti primo e secondo dal profilo di concentrazione che si osserva in uscita dalla colonna. Purtroppo i legami di affinità sono caratterizzati da elevate costanti di equilibrio di associazione [57], per cui il campione introdotto sarebbe completamente trattenuto in colonna e non si registrerebbe nessun picco in uscita, vanificando la possibilità di applicare questo strumento.

Se però si esegue un impulso con un tracciante che non interagisce con la fase stazionaria ( $K_a = 0$ ), si possono stimare grandezze come il grado di vuoto delle membrane ed il coefficiente di dispersione assiale. Infatti, in condizioni non adsorbenti le equazioni 5.87 e 5.88 si semplificano ulteriormente:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon \quad 5.89$$

$$\bar{\mu}_2 = 2L \frac{D_L}{u^3} \varepsilon^3 \quad 5.90$$

Nei sistemi cromatografici con membrane è assai comune che i volumi degli elementi esterni siano confrontabili con quelli della colonna [10, 13, 29]; una trattazione completa deve tener conto anche della durata reale dell'iniezione del tracciante,  $t_p$ , che non può mai essere nulla come vorrebbe in teoria la funzione delta di Dirac. I momenti primo e secondo vengono corretti introducendo due fattori additivi [58] che tengono conto di tali deviazioni rispetto al caso ideale.

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon + \mu_1^{inj} + \mu_1^{sys} \quad 5.91$$

$$\bar{\mu}_2 = 2L \frac{D_L}{u^3} \varepsilon + \bar{\mu}_2^{inj} + \bar{\mu}_2^{sys} \quad 5.92$$

In teoria, per una iniezione rettangolare di durata  $t_p$ , i corrispondenti momenti primo e secondo sono:

$$\mu_1^{inj} = \frac{t_p}{2} \quad 5.93$$



$$\overline{\mu}_2^{inj} = \frac{t_p^2}{12} \quad 5.94$$

I momenti relativi al sistema devono invece essere determinati sperimentalmente escludendo la colonna cromatografica dal circuito. Questo metodo è piuttosto comodo ed intuitivo per la determinazione del tempo di permanenza, bisogna però fare sempre attenzione agli errori che si introducono durante l'elaborazione dei dati per la determinazione del momento secondo.

A causa dei contributi nei volumi esterni alla colonna, il picco in uscita è fortemente asimmetrico e non può essere approssimato da una gaussiana. Dunque il metodo dell'altezza equivalente ad un piatto teorico non è adeguato per descrivere i sistemi cromatografici con membrane e si deve per forza ricorrere alla più generale teoria dei momenti.

In assenza di fenomeni di adsorbimento ed a meno del contributo dell'iniezione, il momento primo rappresenta il tempo di riempimento del sistema cromatografico,  $\tau_r$ . Quando si applica il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (§ 7.1), può essere estremamente utile sfruttare questa informazione per determinare il volume totale del sistema tramite la semplice relazione:

$$V_{\text{sis}} = F \cdot \tau_r \quad 5.95$$

### 5.2.3 Estensione del metodo dei momenti per disturbi a gradino

La teoria dei momenti può essere anche applicata quando si esegue un disturbo a gradino anziché un'iniezione. Si ricorda infatti che un impulso può essere formalizzato con la funzione delta di Dirac, che equivale alla derivata della funzione gradino (o di Heavyside). Di conseguenza, la derivata del profilo di concentrazione in uscita dalla colonna a seguito di un disturbo a gradino rappresenta la risposta che il sistema darebbe se fosse eseguito un disturbo ad impulso.

Con questo artificio si esclude quindi il contributo della durata dell'iniezione ai momenti,  $\mu_1^{inj}$  e  $\overline{\mu}_2^{inj}$ . Bisogna comunque osservare che durante l'operazione di derivazione il rumore del segnale potrebbe risultare amplificato, con un conseguente aumento degli errori commessi nella determinazione dei momenti.

## Bibliografia

1. Tejada-Mansir, A., Montesinos, R. M., Guzmán, R., *Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **2001**, 49, 1–28.
2. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke. C. R., *Analysis of affinity separations I: predicting the performance of affinity adsorbers*, The Chemical Engineering Journal, **1985**, 30, B9–B23.
3. Guiochon, G., Felinger, A., Shirazi, D. G., Katti, A. M., *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, seconda edizione, **2006**, Elsevier Inc., San Diego, California.
4. Ghosh, R., *Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges*, Journal of Chromatography A, **2002**, 952, 13–27.
5. Giddings, J. C., *Dynamics of Chromatography. Part I. Principles and Theory*, **1965**, Marcel Dekker, Inc., New York.
6. Dullien F. A. L., *Porous media : fluid transport and pore structure*, seconda edizione, **1992**, Academic Press, San Diego, California.
7. Taylor, G., *Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube*, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, **1953**, 219, 186–203.
8. Aris, R., *On the Dispersion of a Solute in a Fluid Flowing through a Tube*, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, **1956**, 235, 67–77.
9. Carbonell, R. G., Whitaker, S., *Heat and Mass Transfer in Porous Media*, in: Bear, J., Corapcioglu, M. Y., *Fundamentals of Transport Phenomena in Porous Media*, **1984**, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 121–198.
10. Sarfert, F. T., Etzel, M. R., *Mass transfer limitations in protein separations using ion-exchange membranes*, Journal of Chromatography A, **1997**, 764, 3–20.
11. Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G. C., *Modelling ad simulation of affinity membrane adsorption*, Journal of Chromatography A, **2007**, 1162, 24–33.
12. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke. C. R., *Analysis of affinity separations II: the characterization of affinity column by pulse techniques*, The Chemical Engineering Journal, **1985**, 30, B25–B36.

13. Dimartino, S., *Modellazione dell'adsorbimento di proteine su membrane di affinità*, 2005, Tesi di laurea, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.
14. Etzel, M. R., *Layered Stacks*, in: Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z., *Monolithic Materials*, Journal of Chromatography Library, 2003, 67, 213–233.
15. Suen, S. Y., Etzel, M. R., *A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations*, Chemical Engineering Science, 1992, 47, 1355–1364.
16. Hao, W., Wang, J., Zhang, X., *Mass transfer kinetics and breakthrough and elution curves for bovine serum albumin using cibacron blue cellulose membranes*, Journal of Chromatography A, 2006, 1114, 123–131.
17. Miyabe, K., Guiochon, G., *Determination of the lumped mass transfer rate coefficient by frontal analysis*, Journal of Chromatography A, 2000, 890, 211–223.
18. Sorci, M., *Membrane di affinità per la purificazione di biomolecole*, 2006, Tesi di dottorato, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.
19. Langmuir, I., *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids*, Journal of the American Chemical Society, 1916, 38, 2221–2295.
20. Beeskow, T. C., Kusharyoto, W., Anspach, F. B., Kroner, K.H., Deckwer, W. D., *Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes*, Journal of Chromatography A, 1995, 715, 49–65.
21. Gebauer, K. H., Thömmes, J., Kula, M. R., *Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbers in protein chromatography*, Chemical Engineering Science, 1997, 52, 405–419.
22. Tscheliessnig, A., Hahn, R., Jungbauer, A., *In situ determination of adsorption kinetics of proteins in a finite bath*, Journal of Chromatography A, 2005, 1069, 23–30.
23. Shi, W., Zhang, F., Zhang, G., *Mathematical analysis of affinity membrane chromatography*, Journal of Chromatography A, 2005, 1081, 156–162.
24. Redlich, O., Peterson, D. L., *A useful adsorption isotherm*, The Journal of Physical Chemistry, 1959, 63, 1024.
25. Dubinin, M. M., *The potential theory of adsorption of gases and vapors for adsorbents with energetically non uniform surfaces*, Chemical Reviews, 1960, 60, 235–241.

26. Jossens, L., Prausnitz, J. M., Fritz, W., Schlünder, E. U., Myers, A. L., *Thermodynamics of multi-solute adsorption from dilute aqueous solutions*, Chemical Engineering Science, **1978**, 33, 1097–1106.
27. Suen, S. Y., *A comparison of isotherm and kinetic models for binary-solute adsorption to affinity membranes*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **1996**, 65, 249–257.
28. Jin, X., Talbot, J., Wang, N. H. L., *Analysis of steric hindrance effects on adsorption kinetics and equilibria*, AIChE Journal, **1994**, 40, 1685–1896.
29. Yang, H., Etzel, M. R., *Evaluation of three kinetic equations in models of protein purification using ion-exchange membranes*, Industrial Engineering and Chemistry Research, **2003**, 42, 890–896.
30. Lundström, I., *Models of protein adsorption on solid surfaces*, Progress in Colloid & Polymer Science, **1985**, 70, 76–82.
31. Arve, B. H., Liapis, A. I., *Modeling and analysis of biospecific adsorption in a Finite bath*, AIChE Journal, **1987**, 33, 179–193.
32. Yoshida, H., Kataoka, T., Ruthven, D. M., *Analytical solution of the breakthrough curve for rectangular isotherm systems*, Chemical Engineering Science, **1984**, 39, 1489–1497.
33. Horstmann, B. J., Chase, H. A., *Modelling the affinity adsorption of Immunoglobulin G to Protein A immobilized to agarose matrices*, Chemical Engineering Research and Design, **1989**, 67, 243–254.
34. Rainer, H., Bauerhansl, P., Shimahara, K., Wizniewski, C., Tscheliessnig, A., Jungbauer, A., *Comparison of protein A affinity sorbents II. Mass transfer properties*, Journal of Chromatography A, **2005**, 1093, 98–110.
35. Scatchard, G., *The attraction of proteins for small molecules and ions*, Annals of New York Academy of Sciences, **1949**, 51, 660–672.
36. Forrer, N., Butté, A., Morbidelli, M., *Chromatographic behavior of a polyclonal antibody mixture on a strong cation exchanger column. Part II: Adsorption modeling*, Journal of Chromatography A, **2008**, 1214, 71–80
37. Katsuo, S., Langel, C., Schanen, P., Mazzotti, M., *Extra-column dead volume in simulated moving bed separations: Theory and experiments*, Journal of Chromatography A, **2009**, 1216, 1084–1093.

38. Wang, G., De, J., Schoeniger, J. S., Roe, D. C., Carbonell, R. G., *A hexamer peptide ligand that binds selectively to staphylococcal enterotoxin B: isolation from a solid phase combinatorial library*, Journal of Peptide Research, 2004, 64, 51–64.
39. Wang, G., Carbonell, R. G., *Characterization of a peptide affinity support that binds selectively to staphylococcal enterotoxin B*, Journal of Chromatography A, 2005, 1078, 98–112.
40. Ruthven, D. M., *Principles of adsorption and adsorption processes*, 1984, Wiley, New York.
41. Gu, T., Tsai, G. J., Tsao, G. T., *Multicomponent adsorption and chromatography with uneven saturation capacities*, AIChE Journal, 1991, 37, 1333 – 1340.
42. Danckwerts, P. V., *Continuous flow systems : distribution of residence times*, Chemical Engineering Science, 1953, 2, 1–13.
43. Sridhar, P., *Design of affinity membrane bioseparations*, Chemical Engineering and Technology, 1996, 19, 398–404.
44. Ge, D., Shi, W., Ren, L., Zhang, F., Zhang, G., Zhang, X., Zhang, Q., *Variation analysis of affinity-membrane model based on Freundlich adsorption*, Journal of Chromatography A, 2006, 1114, 40–44.
45. He, L. Z., Dong, X. Y., Sun, Y., *Modeling and analysis of the affinity filtration process, including broth feeding, washing, and elution steps*, Biotechnology Progress, 1998, 14, 594–600.
46. Suen, S. Y., Etzel, M. R., *Sorption kinetics and breakthrough curves for pepsin and chymosin using pepstatin A affinity membranes*, Journal of Chromatography A, 1994, 686, 179–192.
47. Jennissen, H. P., *The binding and regulation of biologically active proteins on cellular interfaces: model studies of enzyme adsorption on hydrophobic binding site lattice and biomembranes*, Advances in Enzyme Regulation, 1980, 19, 377–406.
48. Lin, S., Blanco, R., Karger, B. L., *Adsorption–desorption isotherm hysteresis of  $\beta$ -lactoglobulin A with a weakly hydrophobic surface*, Journal of Chromatography, 1991, 557, 369–382.
49. Arve, B. H., Liapis, A. I., *Modeling and analysis of elution stage of biospecific adsorption in Finite bath*, Biotechnology and Bioengineering, 1988, 31, 240–249.

50. Thomas, H. C., *Heterogeneous ion exchange in a flowing system*, Journal of the American Chemical Society, **1944**, 66, 1664–1666.
51. Kubin, M., *Theory of the chromatography. II. Effect of the external diffusion and of the adsorption on the sorbent particle*, Collection of Czechoslovak Chemical Communications, **1965**, 30, 2900–2907.
52. Kučera, E., *Contribution to the theory of chromatography : Linear non-equilibrium elution chromatography*, Journal of Chromatography, **1965**, 19, 237–248.
53. Miyabe, K., Guiochon, G., *Measurement of the parameters of the mass transfer kinetics in high performance liquid chromatography*, Journal of Separation Science, **2003**, 26, 155–173.
54. Hong, H., Felinger, A., Kaczmarski, K., Guiochon, G., *Measurement of intraparticle diffusion in reversed phase liquid chromatography*, Chemical Engineering Science, **2004**, 59, 3399–3412.
55. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R., *Liquid chromatography plate height equations*, **1985**, Journal of Chromatography, 330, 159–166.
56. van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J., Klinkenberg, A., *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography*, Chemical Engineering Science, **1956**, 5, 271–289.
57. Klein, E., *Affinity membranes: their chemistry and performance in adsorptive separation processes*, **1991**, John Wiley & Sons, New York.
58. Sternberg, J. C., *Extracolumn contributions to chromatographic band broadening*, Advances in Chromatography, **1966**, 2, 205–270.

---

# CAPITOLO 6

---

## ANALISI MATEMATICA DEI MODELLI PROPOSTI

### Introduzione

Lo sviluppo dei modelli matematici riveste un ruolo di fondamentale importanza per una comprensione dettagliata della cromatografia con membrane di affinità. Un buon modello consente di descrivere la risposta del sistema considerato in modo predittivo, evitando l'esigenza di effettuare campagne sperimentali lunghe, delicate e costose.

Un'altra interessante applicazione dei modelli matematici è quella di poter esaminare l'importanza relativa dei diversi fenomeni chimici e fisici che intervengono nel processo di separazione.

A tal proposito, nel presente capitolo saranno approfonditi due aspetti particolarmente interessanti. In primis saranno discusse le conseguenze causate da una distribuzione della dimensione dei pori nel supporto e si proporrà una soluzione per limitare questo problema; inoltre verrà valutata l'influenza del trasporto di materia nello strato limite nella globalità del processo.

Infine sarà proposto un semplice metodo che consente di prendere in considerazione la dispersione nei volumi esterni alla colonna anche durante la fase di eluizione.

### 6.1 Modello con distribuzione della dimensione dei pori

Nel § 1.2.2.2 si è accennato al problema della distribuzione della dimensione dei pori nelle membrane, che può costituire una grave limitazione nelle applicazioni industriali di tali supporti. Una non uniformità nella dimensione dei pori della

membrana può causare una drastica caduta delle prestazioni della colonna cromatografica. Suen ed Etzel prima [1] e Liu e Fried in seguito [2] hanno studiato il problema partendo da due approcci diversi.

I primi hanno trattato il problema idealizzando i pori come una serie di sfere vuote di diametro fissato tra loro interconnesse. La colonna è stata suddivisa in settori con porosità variabile tra il 90% e il 110% della porosità media. Il diametro dei pori è supposto costante, quindi le variazioni di porosità sono rappresentate da valori diversi della superficie interna per unità di volume.

Liu e Fried hanno considerato una colonna costituita da  $n_m$  membrane sovrapposte, ciascuna delle quali ha un numero  $p$  di pori di diversa dimensione. L'approccio seguito è quello di creare  $p$  percorsi attraverso la colonna, ciascuno dei quali è composto da una successione casuale di  $n_m$  pori di diverse dimensioni.

L'approccio seguito in questo lavoro di tesi è diverso da quelli presenti in letteratura. In questo paragrafo sarà presentata la teoria sviluppata per descrivere il sistema e le corrispondenti equazioni caratteristiche e poi verranno riportati i risultati del modello più significativi.

### 6.1.1 Trattazione teorica

Uno studio di diverse membrane sovrapposte può essere eseguito solo dopo aver analizzato localmente una sola membrana. A tal proposito, si schematizza il mezzo poroso con pori cilindrici e paralleli tra loro di raggio  $r_p$ ; inoltre per ragioni di equilibrio le perdite di carico tra ingresso ed uscita,  $\Delta p$ , non dipendono dal poro considerato. Si suppone che la membrana sia caratterizzata da una porosità uniforme e densità volumetrica di ligando uniforme. Infine, il fluido ha viscosità  $\mu$  costante e scorre attraverso il poro di moto laminare.

La frazione di alimentazione che attraversa un poro della membrana interagirà con il supporto secondo delle equazioni simili a quelle presentate nel § 5.1 in cui è stato descritto il modello di trasporto. Come schematizzato in Figura 6.1, da ogni poro della membrana uscirà una soluzione con una portata  $F_i$  e una concentrazione  $c_i$ .

La concentrazione complessiva in uscita dalla membrana è determinata da una media pesata delle concentrazioni in uscita da ogni poro:

$$c(t) = \frac{\sum_{j=1}^p F_j c_j(t)}{\sum_{j=1}^p F_j} \quad 6.1$$



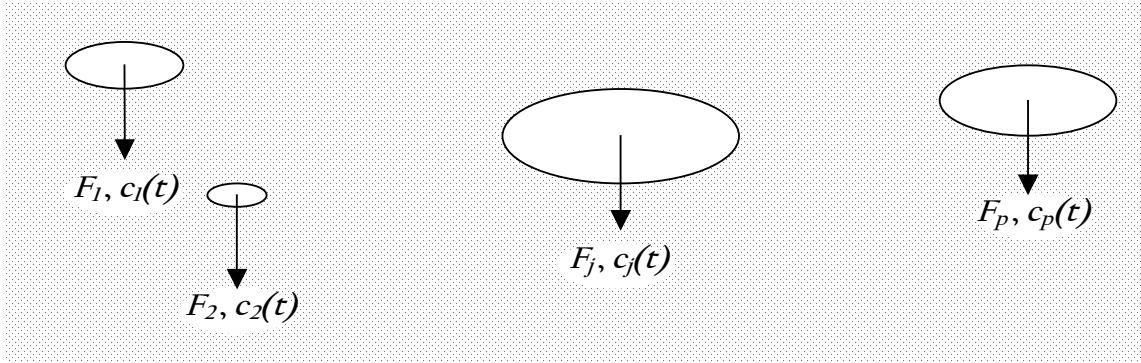


Figura 6.1: Rappresentazione semplificata della sezione di uscita di una membrana con pori di diverse dimensioni.

dove la portata e la concentrazione sono funzioni della dimensione del poro considerato. Per proseguire con la presente analisi è conveniente introdurre una funzione di distribuzione di probabilità normalizzata<sup>1</sup> per la dimensione caratteristica dei pori,  $f$ , che può essere una qualsiasi distribuzione che approssima bene i dati sperimentali di distribuzione della dimensione dei pori.

Con l'introduzione della funzione di distribuzione di probabilità della dimensione dei pori è possibile riscrivere la 6.1 ottenendo un'espressione più comoda per la stima della concentrazione uscente dalla membrana:

$$c(t) = \frac{\int_0^{+\infty} c(r_p, t) \cdot F(r_p) \cdot f(r_p) n_p dr_p}{F} = \frac{n_p \int_0^{+\infty} c(r_p, t) \cdot F(r_p) \cdot f(r_p) dr_p}{F} \quad 6.2$$

in cui il fattore  $f(r_p) \cdot dr_p$  è la frazione dei pori con dimensione compresa tra  $r_p$  e  $r_p + dr_p$ . Il numero totale di pori presenti nella membrana,  $n_p$ , può essere stimato a partire dal grado di vuoto della membrana,  $\varepsilon$ :

$$\varepsilon = \frac{V_{mem, vuoti}}{V_{mem, tot}} = \frac{\int_0^{+\infty} L \pi r_p^2 \cdot f(r_p) n_p dr_p}{S_t L} = \frac{\pi n_p \int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p}{S_t} \quad 6.3$$

da cui:

$$n_p = \frac{\varepsilon S_t}{\pi \int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p} \quad 6.4$$

<sup>1</sup> Condizione di normalizzazione:  $\int_0^{+\infty} f(r_p) dr_p = 1$

dove  $S_t$  è la sezione trasversale totale della membrana.

Per valutare l'espressione 6.2 è necessario definire la dipendenza della concentrazione e della portata dalla dimensione dei pori.

Per determinare la portata di soluzione che scorre all'interno di un poro di raggio  $r_p$  si può sfruttare l'ipotesi di moto laminare ed applicare la legge di Hagen – Poiseuille [3]:

$$F(r_p) = \frac{\Delta p \pi r_p^4}{8\eta L} \quad 6.5$$

Le perdite di carico,  $\Delta p$ , sono state supposte uniformi su tutta la sezione della membrana, per cui possono essere valutate una volta nota la portata totale:

$$F = \int_0^{+\infty} F(r_p) \cdot f(r_p) n_p dr_p = \frac{\Delta p \pi}{8\eta L} \int_0^{+\infty} r_p^4 \cdot f(r_p) n_p dr_p \quad 6.6$$

Dal rapporto tra la 6.5 e la 6.6 ed esplicitando il numero totale dei pori,  $n_p$ , si ottiene:

$$F(r_p) = F \frac{\pi r_p^4}{S_t \epsilon} \frac{\int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p}{\int_0^{+\infty} r_p^4 \cdot f(r_p) dr_p} \quad 6.7$$

La concentrazione in uscita dal singolo poro può essere valutata utilizzando le equazioni presentate nel § 5.1 in cui è stato descritto il modello di trasporto. I parametri che dipendono dalla dimensione del poro sono la velocità media,  $v$ , e la capacità di legame,  $c_l$ . La prima variabile è stimata con un semplice passaggio a partire dalla 6.7:

$$v(r_p) = \frac{F(r_p)}{\pi r_p^2} = \frac{F r_p^2}{S_t \epsilon} \frac{\int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p}{\int_0^{+\infty} r_p^4 \cdot f(r_p) dr_p} \quad 6.8$$

Per determinare la capacità massima di un poro si sfrutta l'ipotesi di membrana con densità volumetrica di ligando uniforme e porosità uniforme. La quantità totale di ligando presente nella membrana può essere determinata a partire dalla

capacità massima  $c_l$ , ricordando che questa è riferita all'unità di volume di solido della membrana:

$$m_l = c_l(1 - \varepsilon)V_{mem,tot} \quad 6.9$$

Una stima della densità di ligando teorica del supporto può essere compiuta solo se è nota l'area superficiale del mezzo poroso,  $A_S$ ; ancora una volta, se i pori sono supposti cilindrici e paralleli per integrazione della superficie interna di ogni poro si ottiene:

$$A_S = \int_0^{+\infty} 2\pi r_p L \cdot f(r_p) n_p dr_p = 2L\varepsilon S_t \frac{\int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p}{\int_0^{+\infty} r_p \cdot f(r_p) dr_p} \quad 6.10$$

da cui è possibile valutare la densità media di ligando superficiale,  $\rho_l$ , all'interno della membrana:

$$\rho_l = \frac{m_l}{A_S} \quad 6.11$$

La massa di ligandi presenti in un poro di raggio  $r_p$  è:

$$m_l(r_p) = \rho_l 2\pi r_p L = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} c_l L \pi r_p \frac{\int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p}{\int_0^{+\infty} r_p \cdot f(r_p) dr_p} \quad 6.12$$

Per definizione, la capacità di membrana,  $c_l$ , è riferita per unità di volume di membrana solida. Per trovare la capacità che corrisponde al singolo poro è necessario introdurre una grandezza ausiliaria che tenga conto del volume di solido che circonda il poro. Facendo nuovamente ricorso all'ipotesi di uniformità di porosità, si definisce il volume di membrana associata ad un poro,  $V_{mem,p}$ , funzione del raggio del poro  $r_p$ , come:

$$V_{mem,p}(r_p) = \frac{\pi r_p^2 L}{\varepsilon} \quad 6.13$$

Il volume di membrana associata ad un poro coincide con la somma del volume vuoto del poro più quello della quota parte di volume del solido che lo delimita. Il

volume di membrana equivalente ha lo stesso grado di vuoto del mezzo poroso,  $\varepsilon$ , infatti invertendo la 6.13 si ottiene:

$$\varepsilon = \frac{\pi r_p^2 L}{V_{mem,p}(r_p)} = \frac{V_{mem,vuoti}}{V_{mem,tot}} \quad 6.14$$

Si può facilmente dimostrare che l'integrale su tutti i pori del volume equivalente coincide con il volume totale della membrana.

Sfruttando il concetto di volume di membrana associata ad un poro è possibile valutare la capacità massima che corrisponde al poro di raggio  $r_p$ :

$$c_l(r_p) = \frac{m_l(r_p)}{(1-\varepsilon)V_{mem,p}(r_p)} = \frac{c_l \int_0^{+\infty} r_p^2 \cdot f(r_p) dr_p}{r_p \int_0^{+\infty} r_p \cdot f(r_p) dr_p} \quad 6.15$$

Da notare che la capacità massima è inversamente proporzionale alle dimensioni del poro. Infatti, nonostante la quantità di ligando sia proporzionale alla superficie interna, e quindi al raggio, l'area equivalente va con il quadrato delle dimensioni del poro.

Una volta note le caratteristiche in termini di velocità e capacità associate ad ogni poro, è possibile risolvere il modello di trasporto per determinare la concentrazione in uscita da ogni poro; infine applicando la 6.2 si determina la concentrazione media di proteina in uscita dalla colonna.

In Figura 6.2 è descritta la dipendenza della velocità interstiziale e della capacità massima dalle dimensioni del poro. Il decadimento delle prestazioni della membrana è dovuto al contributo sinergico di entrambi i fattori. Infatti, in un poro di piccole dimensioni la velocità interstiziale è bassa e la capacità è alta, quindi il tempo necessario per raggiungere le condizioni di saturazione è sicuramente maggiore rispetto ad un poro grande in cui la portata di fluido è alta e la capacità di legame è bassa. Complessivamente i pori grandi si saturano in fretta e la proteina inizia ad uscire quando ancora la membrana è lontana dalle condizioni di saturazione. Affinché il supporto sia completamente utilizzato bisogna aspettare che anche i pori di piccole dimensioni siano saturi, ma nel frattempo è stata persa una notevole quantità di soluto con la soluzione in uscita. La curva di breakthrough risultante da una membrana con dimensione dei pori variabile è molto allargata, indice di scarse prestazioni di separazione.

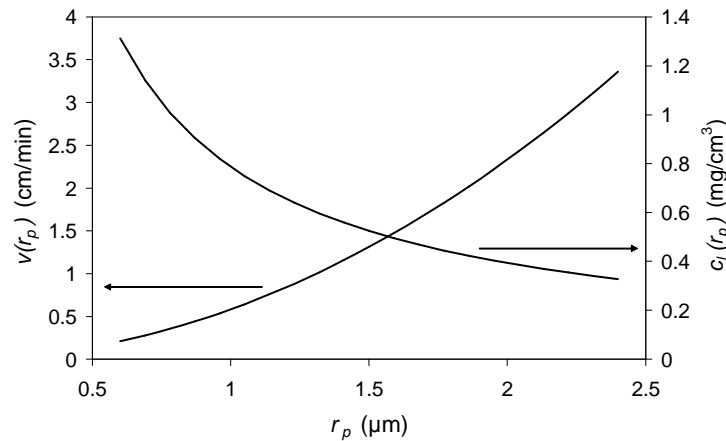


Figura 6.2: Influenza tipica della dimensione del poro sulla velocità interstiziale e sulla capacità massima. Il raggio medio dei pori è pari a  $1.5 \mu\text{m}$ , in corrispondenza del quale la velocità interstiziale è pari a  $1.31 \text{ cm/min}$  e la capacità della membrana è  $0.52 \text{ mg/ml}$ .

## 6.1.2 Risultati del modello

Il modello usato per le simulazioni che saranno presentate è il modello di Thomas. Anche se tale modello introduce numerose semplificazioni, grazie alla sua facilità di applicazione possiamo rapidamente definire come variano le prestazioni di una membrana con pori di dimensioni variabili. I risultati ottenuti possono essere considerati come punto di partenza qualitativo per ulteriori riflessioni.

Le simulazioni sono state condotte in due casi studio diversi tra loro, per le condizioni operative e le caratteristiche della fase stazionaria: il primo è relativo ad un sistema con una cinetica di reazione mediamente veloce, alta capacità di legame e pori di grandi dimensioni; la seconda è invece caratterizzata da una cinetica più blanda, bassa capacità di legame e pori piccoli. Le condizioni scelte sono molto diverse tra loro, ma allo stesso tempo gli ordini di grandezza per le variabili sono del tutto realistici. Si potrebbe dire che il primo caso corrisponde ad una membrana ottimizzata pronta per applicazioni industriali, mentre il secondo caso è relativo ad un supporto in fase di sviluppo. Le variabili usate per le simulazioni sono riportate in dettaglio in Tabella 6.1.

La funzione di distribuzione di probabilità utilizzata è la semplice distribuzione normale, o di Gauss, descritta dalla relazione:

$$f(r_p) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{r_p - r_0}{\sigma}\right)^2\right] \quad 6.16$$

dove  $r_0$  è il raggio medio dei pori e  $\sigma$  è la deviazione standard della distribuzione di probabilità della dimensione dei pori.

Tabella 6.1: Condizioni operative e caratteristiche del supporto per i casi considerati.

	caso 1	caso 2
$k_a$ (cm <sup>3</sup> /mg min)	5	0.7
$K_d$ (mg/ml)	$3.93 \cdot 10^{-2}$	$3.93 \cdot 10^{-2}$
$c_1$ (mg/ml)	5	0.1
$L$ (cm)	0.275	0.275
$S_t$ (cm <sup>2</sup> )	5	5
$\varepsilon$	0.64	0.64
$r_0$ (μm)	15	0.225
$\eta$ (mg/cm min)	600	600
$c_0$ (mg/ml)	1	1
$F$ (ml/min)	5	1

Tabella 6.2: Distribuzione della dimensione dei pori in una classe di membrane considerate in questo lavoro di tesi. Dati gentilmente comunicati dall'Università di Twente.

membrana	$r_{p,min}$ (nm)	$r_{p,medio}$ (nm)	$r_{p,max}$ (nm)	$\sigma_{rel}$ %
Sartobind Epoxy	930	950	1280	6.1
Epoxy 1	312	459	585	9.9
Epoxy 2	287	368	508	10.0

Alcune delle membrane utilizzate in questo lavoro di tesi hanno una deviazione standard relativa della distribuzione della dimensione dei pori,  $\sigma_{rel}$ , che nel caso peggiore è pari al 10%, come riportato in dettaglio in Tabella 6.2.

Le prime simulazioni sono state condotte per valutare la curva di breakthrough relativamente ai casi studio riportati in Tabella 6.1 e per una deviazione standard relativa del 10% (Figura 6.3). Oltre alla BTC globale, sono riportate le BTC per pori di grandi ( $r_p + 3\sigma$ ), medie ( $r_p$ ) e piccole dimensioni ( $r_p - 3\sigma$ ). È interessante notare che in entrambi i casi analizzati, la BTC per i pori larghi sia molto anticipata rispetto alle altre, mentre la BTC relativa a pori di piccole dimensioni ritarda talmente che non è evidente l'uscita di proteina nell'intervallo di tempo considerato. Complessivamente la BTC risulta allargata rispetto a quella ottenuta per pori di medie dimensioni, evidenziando il calo di prestazioni del supporto.

È intuitivo riconoscere che il calo delle prestazioni è più marcato quando la deviazione standard relativa è maggiore. Quest'effetto è mostrato chiaramente in Figura 6.4, dove si può osservare un allargamento maggiore della curva di breakthrough all'aumentare della deviazione standard relativa.

Dal punto di vista quantitativo, in Figura 6.5 è riportata la diminuzione della capacità dinamica valutata nel punto di breakthrough ( $c_{BTP} = 10\% c_0$ ), avendo scelto come riferimento la capacità stimata attraverso il modello di Thomas. Affinché il calo delle prestazioni della membrana sia limitato sotto la soglia del 5% è

fondamentale che la membrana abbia una deviazione standard relativa al massimo dell'  $1 \div 2\%$ . Questa condizione è molto restrittiva, ma un risultato del tutto analogo è confermato dagli studi condotti da Suen ed Etzel [1]. Per valori della deviazione standard superiori, le prestazioni del supporto calano fortemente. Ad esempio, nel caso pratico in cui  $\sigma_{rel} = 10\%$ , la capacità dinamica può diminuire anche del  $25 \div 30\%$ .

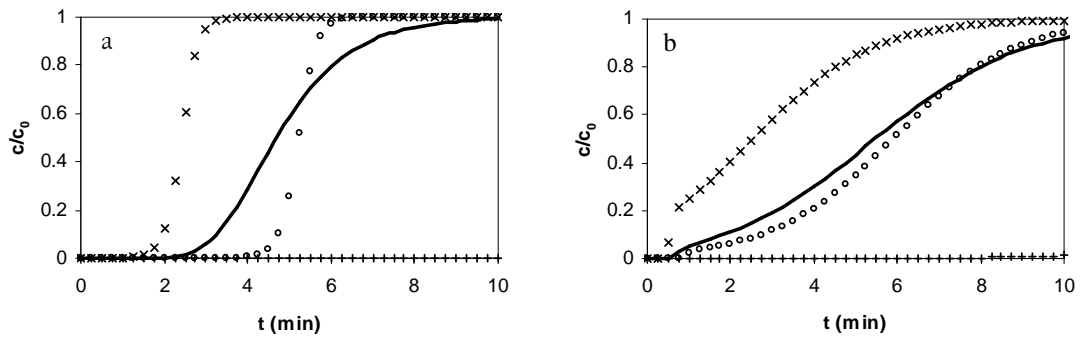


Figura 6.3: Curve di breakthrough per pori di piccole (+) medie (o) e grandi (x) dimensioni, e curva di breakthrough complessiva (linea continua). Deviazione standard relativa della distribuzione dei pori del 10%. a: caso 1, b: caso 2.

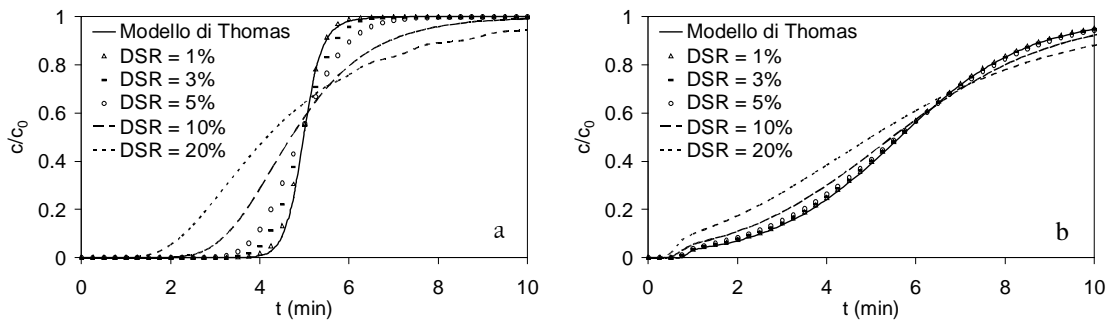


Figura 6.4: Effetto della deviazione standard relativa (DSR) sulla curva di breakthrough complessiva. a: caso 1, b: caso 2.

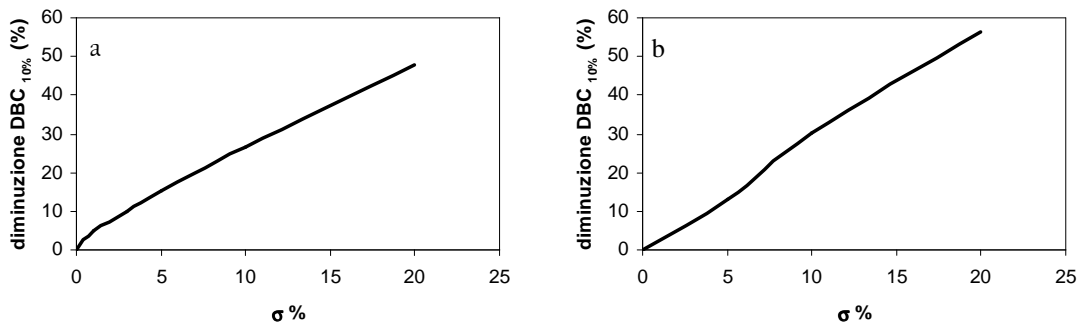


Figura 6.5: Diminuzione della capacità dinamica al 10% breakthrough rispetto al modello di Thomas in funzione della deviazione standard relativa della distribuzione della dimensione dei pori. a: caso studio 1, b: caso studio 2.

Tutte le membrane studiate hanno una distribuzione della dimensione dei pori che è ben superiore al limite auspicato dell'1%. Un punto in cui andrebbe posta particolare attenzione è proprio nella fase di produzione delle membrane, cercando di controllare in maniera efficiente che tutti i pori abbiano dimensione prossima a quella media.

Per limitare gli effetti dovuti alla distribuzione della dimensione dei pori si può operare con diverse membrane sovrapposte piuttosto che con una singola membrana. In questo modo aumenta la capacità complessiva del letto poroso, fornendo così i presupposti per processare una quantità maggiore di alimentazione per ciclo cromatografico. Dal punto di vista operativo praticamente tutti i gruppi di ricerca lavorano su pile di membrane sovrapposte [4], dunque questo approccio rappresenta un caso di fondamentale importanza.

### 6.1.3 Studio teorico delle prestazioni di colonne con membrane sovrapposte

In questo paragrafo viene descritto uno studio teorico che descrive una colonna cromatografica composta da un numero  $n_m$  di membrane sovrapposte. Questo metodo è stato sviluppato secondo un approccio diverso rispetto ai lavori riportati in letteratura[2].

Lo schema di base propone di dividere il mezzo poroso di altezza totale  $L$  in  $n_m$  sezioni tutte dello stesso spessore  $L/n_m$  (Figura 6.6). Ogni settore ha le stesse caratteristiche in termini di porosità, capacità e distribuzione della dimensione dei pori del mezzo poroso di partenza. Lo studio si propone di valutare gli effetti della variazione del numero di settori considerati sulla curva di breakthrough, mantenendo costante lo spessore totale della colonna  $L$ . Le sezioni corrispondono alle membrane che teoricamente costituiscono la colonna.

Dal punto di vista matematico, il calcolo è eseguito risolvendo il modello presentato nel § 6.1.1 per ogni singolo settore. La concentrazione in ingresso al primo settore corrisponde alla concentrazione dell'alimentazione, la concentrazione in uscita dal primo settore costituisce quella di ingresso al secondo settore e così via. Da notare che la concentrazione entrante in un settore diverso dal primo ha un andamento sigmoideale, per cui per i settori successivi al primo non può essere applicato il modello di Thomas<sup>2</sup> ma deve essere risolto il sistema costituito dalle equazioni 5.12, 5.19 e 5.33 – 5.36 (o in alternativa dalle 5.68 – 5.73).

---

<sup>2</sup> La soluzione analitica del modello di Thomas è ottenuta sotto l'ipotesi di dispersione assiale trascurabile, ipotesi mantenuta valida in questo studio, in cui la condizione al contorno relativa alla sezione di ingresso impone un disturbo a gradino per la concentrazione in ingresso.



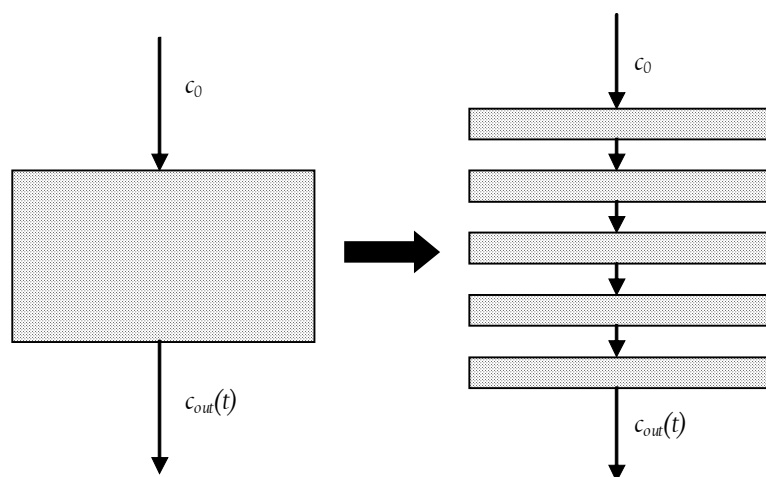


Figura 6.6: Rappresentazione schematica della colonna cromatografica nel modello con membrane sovrapposte.

La deviazione standard relativa, presa in considerazione per la distribuzione del diametro dei pori in questa serie di simulazioni, è sempre pari al 10%, valore che ben descrive le membrane (si veda Tabella 6.2). In Figura 6.7 si può osservare che, relativamente al caso 1, un aumento del numero di settori in cui è suddivisa la colonna cromatografica minimizza i problemi dovuti alla distribuzione della dimensione dei pori nella membrana. Analoga conclusione si ottiene con i dati relativi al caso 2 (dati non riportati).

Da un punto di vista quantitativo, la diminuzione di capacità dinamica rispetto al modello di Thomas è inferiore al 5% se si usano appena 5 membrane sovrapposte (Figura 6.8). È interessante osservare che se gli esperimenti fossero condotti con una sola membrana questi sarebbero affetti da un evidente calo delle prestazioni, e si avrebbe una diminuzione della capacità di circa il 30% (Figura 6.5).

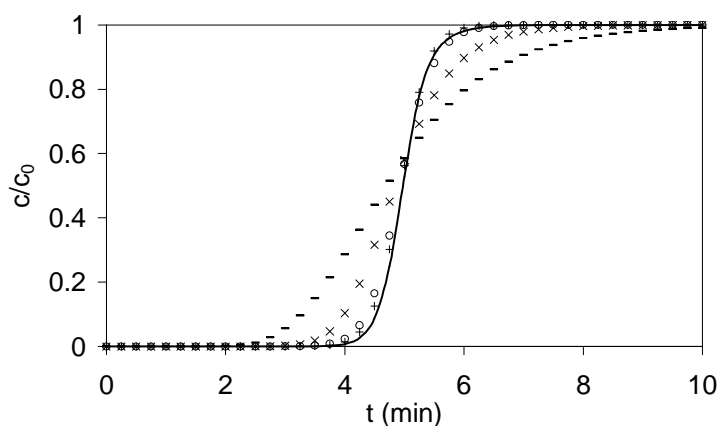


Figura 6.7: Curve di breakthrough per il modello con sezioni sovrapposte per 1 membrana (-), due membrane (x), cinque membrane (o) e 10 membrane sovrapposte (+), e curva di breakthrough secondo il modello di Thomas (linea continua). Deviazione standard relativa della distribuzione della dimensione dei pori del 10%. Caso 1.

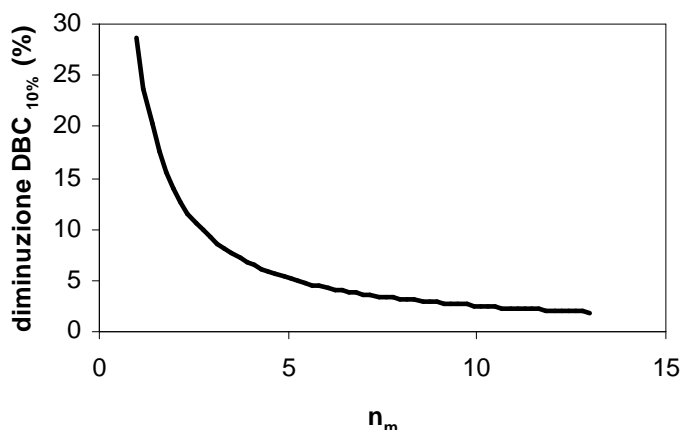


Figura 6.8: Diminuzione della capacità dinamica al 10% breakthrough rispetto al modello di Thomas in funzione del numero di membrane costituenti la colonna cromatografica. Deviazione standard relativa della distribuzione della dimensione dei pori del 10%. Caso I.

#### 6.1.4 Osservazioni conclusive

Quello ottenuto è un risultato importantissimo che ci assicura di poter ottenere dati sperimentali affidabili già con solo 5 membrane sovrapposte. Nonostante il valore di  $\sigma_{rel}$  dei supporti studiati sia molto alto, i dati sperimentali possono essere trattati come se i pori nella membrana abbiano una dimensione uniforme e pari al diametro medio dei pori. In queste condizioni la distribuzione della dimensione dei pori è ininfluyente e possono essere applicati i modelli descritti nel § 5.1, senza considerare la complicazione dovuta alla distribuzione della dimensione dei pori.

## 6.2 Modello con trasporto di materia nello strato limite

Il trasporto di materia nello strato limite a ridosso della superficie interna è un argomento ampiamente trattato in letteratura [5, 6]. Tuttavia, la maggior parte degli autori hanno studiato colonne impaccate con resine porose, in cui il trasporto di materia può costituire la resistenza controllante. Per questi sistemi sono state elaborate numerose correlazioni empiriche utili per valutare il coefficiente di trasporto di materia nello strato limite, come, ad esempio, quella di Wilson–Geankoplis [7].

I sistemi con membrane sono caratterizzati da alte velocità interstiziali e pori di piccole dimensioni, fattori che complessivamente tendono a minimizzare la resistenza dovuta al trasporto di materia nello strato limite. Infatti, quasi tutti i lavori pubblicati che presentano modelli matematici di sistemi cromatografici con membrane trascurano questo fenomeno [1, 8].

Alcuni autori hanno comunque utilizzato un formalismo matematico che include il trasporto di materia nello strato limite [9, 10], ma con un coefficiente di

trasporto globale in cui sono inclusi tutti i fenomeni coinvolti su scala locale, ovvero dispersione assiale, trasporto di materia nello strato limite e cinetica di reazione. Questo approccio, anche se di semplice applicazione pratica, non consente di isolare gli effetti del solo coefficiente di trasporto di materia, per cui è impossibile stabilire se effettivamente questo fenomeno è di fondamentale importanza oppure può essere trascurato.

In questo paragrafo sarà presentato il modello matematico che include il trasporto di materia nello strato limite. Tramite gli strumenti dell'analisi dimensionale e dei tempi caratteristici relativi ai fenomeni di trasporto coinvolti sarà dimostrata la trascurabilità di questo termine. L'analisi condotta sarà limitata alla sola fase di adsorbimento.

## 6.2.1 Formulazione del problema

L'introduzione del trasporto di materia nello strato limite impone di scrivere l'equazione di bilancio espressa dalla 5.12 con un diverso formalismo. Il bilancio di materia relativo al soluto deve comunque prendere in considerazione i termini di accumulo, convezione e dispersione assiale, ma il termine generativo deve essere sostituito da una relazione che tiene conto del flusso di soluto attraverso lo strato limite:

$$\varepsilon \frac{\partial c}{\partial t} + \varepsilon v \frac{\partial c}{\partial z} = \varepsilon D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - k_f (c - c_I) A_I'' \quad 6.17$$

dove  $k_f$  è il coefficiente di trasporto di materia medio nello strato limite,  $A_I''$  è l'area interfacciale per unità di volume di membrana e  $c_I$  è la concentrazione all'interfaccia tra fase mobile e fase stazionaria, mentre gli altri termini hanno una simbologia già nota.

La quantità di soluto che attraversa lo strato limite deve coincidere con la massa di proteina che si adsorbe sul supporto:

$$k_f (c - c_I) A_I'' = (1 - \varepsilon) \frac{\partial c_s}{\partial t} \quad 6.18$$

Se si suppone che il mezzo poroso sia costituito da pori cilindrici paralleli di diametro uniforme  $d_p$ , allora l'area interfacciale per unità di volume,  $A_I''$ , può essere espressa come:

$$A_I'' = \frac{4\varepsilon}{d_p} \quad 6.19$$

e sostituendo infine nelle equazioni 6.17 e 6.18:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + v \frac{\partial c}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - 4 \frac{k_f}{d_p} (c - c_I) A_I \quad 6.20$$

$$\frac{4}{d_p} k_f (c - c_i) = \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial c_s}{\partial t} \quad 6.21$$

L'equazione cinetica usata nelle simulazioni è quella di Langmuir, già descritta nel § 5.1.2.1, in cui la concentrazione di soluto che interagisce con la fase stazionaria è valutata all'interfaccia,  $c_I$ , e non nel seno della fase fluida,  $c$ :

$$\frac{dc_s}{dt} = k_a c_I (c_I - c_s) - k_d c_s \quad 6.22$$

Anche le condizioni iniziali e al contorno sono state già presentate nel § 5.1.2.1; tuttavia l'introduzione della variabile  $c_I$  impone la necessità di delineare un'ulteriore condizione iniziale. Chiaramente, all'inizio del ciclo cromatografico la concentrazione all'interfaccia sarà nulla. Si riportano quindi tutte le condizioni iniziali e al contorno al problema:

$$c = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = 0 \quad 6.23$$

$$c_I = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = 0 \quad 6.24$$

$$c_s = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = 0 \quad 6.25$$

$$\varepsilon v c - \varepsilon D_L \frac{\partial c}{\partial z} = \varepsilon v c_{in} \quad \text{per } z = 0, \quad t > 0 \quad 6.26$$

$$\frac{\partial c}{\partial z} = 0 \quad \text{per } z = L, \quad t > 0 \quad 6.27$$

Per studiare il comportamento del sistema al variare dei parametri caratteristici è di certo più comodo adimensionalizzare il sistema di equazioni. Il metodo di adimensionalizzazione proposto prevede l'uso di grandezze leggermente diverse rispetto quelle già viste nel § 5.1.5:

$$\tau = \frac{t v}{L} \quad 6.28 \quad c^* = \frac{c}{c_0} \quad 6.30$$

$$\zeta = \frac{z}{L} \quad 6.29 \quad c_I^* = \frac{c_I}{c_0} \quad 6.31$$

$$c_s^* = \frac{c_s}{c_l} \quad 6.32 \qquad m = \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{c_l}{c_0} \quad 6.35$$

$$Pe = \frac{vL}{D_l} \quad 6.33 \qquad Da = k_a c_0 \frac{L}{v} \quad 6.36$$

$$q = \frac{4k_f L}{d_p v} \quad 6.34 \qquad s = \frac{c_0}{K_d} \quad 6.37$$

dove  $q$  è il numero di unità di trasporto,  $Da$  è il numero di Damköhler e  $s$  è il fattore di separazione. Rielaborando le equazioni 6.17 e 6.21 – 6.27 si ottiene il seguente sistema:

$$\frac{\partial c^*}{\partial \tau} + \frac{\partial c^*}{\partial \zeta} = \frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 c^*}{\partial \zeta^2} - q(c^* - c_l^*) \quad 6.38$$

$$q(c^* - c_l^*) = m \frac{\partial c_s^*}{\partial \tau} \quad 6.39$$

$$\frac{\partial c_s^*}{\partial \tau} = Da c_l^* (1 - c_s^*) - \frac{Da}{s} c_s^* \quad 6.40$$

$$c^* = 0 \quad \text{per } \zeta \geq 0, \quad \tau = 0 \quad 6.41$$

$$c_l^* = 0 \quad \text{per } \zeta \geq 0, \quad \tau = 0 \quad 6.42$$

$$c_s^* = 0 \quad \text{per } \zeta \geq 0, \quad \tau = 0 \quad 6.43$$

$$1 = c^* - \frac{1}{Pe} \frac{\partial c^*}{\partial \zeta} \quad \text{per } \zeta = 0, \quad \tau > 0 \quad 6.44$$

$$\frac{\partial c^*}{\partial \zeta} = 0 \quad \text{per } \zeta = 1, \quad \tau > 0 \quad 6.45$$

## 6.2.2 Studio dei tempi caratteristici

Il modello presentato è del tutto generale e considera tutti i fenomeni coinvolti nella fase di adsorbimento di un processo di cromatografia di affinità con membrane. Anziché procedere con la risoluzione per via numerica delle equazioni sopra esposte, si preferisce fare uno studio dei tempi caratteristici ed evidenziare quali di questi fenomeni siano trascurabili rispetto gli altri.

Il numero di unità di trasporto,  $q$ , esprime il rapporto tra il tempo caratteristico per la convezione,  $\tau_c$ , e il tempo caratteristico per il trasporto di materia nello strato limite,  $\tau_f$ , nel caso in cui lo spessore dello strato limite,  $\delta$ , sia pari ad un quarto del diametro del poro,  $d_p/4$ :

$$q = \frac{\tau_c}{\tau_f} \quad 6.46$$

Nel caso in cui il tempo caratteristico per la convezione sia molto maggiore rispetto al tempo caratteristico per il trasporto di materia nello strato limite, ovvero quando il numero di unità di trasporto,  $q$ , è molto maggiore di 1, allora il trasporto di materia è molto veloce e può essere trascurato. In altri termini questa condizione può essere riscritta come segue:

$$k_f \gg \frac{v d_p}{L} \quad 6.47$$

È necessaria pertanto una stima dell'ordine di grandezza che può assumere il coefficiente di trasporto di materia,  $k_f$ . Dalla teoria del film [3], l'ordine di grandezza di  $k_f$  è pari al rapporto tra il coefficiente di diffusione molecolare e lo spessore del film, che in questa sede è assunto pari a  $d_p/4$ :

$$k_f \cong \frac{4D_m}{d_p} \quad 6.48$$

Questa relazione rappresenta solo una stima conservativa per il coefficiente di trasporto di materia nello strato limite. Infatti lo spessore del film è sicuramente inferiore alla metà del raggio del poro, e in pratica il coefficiente di trasporto assumerà valori maggiori. Sostituendo il risultato ottenuto nella 6.47 e riarrangiando si ottiene che  $q \gg 1$ , il che equivale a:

$$\frac{v d_p}{D_m} \ll 16 \frac{L}{d_p} \quad 6.49$$

Da notare che il primo termine è il numero di Péclet del poro,  $Pe_p$ , mentre il secondo membro rappresenta un fattore geometrico relativo al supporto considerato.

Nelle condizioni operative che solitamente vengono adoperate nei sistemi con membrane microporose questa condizione è sempre verificata. Ad esempio, per valori tipici delle grandezze presenti nella 6.49, ( $D_m = 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $d_p = 10^{-4} \text{ cm}$ ,  $L =$

$10^{-1}$  cm), la velocità interstiziale deve essere molto più piccola di 16 cm/s. Nelle usuali condizioni di lavoro, raramente la velocità interstiziale raggiunge valori dell'ordine di 0.1 cm/s. Inoltre si ricorda che il coefficiente di trasporto di materia è sicuramente maggiore rispetto quello sopra stimato, per cui si può concludere che il termine relativo al trasporto di materia nello strato limite è decisamente trascurabile rispetto a quello dovuto alla convezione.

Confrontiamo adesso il trasporto di materia nello strato limite e la dispersione assiale. Affinché il primo fenomeno possa essere trascurato rispetto al secondo, il tempo caratteristico per la dispersione assiale,  $\tau_{DL}$ , deve essere molto maggiore rispetto al tempo caratteristico per il trasporto di materia nello strato limite,  $\tau_f$ , ovvero:

$$\frac{L^2}{D_L} \gg \frac{d_p}{4} \frac{1}{k_f} \quad 6.50$$

da cui sostituendo la stima fatta per  $k_f$  (eq. 6.48) si ricava:

$$\frac{D_L}{D_m} \ll \left( 4 \frac{L}{d_p} \right)^2 \quad 6.51$$

Per i valori tipici già presentati per  $D_m$ ,  $d_p$  ed  $L$ , questa condizione risulta soddisfatta solo se il coefficiente di dispersione assiale,  $D_L$ , è molto minore di 1.6  $\text{cm}^2/\text{s}$ . Dati sperimentali ottenuti nel corso della ricerca, oltre a dati riportati in letteratura [10], mostrano che il coefficiente di dispersione assiale difficilmente è maggiore di  $10^{-2} \text{cm}^2/\text{s}$ .

Si ricorda inoltre che la stima del coefficiente di trasporto di materia fatta secondo la teoria del film rappresenta un limite inferiore, viene dunque confermata l'ipotesi che il trasporto di materia nello strato limite sia molto più veloce rispetto alla dispersione assiale.

Per una trattazione completa si deve fare un ultimo confronto tra i tempi caratteristici per la reazione di adsorbimento e per il trasporto di materia nello strato limite. Seguendo un approccio simile a quello mostrato nei casi precedenti:

$$k_a \ll \frac{16 D_m}{c_0 d_p^2} \quad 6.52$$

Per i valori tipici già presentati per  $D_m$  e  $d_p$ , e se la concentrazione di proteina in soluzione è di circa 1 mg/ml, la costante cinetica di adsorbimento deve essere molto minore di  $10^4 \text{ml}/(\text{mg min})$ .

In questo caso non si può sempre aver la certezza che la 6.52 sia verificata: alcuni autori hanno stimato che l'ordine di grandezza della costante cinetica di adsorbimento di anticorpi su diversi supporti è circa 1 (dato espresso in  $\text{ml mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) [11, 12]; in altri casi si suppone che la reazione raggiunga istantaneamente l'equilibrio, il che equivale a considerare la costante cinetica di adsorbimento tendente ad infinito [13].

Si può comunque sostenere che, anche nel caso in cui l'adsorbimento sia supposto all'equilibrio, il trasporto di materia nello strato limite sia molto più veloce rispetto alla convezione e alla dispersione assiale, per cui non costituisce lo stadio limitante del processo, e quindi può essere sempre trascurato nella trattazione matematica.

### 6.3 Miscelazione nei volumi esterni alla colonna nella fase di eluizione

Nel § 5.1.1 è stato introdotto il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, facendo notare quanto sia importante tener conto di questo fenomeno in tutte le fasi cromatografiche. Nelle fasi di adsorbimento e di lavaggio si può semplicemente descrivere l'insieme dei ritardi e dei mescolamenti nel sistema attraverso le equazioni 5.10 e 5.11. Nella fase di eluizione non si assiste ad un cambio di concentrazione della proteina di interesse, bensì è il tampone stesso che cambia, quindi le equazioni di dispersione non sono applicabili così come sono in questa fase.

Tuttavia è evidente che il recupero della proteina non può iniziare finché il tampone di eluizione non fa il suo ingresso nella colonna. Inoltre, è da considerare il fatto che i mescolamenti nei volumi esterni alla colonna fanno giungere il tampone di eluizione diluito in quello di lavaggio. Si può supporre quindi che la velocità della reazione di eluizione sia proporzionale alla concentrazione di eluente e che raggiunga il suo massimo una volta che il tampone di lavaggio sia stato completamente spiazzato dalla colonna. Il metodo più semplice per tener conto di questi effetti è quello di usare nell'equazione cinetica una costante di eluizione fittizia che include gli effetti della dispersione,  $k_e'$ :

$$k_e' = k_e \times \begin{cases} 0 & \text{per } t < t_d + t_e \\ 1 - \exp\left(-\frac{F}{V_{CSTR}}(t - t_d - t_e)\right) & \text{per } t \geq t_d + t_e \end{cases} \quad 6.53$$

dove  $t_e$  è l'istante di inizio della fase di eluizione.



Questa forma della costante cinetica può essere facilmente implementata in una cinetica del primo ordine irreversibile:

$$\frac{dc_s}{dt} = -k'_e c_s \quad 6.54$$

L'equazione cinetica 6.54 si è rivelata particolarmente utile per eseguire le simulazioni del picco di eluizione, dimostrando una eccellente capacità di approssimare i dati sperimentali (§ 7.4).

## Bibliografia

1. Suen, S. Y., Etzel, M. R., *A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations*, Chemical Engineering Science, **1992**, 47, 1355–1364.
2. Liu, H. C., Fried, J. R., *Breakthrough of lysozyme through an affinity membrane of cellulose cibacron blue*, AIChE Journal, **1994**, 40, 40–49.
3. Bird, R. B., Stewart, W. E., Lightfoot, E. N., *Transport phenomena*, seconda edizione, **2002**, Wiley, New York.
4. Etzel, M. R., *Layered Stacks*, in: Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z., *Monolithic Materials*, Journal of Chromatography Library, **2003**, 67, 213–233.
5. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R., *Analysis of affinity separations I: predicting the performance of affinity adsorbers*, The Chemical Engineering Journal, **1985**, 30, B9–B23.
6. Guiochon, G., Felinger, A., Shirazi, D. G., Katti, A. M., *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, seconda edizione, **2006**, Elsevier Inc., San Diego, California.
7. Wilson, E. J., Geankoplis, C. J., *Liquid mass transfer at very low reynolds numbers in packed beds*, Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals, **1966**, 5, 9–14.
8. Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G. C., *Modelling and simulation of affinity membrane adsorption*, Journal of Chromatography A, **2007**, 1162, 24–33.
9. Sarfert, F. T., Etzel, M. R., *Mass transfer limitations in protein separations using ion-exchange membranes*, Journal of Chromatography A, **1997**, 764, 3–20.

10. Hao, W., Wang, J., Zhang, X., *Mass transfer kinetics and breakthrough and elution curves for bovine serum albumin using cibacron blue cellulose membranes*, *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1114*, 123–131.
11. Olson, W., C., Spitznagel, T., M., Jarmush, M., L., *Dissociation kinetics of antigen-antibody interactions: studies on a panel of anti-albumin monoclonal antibodies*, *Molecular Immunology*, **1989**, *26*, 129–136.
12. Viera, C., Yang, H., Etzel, M. R., *Affinity membranes: competitive binding of the human IgG subclasses to immobilized protein G*, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **2000**, *39*, 3356–3363.
13. Horstmann, B. J., Chase, H. A., *Modelling the affinity adsorption of Immunoglobulin G to Protein A immobilized to agarose matrices*, *Chemical Engineering Research and Design*, **1989**, *67*, 243–254.

---

# CAPITOLO 7

---

## VALIDAZIONE DEL MODELLO MATEMATICO

### Introduzione

Per definizione, un modello matematico è uno strumento che cerca di descrivere un sistema reale attraverso metodi matematici [1]. Un modello affidabile è in grado di approssimare il comportamento del sistema in esame commettendo errori contenuti.

La modellazione matematica costituisce uno degli strumenti più importanti e largamente utilizzati nell'industria odierna. Permette infatti di determinare le caratteristiche di un sistema in via previsionale, eliminando così la necessità di eseguire prove sperimentali lunghe e dispendiose. Un buon modello matematico può risultare indispensabile al progettista durante la fase di scale-up di un impianto.

Lo sviluppo di un modello matematico può essere suddiviso in due fasi principali. Nella prima si formalizza il problema matematico, ovvero si cerca di descrivere tramite equazioni tutti i principali fenomeni coinvolti nel sistema sperimentale. Nella seconda si procede alla validazione del modello matematico con dati sperimentali; in questa parte è anche possibile stimare i parametri presenti nel modello che risultano di difficile determinazione sperimentale.

In questo capitolo saranno confrontate le simulazioni generate dal modello presentato nel Capitolo 5 con i dati sperimentali riportati nel Capitolo 3. In base alle osservazioni sperimentali, saranno proposte delle modifiche al modello in modo da prendere in considerazione fenomeni solitamente trascurati.

Per la risoluzione del sistema di equazioni sono stati impiegati due diversi software. Entrambi sono in grado di trattare complessi problemi matematici differenziali per via numerica ma usano diverse procedure risolutive: il COMSOL

Multiphysics® 3.3 risolve il sistema di equazioni in base al metodo dei volumi finiti, mentre l'Aspen Custom Modeler™ applica il metodo delle differenze finite.

Nelle prime simulazioni condotte nel corso del dottorato di ricerca è stato usato il COMSOL Multiphysics® 3.3. Nonostante l'intuitiva interfaccia grafica e la facilità di implementazione delle equazioni differenziali, il programma risulta difficilmente personalizzabile. Dunque si è preferito passare all'Aspen Custom Modeler, in cui le equazioni sono espresse secondo un apposito linguaggio di programmazione che permette di gestire il problema in modo più dinamico ed interattivo.

Laddove le equazioni ammettono una soluzione analitica, come per esempio nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (si veda § 5.1.1), il problema è stato implementato e risolto in un foglio Microsoft® Excel.

Per eseguire le interpolazioni e determinare gli eventuali parametri aggiustabili presenti nei modelli applicati è stato seguito il metodo di minimizzazione dello scarto quadratico medio tra i dati sperimentali e le simulazioni generate dal modello.

## 7.1 Modellazione della dispersione nei volumi esterni alla colonna

Prima di considerare la modellazione di un ciclo cromatografico di affinità, risulta utile verificare l'affidabilità del modello proposto per descrivere la dispersione nei volumi esterni alla colonna.

Dai risultati di dispersione si ottengono informazioni importanti riguardo i volumi morti assimilabili ad un PFR ed alle miscele correlate ad un CSTR (§ 5.1.1). È possibile che le entità dei volumi del PFR e del CSTR dipendano dalla portata; ad esempio le miscele potrebbero essere favorite a velocità più elevate [2].

In condizioni non adsorbenti, il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna è espresso dall'equazione 5.10 (o dalla 5.11 relativamente alla fase di lavaggio). In questa relazione sono presenti due grandezze incognite,  $V_{PFR}$  e  $V_{CSTR}$ . Se però il volume del sistema è noto, applicando la relazione espressa dalla 5.2 secondo la quale la somma del PFR e del CSTR è pari al volume totale, si riduce il grado di libertà del problema ad una sola incognita.

In pratica, il volume dell'impianto cromatografico può essere stimato con semplicità grazie al metodo dei momenti (si veda § 5.2.2, eq. 5.95). Si può scegliere a questo punto di considerare il volume del PFR come un parametro aggiustabile e ricavare il volume del CSTR dalla 5.2, o viceversa. Ad ogni modo, il parametro

aggiustabile del modello è sempre uno solo, determinabile per interpolazione delle curve di dispersione del modello con quelle sperimentali.

Il riferimento scelto in questo paragrafo è relativo ai risultati di dispersione degli esperimenti condotti con 5 membrane SartoAIMs Protein A usando una soluzione di acetone 0.4% V/V in acqua. In questa serie di prove sono stati studiati gli effetti della dispersione nei volumi esterni alla colonna al variare della portata in tutte le fasi cromatografiche. Qualitativamente, il comportamento degli altri sistemi considerati è del tutto simile, ed a meno dei valori dei parametri aggiustabili del modello, possono essere estese tutte le considerazioni che saranno fatte in questa sede.

In Figura 7.1 e Figura 7.2 sono riportati i confronti tra simulazioni e risultati sperimentali delle curve di dispersione a due diverse portate, mentre in Tabella 7.1 sono riassunti i volumi stimati. L'errore medio commesso dal modello sulla descrizione dei dati sperimentali è molto basso e pari all'1.4%.

Ad una data portata, il modello di dispersione descrive quasi perfettamente le curve sperimentali in tutte le fasi cromatografiche mantenendo lo stesso valore del parametro aggiustabile scelto. Questo risultato assicura che le variazioni di volume tra una fase e l'altra, dovute a cambi di posizione delle valvole, alla pompa in funzione ecc., sono del tutto trascurabili.

Tabella 7.1: Volume stimati dall'analisi dei momenti e dal modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna.

$F$ (ml/min)	$V_{PFR}$ (ml)	$V_{CSTR}$ (ml)	$V_{sis}$ (ml)
1	1.35	0.58	1.93
2	1.40	0.61	2.01
5	1.52	0.58	2.10
10	1.65	0.61	2.26

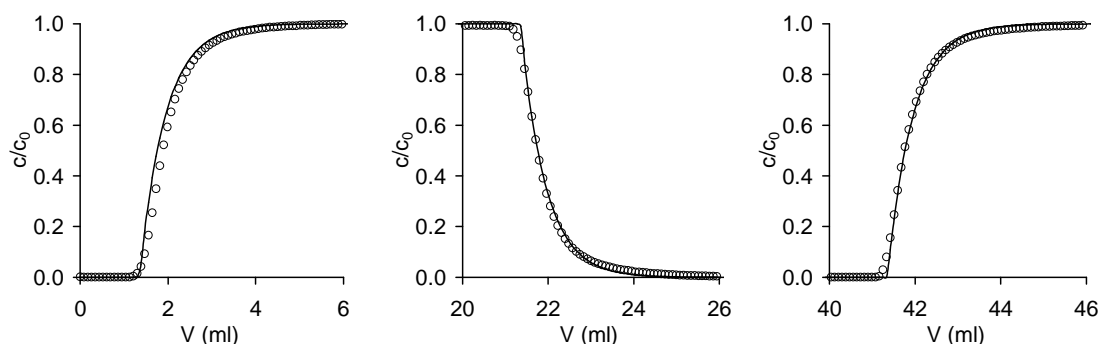


Figura 7.1: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (-) per le fasi di adsorbimento (a sinistra), lavaggio (al centro) ed eluizione (a destra). Portata pari ad 1 ml/min.

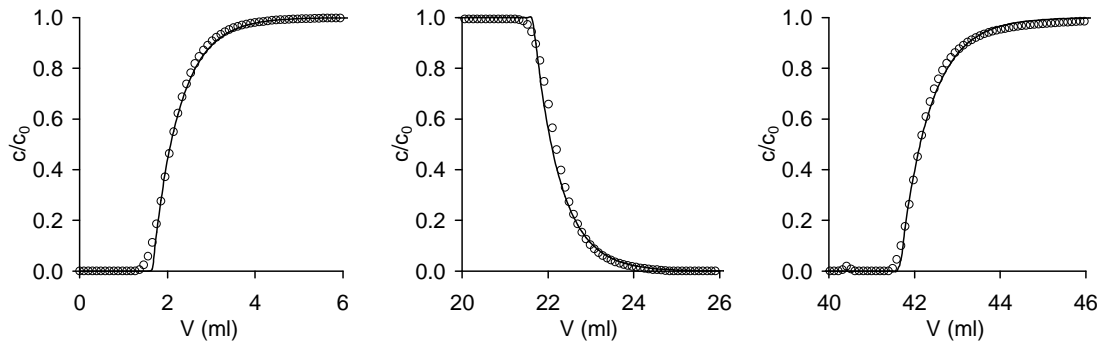


Figura 7.2: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (-) per le fasi di adsorbimento (a sinistra), lavaggio (al centro) ed eluizione (a destra). Portata pari ad 10 ml/min.

Tuttavia si nota un leggero incremento del volume del PFR all'aumentare della portata, mentre il volume del CSTR non è influenzato da questo parametro. Il maggior ritardo associato alle alte portate è legato essenzialmente al tempo necessario per il cambio di posizione della valvola di iniezione in combinazione alla trasmissione del segnale elettronico dalla macchina al computer. Quest'affermazione è confermata dalla proporzionalità del volume del PFR con la portata, come riportato in Figura 7.3.

Il volume reale associato al PFR è pari all'intercetta dell'interpolante, in questo caso pari a 1.33 ml, mentre il ritardo della macchina è equivalente alla pendenza della retta, pari a circa 2 secondi. Questa ultima osservazione risulta valida anche per tutti gli altri sistemi studiati, mentre il volume del PFR può chiaramente cambiare da un sistema all'altro.

Chiarito questo aspetto, si può affermare che sia il volume reale del PFR che quello del CSTR non dipendono dalla velocità di alimentazione, per lo meno nell'intervallo di portate considerato in questo lavoro di tesi. Si può quindi dire che per i sistemi studiati le zone dell'impianto caratterizzate da flusso a pistone e da mescolamenti sono ben definite e non variano con la portata.

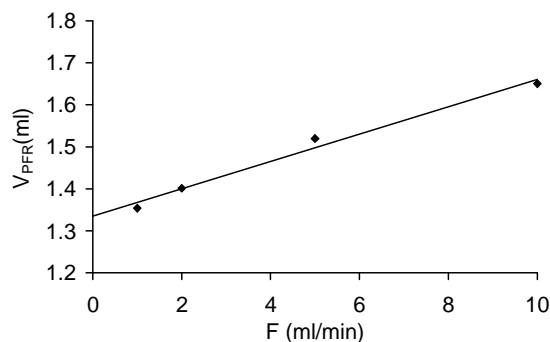


Figura 7.3: Dipendenza del volume del PFR con la portata.

## 7.2 Modellazione dell'adsorbimento di IgG di topo su membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800

Il primo sistema sperimentale utilizzato per la validazione del modello è costituito dalle prove eseguite sulle membrane D-PAM-U450 e D-PAM-U800 con IgG di topo (§ 3.1).

Il modello è stato applicato alla sola fase di adsorbimento; il sistema differenziale usato è descritto dalle equazioni adimensionali 5.68 – 5.73, in cui la condizione al contorno nella sezione di ingresso, eq. 5.72, considera gli effetti legati alla dispersione nei volumi esterni alla colonna espressi tramite la 5.10. Nell'equazione di bilancio di materia 5.68, il termine dispersivo è stato trascurato in quanto il numero di Péclet assiale è maggiore di 40 [3].

I volumi del PFR e del CSTR, riportati in Tabella 7.2, sono stati stimati con il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (eq. 5.10) applicato alle curve di dispersione condotte in condizioni non adsorbenti. Si ricorda che tutti i cicli cromatografici sono stati condotti ad una portata di 1 ml/min, dunque la stessa velocità di alimentazione è stata considerata negli esperimenti di dispersione. Entrambi i sistemi hanno restituito gli stessi valori dei parametri aggiustabili.

Tabella 7.2: Volumi del PFR e del CSTR del modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna per i due sistemi studiati.

Membrana	$V_{PFR}$ (ml)	$V_{CSTR}$ (ml)	$V_{sis}$ (ml)
D-PAM-U450	3.2	3.0	6.2
D-PAM-U800	3.2	3.0	6.2

Il valore della costante di dissociazione di Langmuir considerato per eseguire le simulazioni è supposto coincidente con quello stimato in esperimenti di adsorbimento condotti in condizioni batch, pari a 0.624 mg/ml [4]. Difatti, la  $K_d$  è un parametro di equilibrio che dipende solo dal sistema membrana – proteina considerato e non dalle condizioni operative di esecuzione della prova. La capacità dinamica invece risulta diversa rispetto quella valutata in condizioni batch, oltre a mostrare una progressiva diminuzione con l'avanzare dell'utilizzo delle membrane [5].

Per tener conto del calo di capacità tra un ciclo ed il successivo, si è scelto di calcolare la capacità di adsorbimento massima,  $c_l$ , tramite l'equazione che descrive l'isoterma di Langmuir (eq. 5.21). Per comodità è di seguito riportata la forma in cui è esplicitato il termine di capacità massima:

$$c_l = \frac{c_s(c_0 + K_d)}{c_0} \quad 7.1$$

La concentrazione di proteina adsorbita sulla fase stazionaria,  $c_s$ , è posta coincidente alla capacità dinamica sperimentale,  $DBC_{100\%}$ , a meno della correzione relativa al volume di solido. Si ricorda infatti che la capacità di legame usata nel modello è espressa per unità di volume solido, mentre la capacità dinamica è riferita all'unità di volume totale. Le due grandezze sono dunque legate dalla relazione:

$$DBC_{100\%} = c_s(1 - \varepsilon) \quad 7.2$$

Sostituendo i valori di capacità dinamica (si veda Tabella 3.2) nelle equazioni sopra riportate, si ricava con semplicità la capacità massima inserita nel modello per i due sistemi e per ogni ciclo condotto (Tabella 7.3). Tale parametro non costituisce quindi un parametro aggiustabile.

Tabella 7.3: Capacità massima usata nelle simulazioni,  $c_b$ , espressa in mg/ml di volume di membrana solida.

	ciclo 1	Ciclo 2	ciclo 3
D-PAM-U450	11.33	8.99	7.40
D-PAM-U800	21.97	19.35	17.13

Per generare le simulazioni è necessario un ultimo parametro: la costante cinetica di adsorbimento,  $k_a$ . Purtroppo questa grandezza è di difficile determinazione sperimentale [6], per cui è stata considerata come un parametro aggiustabile del modello.

Il confronto tra i risultati del modello ottenuti con la strategia risolutiva appena descritta e le curve sperimentali sono riportati in Figura 7.4 e Figura 7.5, mentre i valori della costante cinetica di adsorbimento sono riportati in Tabella 7.4.

Tabella 7.4: Costante cinetica di adsorbimento stimata per i due sistemi studiati.

Membrana	$k_a$ (ml mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
D-PAM-U450	0.40 ± 0.05
D-PAM-U800	0.96 ± 0.03

Le simulazioni sono in ottimo accordo con i dati sperimentali in tutti i casi considerati. L'approssimazione è migliore per le membrane D-PAM-U450, dove l'errore medio è dell'1.70%, mentre per le D-PAM-U800 è del 4.55%. L'errore è comunque sotto la soglia del 5% quindi le simulazioni sono da ritenersi più che accettabili.



## Validazione del modello matematico

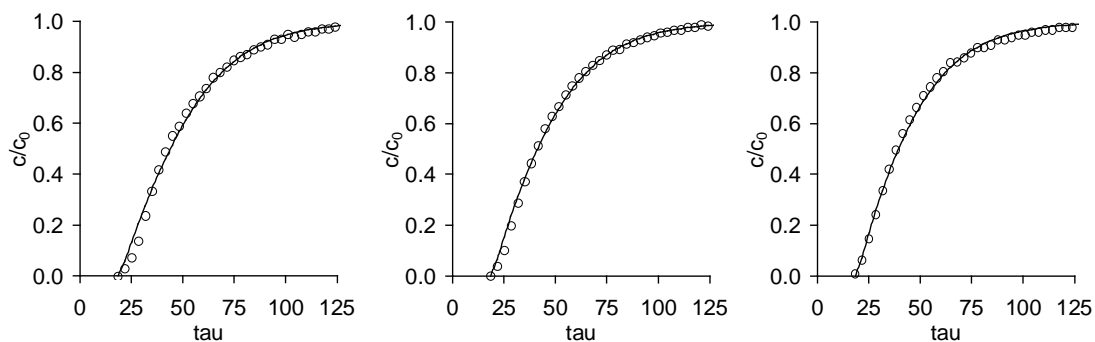


Figura 7.4: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) relativamente alle membrane D-PAM-U450.

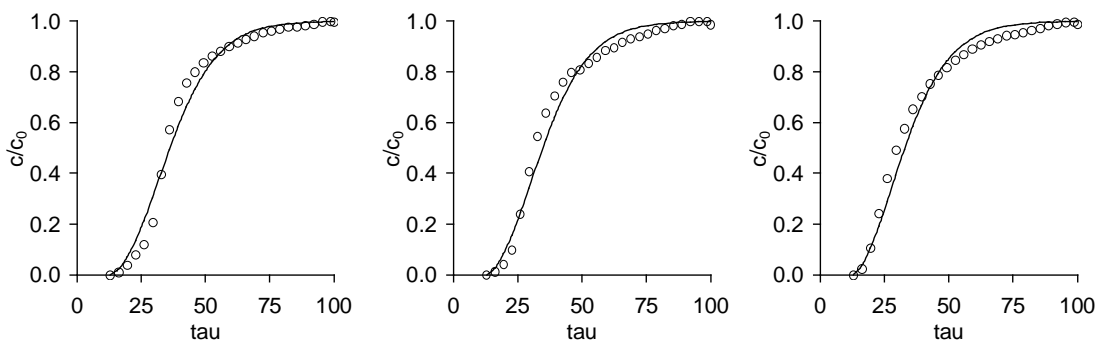


Figura 7.5: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) relativamente alle membrane D-PAM-U800.

Come è possibile osservare in Tabella 7.5, la reazione di adsorbimento è il fenomeno controllante, con un tempo caratteristico di almeno un ordine di grandezza superiore rispetto al tempo caratteristico per la convezione.

Tabella 7.5: Tempi caratteristici per la reazione di adsorbimento e per la convezione attraverso la colonna per i due sistemi studiati.

Membrana	$\tau_a$ (s)	$\tau_c$ (s)
D-PAM-U450	500.5	9.9
D-PAM-U800	209.0	13.7

I dati a disposizione coprono solo un intervallo molto limitato di condizioni operative, e nonostante le simulazioni descrivano con precisione i risultati sperimentali, non si può certo affermare che il modello sia valido anche per altre condizioni operative. Per svincolarsi da questa limitazione, nei seguenti paragrafi saranno presi come riferimento solo sistemi sperimentali su cui sono state condotte delle estese sperimentazioni a diverse portate e concentrazioni di IgG nell'alimentazione.

### 7.3 Modellazione dell'adsorbimento di IgG umana su membrane A2P–Sartoepoxy

Nel § 3.2.1 è stato analizzato il comportamento sperimentale delle membrane A2P–Sartoepoxy. In particolare, per tener conto dell'alto adsorbimento non specifico e del doppio picco osservato in eluizione, si è supposto che in questo sistema fossero compresenti due cinetiche di adsorbimento.

Le relazioni usate per descrivere la curva di breakthrough sono la consueta equazione di bilancio di materia, definita dalla 5.12, mentre l'equazione cinetica proposta è la bi-Langmuir, eq. 5.30. Le condizioni iniziali ed al contorno sono invece espresse dalle 5.33 – 5.36.

Oltre alle caratteristiche geometriche della membrana (§ 0) e le condizioni operative alle quali sono state eseguite le prove (§ 3.2.1), il modello necessita anche delle capacità massime e delle costanti di dissociazione di Langmuir che definiscono le reazioni di adsorbimento specifico,  $c_{l,1}$  e  $K_{d,1}$ , e non specifico,  $c_{l,2}$  e  $K_{d,2}$ .

Per la determinazione dei quattro parametri di equilibrio ci si è inizialmente basati sui risultati delle prove eseguite in condizioni batch. In particolare, l'adsorbimento di tipo non specifico è stato quantificato tramite esperimenti preliminari con HSA, con una stima della capacità dei legami non specifici,  $c_{l,2}$ , pari a 2.91 mg/ml di membrana solida. Per interpolazione dei dati di equilibrio (Figura 7.6) sono stati determinati i restanti parametri, riassunti in Tabella 7.6.

Tabella 7.6: Parametri dell'isoterma bi-Langmuir determinati tramite interpolazione dei dati di equilibrio in condizioni batch.

$c_{l,1}$ (mg/ml)	$K_{d,1}$ (mg/ml)	$c_{l,2}$ (mg/ml)	$K_{d,2}$ (mg/ml)
2.49	0.036	2.91	0.078

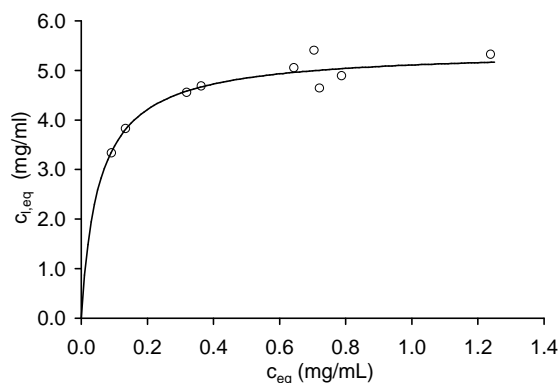


Figura 7.6: Dati di adsorbimento all'equilibrio di IgG umana su membrane A2P–Sartoepoxy. Esperimenti eseguiti in condizioni statiche.

Si ricorda che questo sistema ha evidenziato una capacità dinamica diversa rispetto quella determinata in condizioni statiche, oltre a mostrare un calo della capacità stessa con il susseguirsi dei cicli [7]. Dunque, se da un lato possono essere ritenuti validi i valori delle costanti di dissociazione di Langmuir riportati in Tabella 7.6, sono certamente inadeguati i corrispondenti valori di capacità di legame.

Il problema è stato aggirato introducendo i parametri  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , che esprimono il rapporto tra la capacità di adsorbimento specifica/non specifica e la capacità totale [8], in simboli:

$$\beta_i = \frac{c_{l,i}}{c_l} \quad \text{dove } i=1,2 \quad 7.3$$

Chiaramente, la somma dei due rapporti è pari all'unità.

Attraverso i parametri  $\beta_i$  è possibile riscrivere l'isoterma bi-Langmuir nella seguente forma:

$$c_s = \frac{c_l \beta_1 c_0}{K_{d,1} + c_0} + \frac{c_l \beta_2 c_0}{K_{d,2} + c_0} \quad 7.4$$

Limitatamente al primo ciclo, si può ragionevolmente supporre che i rapporti  $\beta_i$  in condizioni batch e dinamiche siano tra loro coincidenti. Sostituendo quindi la capacità dinamica sperimentale,  $DBC_{100\%}$ , alla concentrazione di proteina nella fase stazionaria,  $c_s$ , è possibile calcolare la capacità massima totale in condizioni dinamiche per il primo ciclo di utilizzo delle membrane:

$$c_l = \frac{DBC_{100\%}}{(1-\epsilon)} \frac{1}{c_0} \left( \frac{\beta_1 (K_{d,2} + c_0) + \beta_2 (K_{d,1} + c_0)}{(K_{d,1} + c_0)(K_{d,2} + c_0)} \right) \quad 7.5$$

da cui attraverso la 7.3 si ricavano le capacità massime specifica,  $c_{l,1}$ , e non specifica  $c_{l,2}$ , in condizioni dinamiche.

Tramite questo artificio e relativamente al primo ciclo di utilizzo, gli unici parametri incogniti sono le due costanti cinetiche di adsorbimento,  $k_{a,i}$ , che rappresentano quindi i parametri aggiustabili del modello.

Il calo di capacità che si riscontra nei cicli successivi è dovuto al fatto che non si riesce a recuperare tutta la proteina precedentemente adsorbita. È ovvio che il valore dei rapporti  $\beta_i$  è diverso rispetto quello del primo ciclo, ma una loro quantificazione sperimentale è praticamente impossibile. Pertanto nei cicli successivi al primo si considera la capacità di legame specifica,  $c_{l,1}$ , il solo

parametro aggiustabile del modello, le costanti cinetiche di adsorbimento sono quelle ottenute per il primo ciclo e la capacità non specifica,  $c_{l,2}$ , è calcolata a partire dalla capacità dinamica sperimentale attraverso l'isoterma bi-Langmuir:

$$\frac{DBC_{100\%}}{(1-\epsilon)} = \frac{c_{l,1}c}{K_{d,1} + c} + \frac{c_{l,2}c}{K_{d,2} + c} \quad 7.6$$

Una volta chiarita la strategia utilizzata per generare le simulazioni ed il numero dei parametri aggiustabili considerati, si possono commentare i risultati del modello.

In Tabella 7.7 sono riportati i volumi del PFR e del CSTR stimati con il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (eq. 5.10).

Tabella 7.7: Volumi del PFR e del CSTR del modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna.

$V_{PFR}$ (ml)	$V_{CSTR}$ (ml)	$V_{sis}$ (ml)
3.65	2.98	6.63

Gli esperimenti sono stati condotti a due diverse portate, 0.5 e 1 ml/min, ed a due diverse concentrazioni di IgG nell'alimentazione, 0.25 e 0.5 mg/ml. I primi cicli eseguiti alle quattro condizioni operative sono stati considerati contemporaneamente per un stima più accurata delle due costanti cinetiche di adsorbimento; i rispettivi valori sono riportati in Tabella 7.8, mentre in Figura 7.7 sono mostrati i profili delle simulazioni in termini adimensionali.

Tabella 7.8: Costanti cinetiche di adsorbimento per la reazione specifica e non specifica. Unità di misura:  $\text{ml mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

$k_{a,1}$	$k_{a,2}$
$60.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.84 \cdot 10^{-2}$	$14.16 \pm 0.78$

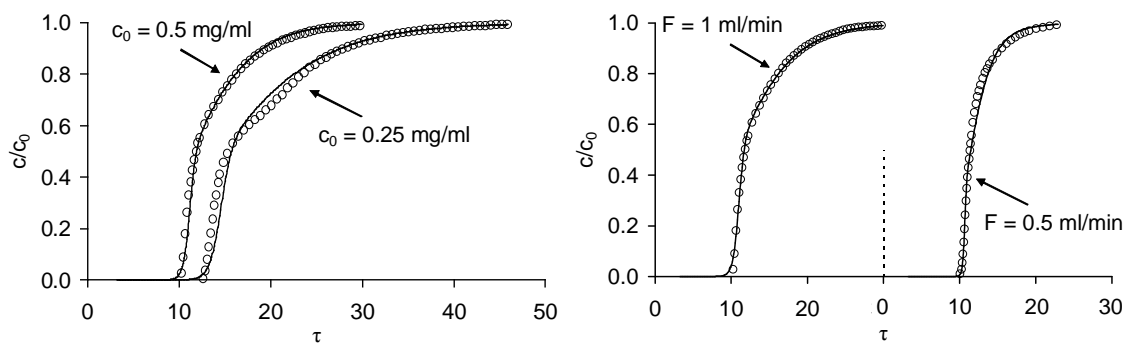


Figura 7.7: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) per il primo ciclo di utilizzo delle membrane. Nel grafico a sinistra la portata è fissa e pari a 1 ml/min, in quello di destra la concentrazione di IgG nell'alimentazione è pari a 0.5 mg/ml.

Le simulazioni sono in grado di descrivere i dati sperimentali di adsorbimento con estrema precisione per tutte le condizioni operative analizzate. Da notare che questo risultato è ottenuto considerando solo due parametri aggiustabili. Come già previsto dall'osservazione dei dati sperimentali nel § 3.2.1, la costante cinetica per l'adsorbimento non specifico è maggiore rispetto quella per l'adsorbimento specifico, confermando il fatto che le interazioni non specifiche sono più veloci. A tal proposito risulta interessante confrontare i tempi caratteristici dei fenomeni coinvolti. A seconda della concentrazione di IgG nell'alimentazione, la reazione di adsorbimento specifico ha un tempo caratteristico compreso tra 200 e 400 secondi, mentre quello per l'adsorbimento non specifico può variare tra 8.5 e 17 secondi. Il tempo caratteristico per la convezione si colloca esattamente in mezzo, con valori nell'intervallo tra 52 e 104 secondi, a seconda della portata considerata. Dunque si può concludere affermando che, nelle condizioni operative esaminate, la reazione di tipo non specifico può essere considerata all'equilibrio, mentre la reazione specifica è lenta rispetto alla convezione e non può essere supposta all'equilibrio.

I risultati del modello per i cicli successivi al primo sono mostrati in Figura 7.8, mentre i parametri aggiustabili sono riassunti in Tabella 7.9. Anche nella descrizione dei cicli successivi al primo il modello è in ottimo accordo con i dati sperimentali.

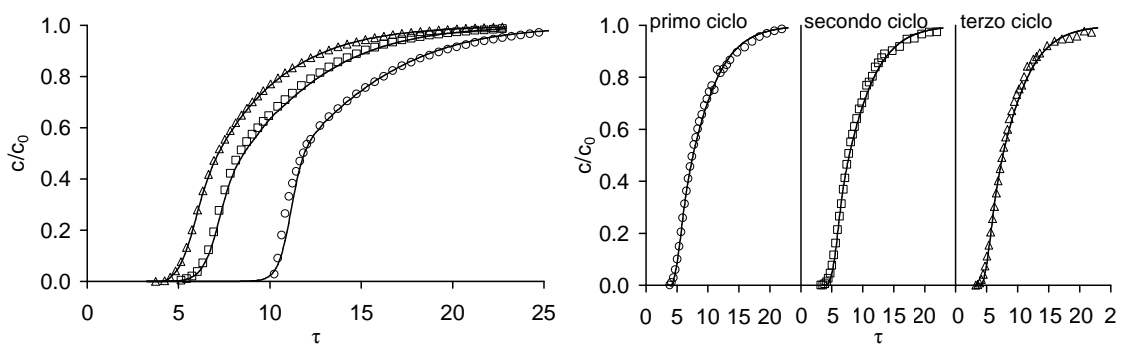


Figura 7.8: Simulazioni generate dal modello (—) e risultati sperimentali per il primo ciclo (o), il secondo ciclo ( $\square$ ) ed il terzo ciclo ( $\Delta$ ) prima della rigenerazione (a sinistra) e dopo la rigenerazione (a destra).  $F = 1 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 0.5 \text{ mg/ml}$ .

La capacità dinamica decresce con il susseguirsi dei cicli, sia per la reazione specifica che per quella non specifica. Il calo di capacità è evidente soprattutto tra il primo ed il secondo ciclo, ed è meno pronunciato per la capacità specifica (Figura 7.9). Come già evidenziato sperimentalmente, con la fase rigenerazione le membrane non riacquistano la capacità originale.

Tabella 7.9: Capacità ottenute dall'interpolazione dei dati sperimentali. Unità di misura: mg/ml di membrana solida.

$F = 0.5 \text{ ml/min}, c_0 = 0.5 \text{ mg/ml}$	ciclo 1	ciclo 2		ciclo 3	ciclo 4	ciclo 5
$c_{l,1}$	2.13	1.32	rigenerazione	0.63	0.85	0.60
$c_{l,2}$	2.48	0.39		0.67	0.09	0.16
$c_l$	4.61	1.71		1.30	0.94	0.76

$F = 0.5 \text{ ml/min}, c_0 = 0.25 \text{ mg/ml}$	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3		ciclo 4	ciclo 5
$c_{l,1}$	2.33	0.56	0.90	rigenerazione	0.30	0.84
$c_{l,2}$	2.71	0.46	0.02		0.38	0.23
$c_l$	5.04	1.02	0.92		0.68	1.07

$F = 1 \text{ ml/min}, c_0 = 0.5 \text{ mg/ml}$	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3		ciclo 4	ciclo 5	ciclo 6
$c_{l,1}$	2.65	1.47	0.42	rigenerazione	0.96	1.08	0.86
$c_{l,2}$	3.09	0.85	0.30		0.17	0.29	0.20
$c_l$	5.74	2.32	0.72		1.13	1.37	1.06

$F = 1 \text{ ml/min}, c_0 = 0.25 \text{ mg/ml}$	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3		ciclo 4	ciclo 5	ciclo 6
$c_{l,1}$	2.89	1.19	0.85	rigenerazione	0.97	0.44	0.77
$c_{l,2}$	3.37	1.12	0.58		1.01	0.86	0.52
$c_l$	6.26	2.31	1.43		1.98	1.30	1.29

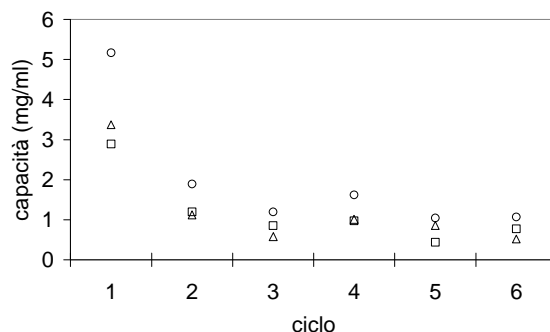


Figura 7.9: Andamento della capacità dinamica totale (o), specifica (□) e non specifica (Δ) con il susseguirsi dei cicli.  $F = 1 \text{ ml/min}, c_0 = 0.25 \text{ mg/ml}$ .

## 7.4 Modellazione dell'adsorbimento di IgG umana su membrane SartoAIMs Protein A

I sistemi più interessanti su cui eseguire uno studio di modellazione sono sicuramente quelli in cui è stata condotta un'estesa caratterizzazione dinamica, come ad esempio per le membrane SartoAIMs ProteinA.

Il modello è stato calibrato facendo riferimento alle prove eseguite con soluzioni pure di IgG (§ 3.4.1.1), dopodiché è stato applicato per descrivere i dati

sperimentali ottenuti alimentando il surnatante industriale (§ 3.4.1.2). Oltre ad estendere la trattazione teorica su miscele multicomponenti, il modello è stato usato per descrivere anche le fasi di lavaggio ed eluizione.

Il modello che è stato applicato è quello cinetico con parametro globale, che riunisce tutti i fattori cinetici e di trasporto presenti nella colonna nella costante cinetica di adsorbimento,  $k_a$ . In questo modello, per primo proposto da Giddins e Byring [9] e anche ultimamente applicato da altri autori [10, 11], la costante cinetica di adsorbimento è da considerarsi apparente e perde quindi l'usuale significato fisico. Nell'equazione di bilancio di materia, eq. 5.12, è stato quindi ommesso il termine diffusivo, e la cinetica di reazione impiegata è quella di Langmuir, eq. 5.19. Le condizioni iniziali ed al contorno sono espresse dalle 5.33 – 5.36 per la fase di adsorbimento, dalle 5.40 – 5.43 nella fase di lavaggio e dalle 5.50, 5.52 – 5.54 durante l'eluizione. La cinetica di reazione scelta in questa fase è del primo ordine irreversibile, eq. 6.54, in cui sono inclusi gli effetti della dispersione nei volumi esterni alla colonna secondo quanto descritto nel § 6.3. Chiaramente, anche in questa fase la costante cinetica presente nel modello è apparente.

In Tabella 7.10 sono riportati i volumi del PFR e del CSTR stimati con il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (eq. 5.10). Dato l'ampio intervallo di portate studiato, da 1 a 10 ml/min, si è ritenuto opportuno esprimere il volume del PFR in funzione della portata (§ 7.1).

Tabella 7.10: Volumi del PFR e del CSTR del modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna. F in ml/min.

$V_{PFR}$ (ml)	$V_{CSTR}$ (ml)
$1.55 + 0.03 \times F$	0.63

### 7.4.1 Soluzioni di IgG pura

Nelle prove condotte con soluzioni di IgG pura, queste membrane hanno mostrato una leggera dipendenza della capacità dinamica dalla portata; inoltre le curve di adsorbimento sono molto allargate, soprattutto nella zona finale. Com'è noto, il modello di Langmuir non è in grado di descrivere curve di breakthrough asimmetriche [12]. Per seguire l'intero andamento della curva sperimentale si potrebbero supporre meccanismi di reazione che includono l'impedimento sterico [13] o l'adsorbimento multistrato [14], oppure la presenza di pori ciechi nelle membrane [15]. Tuttavia, l'uso di un parametro cinetico globale fa già perdere parte del senso fisico del problema, quindi è inutile complicare ulteriormente il modello con fenomeni poco chiari e sui quali si hanno poche informazioni al riguardo. Inoltre, dal punto di vista industriale, la porzione iniziale della curva di

breakthrough è quella più importante, quindi si è scelto di trascurare la parte terminale dell'adsorbimento e di approssimare i dati sperimentali fino ad una concentrazione in uscita pari all'80% della concentrazione di IgG nell'alimentazione. In questo modo si riesce a descrivere la maggior parte della curva di adsorbimento con un modello semplice e veloce. Lo svantaggio di questa strategia è quello di dover considerare la capacità dinamica come un ulteriore parametro aggiustabile, dato che le aree sottese delle curve sperimentali e simulate non coincidono. L'altro parametro aggiustabile del modello è ovviamente la costante cinetica di adsorbimento, che come si è già detto, funge da parametro globale. La costante di dissociazione di Langmuir è stata posta pari a 0.01 mg/ml in tutte le simulazioni. Questa scelta è stata dettata dall'osservazione che le simulazioni nella fase di adsorbimento sono molto poco influenzate da questo parametro [16]. La curva di lavaggio presenta invece una forte dipendenza dalla costante di dissociazione di Langmuir, e 0.01 mg/ml è il valore che meglio approssima i risultati sperimentali [17]. Nella fase di eluizione, infine, l'unico parametro aggiustabile è la costante cinetica (di eluizione), che anche in questo caso rappresenta il parametro globale che comprende tutti i fenomeni di trasporto e cinetici.

L'insieme dei dati è stato suddiviso in quattro gruppi, ognuno contenente i risultati delle prove ad uguale portata. I parametri aggiustabili sono stati determinati per interpolazione delle simulazioni sui dati di ogni gruppo (Tabella 7.11). A titolo di esempio, in Figura 7.10 e Figura 7.11 sono mostrati alcuni confronti tra le simulazioni e i dati sperimentali nelle fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione.

Tabella 7.11: Valori dei parametri aggiustabili del modello.

$F$ (ml/min)	1	2	5	10
$c_l$ (mg/ml)	$20.18 \pm 0.02$	$19.07 \pm 0.01$	$16.88 \pm 0.01$	$15.36 \pm 0.01$
$k_a$ (ml mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$0.597 \pm 0.002$	$1.228 \pm 0.003$	$3.314 \pm 0.008$	$6.304 \pm 0.017$
$k_e$ (min <sup>-1</sup> )	$2.71 \pm 0.02$	$4.19 \pm 0.02$	$9.49 \pm 0.05$	$15.44 \pm 0.08$

Nonostante la sua semplicità, il modello usato è in grado di descrivere tutte le fasi del processo di cromatografia con membrane di affinità. La capacità dinamica stimata diminuisce con la portata in modo confrontabile con quanto osservato sperimentalmente, con un calo del 24% tra gli esperimenti condotti ad 1 e 10 ml/min. Particolarmente interessante è l'andamento delle due costanti cinetiche con la portata, che risulta quasi perfettamente lineare, con coefficienti di correlazione pari a 0.991 per la cinetica di eluizione e addirittura 0.999 per la cinetica di adsorbimento (Figura 7.12). Anche altri autori hanno riscontrato una variazione della costante cinetica di adsorbimento apparente con la portata [11,



18]. Siffatta dipendenza non è giustificata nel caso in cui si tratti la costante cinetica pura e non apparente come nel caso qui considerato.

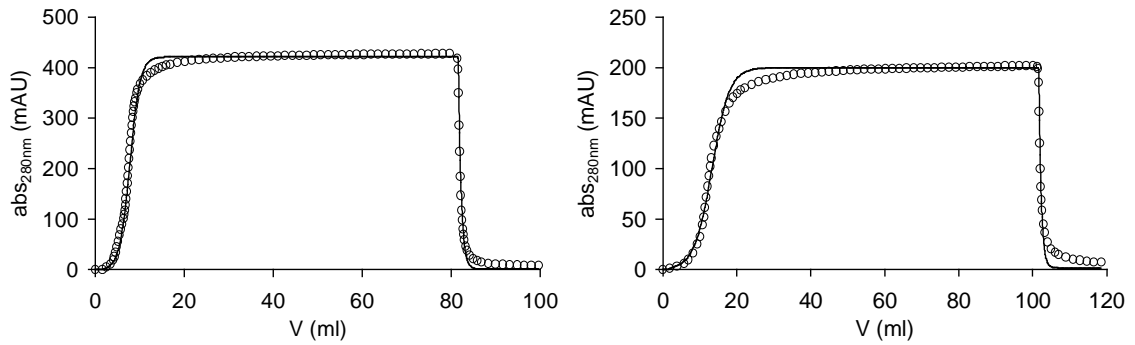


Figura 7.10: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (–) nelle fasi di adsorbimento e lavaggio.  $F = 1 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 1.48 \text{ mg/ml}$  (a sinistra);  $F = 2 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 0.70 \text{ mg/ml}$  (a destra).

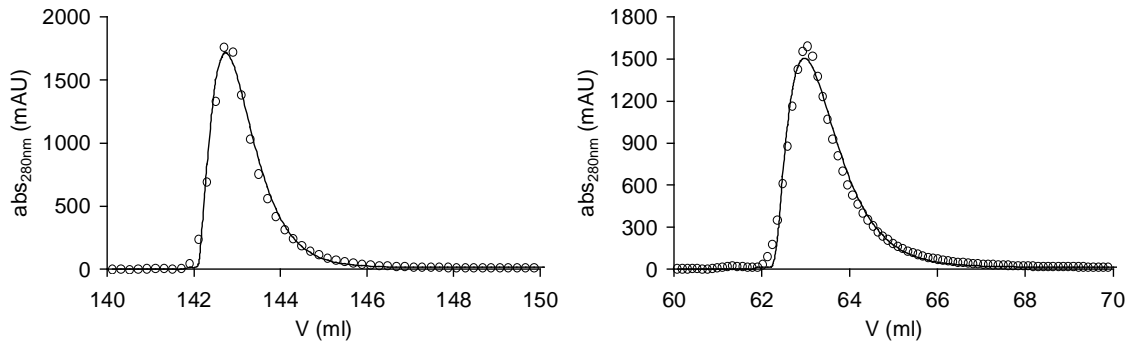


Figura 7.11: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (–) nella fase di eluizione.  $F = 5 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 0.17 \text{ mg/ml}$  (a sinistra);  $F = 10 \text{ ml/min}$ ,  $c_0 = 1.81 \text{ mg/ml}$  (a destra).

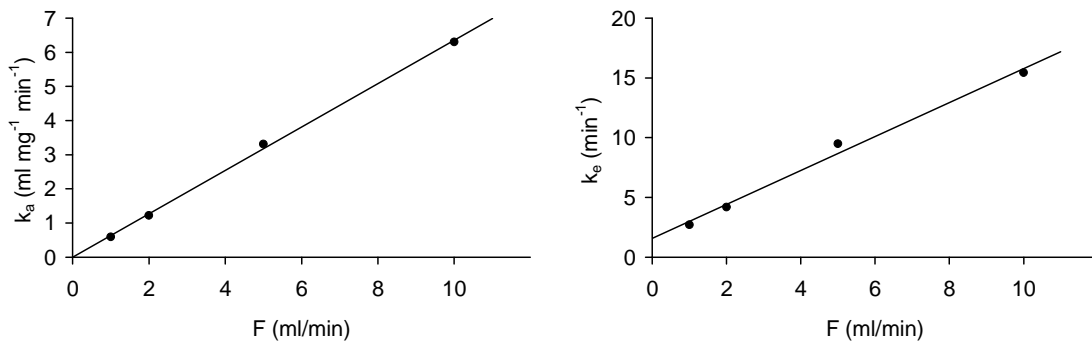


Figura 7.12: Andamento delle costanti cinetiche apparenti di adsorbimento (a sinistra) e di eluizione (a destra) con la portata.

Riportando l'inverso delle costanti cinetiche in funzione del reciproco della portata si possono ricavare alcune informazioni interessanti (Figura 7.13). Si ricorda che le due costanti rappresentano dei parametri globali, in cui sono inclusi tutti i fenomeni cinetici e di trasporto. Il loro inverso corrisponde alla somma delle resistenze associate ai fenomeni coinvolti. A portata infinitamente alta, quindi per

$1/F$  prossimo a zero, il trasporto di materia nello strato limite è sicuramente assente (si veda § 6.2); inoltre se si suppone che il coefficiente di dispersione assiale sia lineare con la velocità (si veda eq. 5.15), per portate tendenti ad infinito il tempo caratteristico per la dispersione assiale,  $\tau_{DL}$ , sarà prossimo a zero. Di conseguenza, alle alte portate il fattore limitante del processo sarà sicuramente costituito dalla reazione.

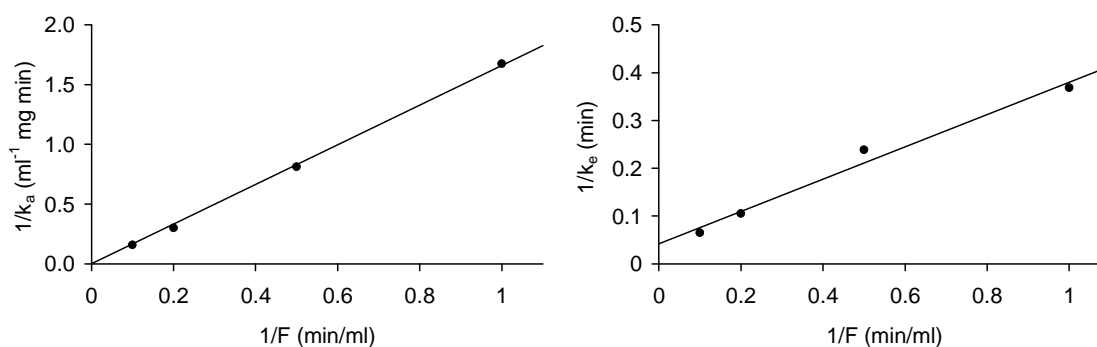


Figura 7.13: Andamento del reciproco delle costanti cinetiche apparenti di adsorbimento (a sinistra) e di eluizione (a destra) con l'inverso della portata.

In Figura 7.13, l'intercetta della retta interpolante i dati cinetici di adsorbimento è pari a zero. Si può quindi affermare che la cinetica di reazione di adsorbimento ha resistenza nulla, quindi non costituisce il fattore limitante del processo e si può ipotizzare che questa reazione raggiunga istantaneamente l'equilibrio. Nel caso dell'eluizione, per portate tendenti ad infinito, ovvero  $1/F$  tendente a zero, la resistenza cinetica non è nulla in quanto la retta interpolante non passa per l'origine degli assi. Dunque è necessario ricordare che in questa fase la cinetica di reazione non può essere considerata all'equilibrio.

## 7.4.2 Surnatante industriale

Nel § 3.4.1.2 è stato osservato che l'unica specie della miscela che interagisce con il supporto è proprio l'IgG, mentre i contaminanti sono trasportati attraverso la colonna dal flusso convettivo. È lecito quindi supporre che il profilo dei contaminanti debba seguire l'andamento delle curve di dispersione [17], mentre per l'IgG è stato applicato il modello con parametro globale usato nel paragrafo precedente.

In Figura 7.14 sono confrontate le curve di dispersione nei volumi esterni alla colonna e i profili sperimentali dei contaminanti. L'ottimo accordo che si può osservare conferma ancora una volta il fatto che i contaminanti non interagiscono con la fase stazionaria, e dunque l'alta selettività delle membrane SartoAIMs ProteinA.

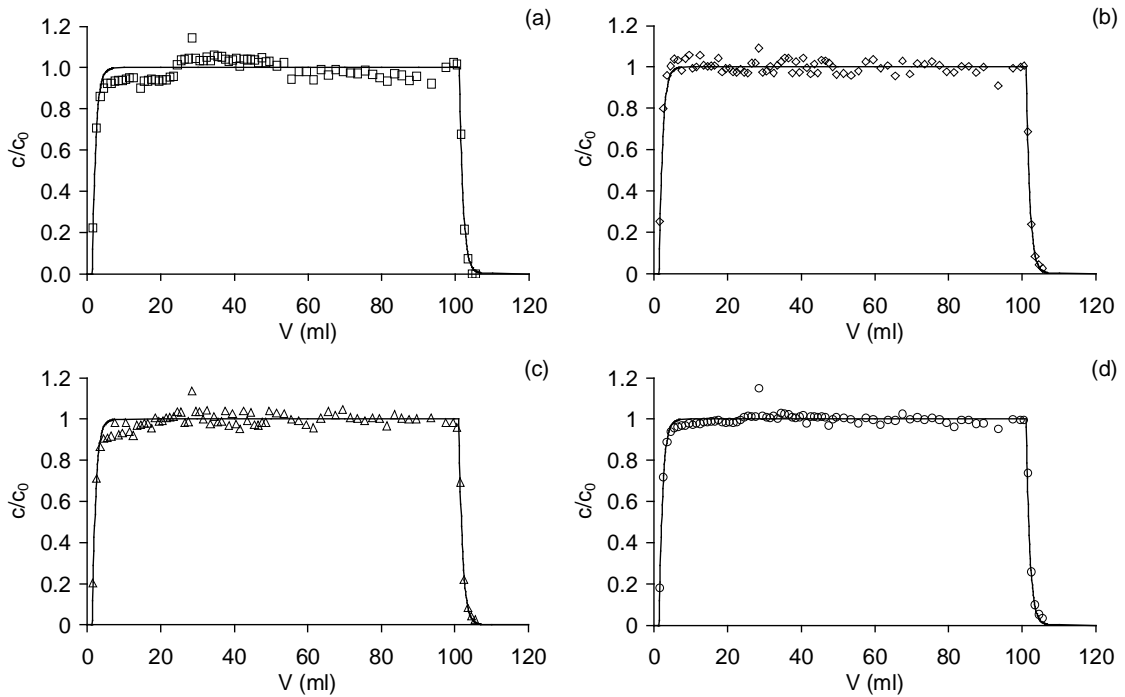


Figura 7.14: Confronto tra i risultati sperimentali dei contaminanti (simboli) e il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna (linea continua) ad una portata di 1 ml/min. Tempi di ritenzione dei contaminanti:  $t_r = 12.2$  min (a),  $t_r = 13.8$  min (b),  $t_r = 14.0$  min (c),  $t_r = 15.9$  min (d).

Le curve di breakthrough misurate nel caso di soluzioni complesse mostrano un allargamento molto più pronunciato nella regione finale rispetto quanto visto nelle prove con soluzioni pure di IgG. Tale differenza è probabilmente legata alle nuove proprietà della soluzione alimentata, e quindi a diversi contributi dei fenomeni cinetici e di trasporto. Per questo motivo l'interpolazione è stata eseguita fino ad una concentrazione pari al 50% della concentrazione di IgG nell'alimentazione anziché fino all'80%.

Per approssimare il profilo sperimentale dell'IgG sono state usate due diverse strategie risolutive: nella prima sono state usate le costanti cinetiche globali determinate nel caso di soluzioni di IgG pura, mentre nella seconda sono stati considerati parametri aggiustabili, per vagliare l'ipotesi di diversi contributi di trasporto e cinetici che possono essere presenti quando si trattano soluzioni complesse.

Le simulazioni condotte secondo il primo metodo hanno restituito dei risultati poco soddisfacenti, mentre il secondo metodo è in grado di garantire un buon accordo tra le simulazioni e i dati sperimentali (Figura 7.15 e Figura 7.16). I parametri aggiustabili usati nelle simulazioni sono riportati in Tabella 7.12.

La capacità di adsorbimento è circa il 40% più bassa rispetto quella stimata nel caso di soluzioni di IgG pura. Questo risultato è legato al maggiore allargamento che presentano le curve di breakthrough nella porzione terminale, che non può

essere descritto dal modello. L'area compresa tra la curva simulata e la curva sperimentale corrisponde a questo calo di capacità.

Le costanti cinetiche di adsorbimento risultano invece un ordine di grandezza più grandi, indice di una minore resistenza dei fenomeni coinvolti nel processo. Questo risultato deve comunque essere considerato con cautela, e studi più approfonditi sono necessari per una maggiore comprensione dell'adsorbimento dell'IgG presente in miscele complesse. Tuttavia, le costanti cinetiche di eluizione hanno stesso ordine di grandezza, come ci si deve aspettare in questa fase. Infatti durante l'eluizione non sono più presenti i contaminanti, e l'influenza della miscela è da reputare trascurabile.

Tabella 7.12: Valori dei parametri aggiustabili del modello.

$F$ (ml/min)	1	5
$c_l$ (mg/ml)	$12.92 \pm 0.03$	$9.58 \pm 0.05$
$k_a$ (ml mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$7.44 \pm 0.35$	$31.29 \pm 2.27$
$k_e$ (min <sup>-1</sup> )	$1.82 \pm 0.02$	$12.22 \pm 0.26$

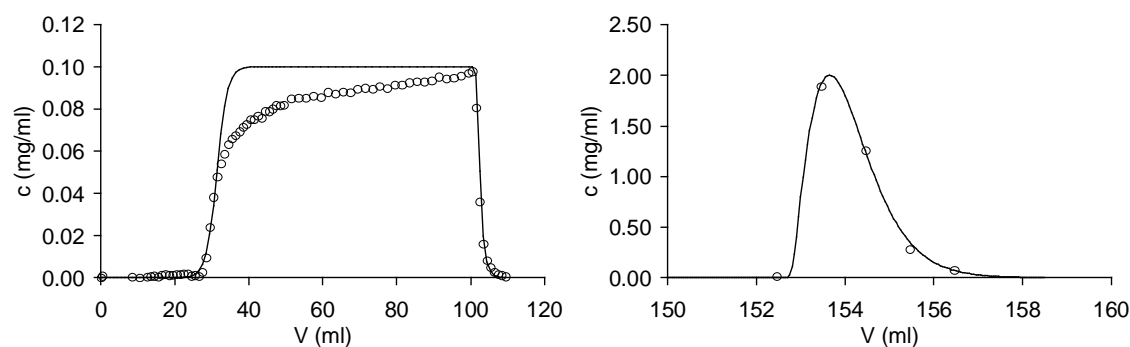


Figura 7.15: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) nelle fasi di adsorbimento e lavaggio (a sinistra) e di eluizione (a destra) per la prova condotta ad 1 ml/min.

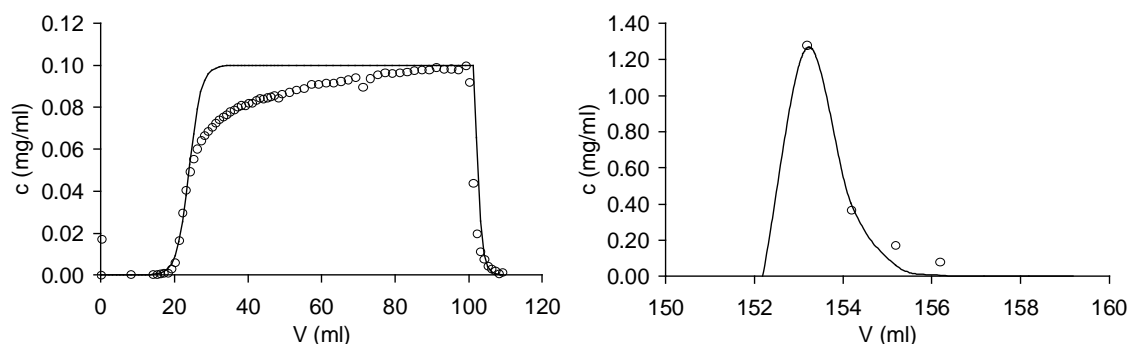


Figura 7.16: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) nelle fasi di adsorbimento e lavaggio (a sinistra) e di eluizione (a destra) per la prova condotta a 5 ml/min.

## 7.5 Modellazione dell'adsorbimento di IgG umana su membrane B14-TA-Sartoepoxy

Come presentato nel § 3.3.2, le membrane B14-TA-Sartoepoxy sono state oggetto di un'ampia caratterizzazione dinamica. L'insieme dei risultati sperimentali ottenuti risulta estremamente utile proseguire nella validazione del modello matematico.

Prima di discutere i risultati del modello e la strategia risolutiva applicata, si riportano i parametri del modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna per il sistema in esame (Tabella 7.13).

Tabella 7.13: Volumi del PFR e del CSTR del modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna. F in ml/min.

$V_{PFR}$ (ml)	$V_{CSTR}$ (ml)
$1.38 + 0.03 \times F$	0.51

### 7.5.1 Soluzioni di IgG pura

La serie di prove condotte sulle membrane B14-TA-Sartoepoxy con soluzioni di IgG pura (§ 3.3.1.1) è stata approssimata con una strategia risolutiva simile a quella presentata nel § 7.4 per le membrane SartoAIMs Protein A.

Anche se le equazioni del modello applicate sono le stesse, la scelta dei parametri aggiustabili è profondamente diversa. Infatti la curva di breakthrough misurata mostra un modesto allargamento nella zona terminale, per cui non è risultato necessario considerare la capacità dinamica come un ulteriore parametro aggiustabile, ma è stato fissato al valore determinato sperimentalmente, 6.38 mg/ml. Anche la costante di dissociazione di Langmuir è stata posta pari al valore sperimentale, 0.041 mg/ml.

Le curve di breakthrough sperimentali sono state approssimate dal modello utilizzando la costante cinetica di adsorbimento apparente come parametro aggiustabile; analogamente, nella fase di eluizione la relativa costante cinetica apparente è considerata il parametro aggiustabile del modello. Anche se formalmente i parametri aggiustabili sono due, bisogna ricordare che le fasi di adsorbimento e di eluizione sono descritte da equazioni profondamente diverse, quindi in realtà il parametro aggiustabile è solo uno per ciascuna fase considerata.

Nel § 3.3.1.1 è stato osservato che le curve dei cicli di affinità nella fase di lavaggio si sovrappongono alle curve di dispersione, e dunque si è ipotizzato che in questa fase i fenomeni cinetici siano trascurabili rispetto quelli di trasporto. Dunque l'equazione cinetica impiegata per descrivere il lavaggio è la 5.37.

Considerato che i fenomeni di trasporto dipendono dalla portata, è chiaro che i valori interpolati dei due parametri aggiustabili siano a sua volta variabili con la velocità di alimentazione. Gli esperimenti sono stati dunque suddivisi in gruppi ad uguale portata, ed i parametri aggiustabili sono stati valutati di volta in volta per interpolazione su tutti gli esperimenti appartenenti ad ogni gruppo.

In Figura 7.17 sono riportati alcuni confronti caratteristici tra i risultati sperimentali e le simulazioni in una varietà di diverse condizioni operative, mentre in Tabella 7.14 sono riassunti i valori dei parametri aggiustabili stimati.

Si può notare un ottimo accordo tra simulazioni e dati sperimentali. Tutte le fasi cromatografiche sono state descritte tramite l'utilizzo di due soli parametri aggiustabili, con un errore relativo medio del 4.9%. Visto l'ampio intervallo di condizioni sperimentali analizzate, si può considerare validato il modello, che può pertanto essere usato in via del tutto previsionale per studiare il comportamento del sistema.

Tabella 7.14: Valori dei parametri aggiustabili del modello.

$F$ (ml/min)	1	2	5	10
$k_a$ (ml mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	3.20 ± 0.01	7.05 ± 0.02	16.97 ± 0.05	27.06 ± 0.07
$k_c$ (min <sup>-1</sup> )	1.70 ± 0.01	2.65 ± 0.01	5.96 ± 0.03	9.18 ± 0.05

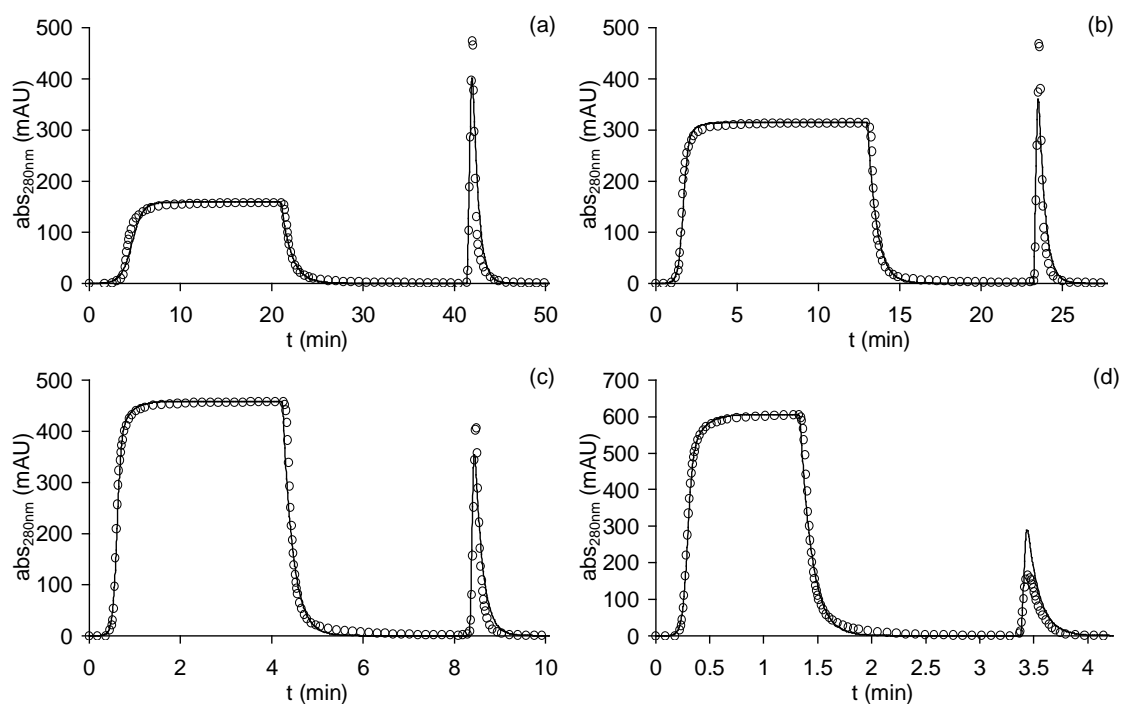


Figura 7.17: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) nella fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluizione. Condizioni operative: a)  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.56$  mg/ml; b)  $F = 2$  ml/min,  $c_0 = 1.11$  mg/ml; c)  $F = 5$  ml/min,  $c_0 = 1.61$  mg/ml; d)  $F = 10$  ml/min,  $c_0 = 2.13$  mg/ml.

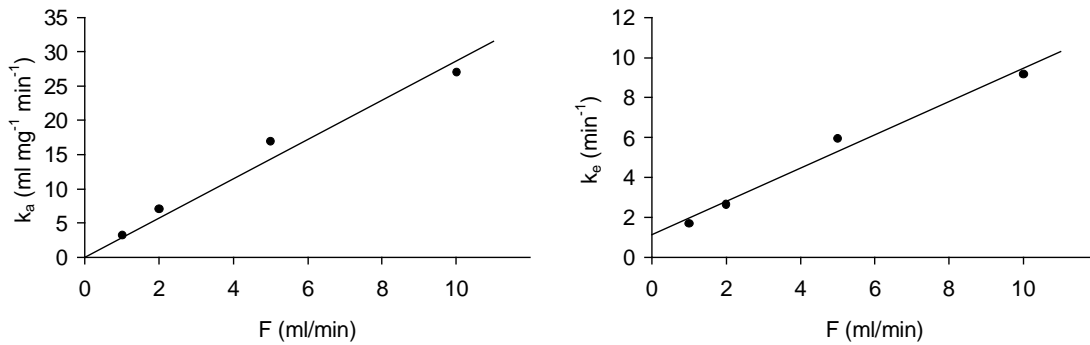


Figura 7.18: Andamento delle costanti cinetiche apparenti di adsorbimento (a sinistra) e di eluizione (a destra) con la portata.

I parametri aggiustabili ottenuti sono in buona approssimazione lineari con la portata (Figura 7.18), come già osservato per le membrane SartoAIMs ProteinA (Figura 7.12).

La proporzionalità diretta tra la costante di adsorbimento apparente e la portata è una diretta conseguenza della combinazione dell'insieme di equazioni usate e dei risultati sperimentali. Per questa dimostrazione si farà riferimento alle grandezze adimensionali definite dalle 5.59 – 5.67.

Ad una data concentrazione nell'alimentazione, è stato osservato che le curve di adsorbimento misurate con le membrane B14-TA-Sartoepoxy sono indipendenti dalla portata (Figura 3.15). L'andamento riportato in Figura 3.15 rimane qualitativamente invariato se negli assi vengono usate le corrispondenti variabili non dimensionali  $\tau$  e  $c^*$ . Il cambio di variabile che trasforma il volume in tempo adimensionale è infatti operato mediante la costante moltiplicativa  $1/LS_t\epsilon^1$ , mentre nell'asse delle ordinate la concentrazione è adimensionalizzata mediante moltiplicazione con il fattore  $1/c_0$ . Tali trasformazioni modificano le unità di misura degli assi, ma non l'andamento qualitativo degli elementi rappresentati nel sistema di riferimento. Dunque si può concludere che anche le curve di adsorbimento riportate in termini adimensionali sono indipendenti dalla portata.

Il bilancio di materia e l'equazione cinetica adoperate per generare le simulazioni in termini adimensionali assumono la seguente forma:

$$\frac{\partial c^*}{\partial \tau} + \frac{\partial c^*}{\partial \zeta} = -m \frac{\partial c_s^*}{\partial \tau} \quad 7.7$$

$$\frac{\partial c_s^*}{\partial \tau} = \frac{n}{m} c^* (1 - c_s^*) - \frac{n}{m(r-1)} c_s^* \quad 7.8$$

<sup>1</sup>  $\tau = \frac{t}{L} v = \frac{t}{L} \frac{F}{S_t \epsilon} = \frac{V}{LS_t \epsilon}$

Per una fissata concentrazione, affinché queste equazioni siano in grado di rappresentare tutti risultati sperimentali i numeri adimensionali  $n$ ,  $m$  ed  $r$  devono rimanere costanti per qualsiasi valore della portata considerata. Per  $m$  ed  $r$  questa condizione è automaticamente verificata, essendo invariate le proprietà della membrana  $\varepsilon$ ,  $L$ ,  $c_1$  e  $K_d$ . Invece  $n$  può essere costante solo se lo è anche il rapporto  $k_a/v$ . Ecco quindi dimostrato il perché il modello restituisce dei valori di costante cinetica di adsorbimento apparente direttamente proporzionali con la portata.

Nella fase di eluizione si può fare un ragionamento del tutto simile. Bisogna a questo proposito tenere presente che i picchi di eluizione non sono sovrapposti al variare della portata (Figura 3.16), per cui la costante cinetica di eluizione è linearmente dipendente dalla portata ma non direttamente proporzionale alla portata stessa.

Queste osservazioni sono il punto di partenza per le simulazioni condotte per modellare i dati sperimentali ottenuti con le membrane B14-TA-Epoxy2, che saranno descritte nel § 7.6.

## 7.5.2 Surnatante industriale

I dati sperimentali relativi a prove di adsorbimento eseguite con il surnatante industriale sono stati descritti matematicamente usando ancora una volta il modello con parametro cinetico globale.

In queste prove, le membrane B14-TA-Sartoepoxy hanno mostrato una capacità di adsorbimento inferiore rispetto quella ottenuta alimentando soluzioni di IgG pura (§ 3.3.1.2), per cui è stata usata la capacità dinamica sperimentale per valutare la capacità massima secondo un procedimento simile a quanto già fatto nel § 7.2.

A differenza di quanto notato nelle prove condotte con le membrane SartoAIMS ProteinA, per le membrane B14-TA-Sartoepoxy la curva di adsorbimento non manifesta un particolare allargamento nel tratto terminale. Si può quindi ragionevolmente supporre che le entità dei fenomeni di trasporto e cinetici siano identiche sia negli esperimenti eseguiti con soluzioni di IgG pura che nel caso di surnatante industriale. Conseguentemente, le simulazioni sono state eseguite senza l'uso di parametri aggiustabili, e i valori delle costanti cinetiche apparenti di adsorbimento e di eluizione utilizzati sono stati acquisiti dalle simulazioni condotte con soluzioni di IgG pura, già riportati in Tabella 7.14.

Bisogna enfatizzare il fatto che i confronti tra i risultati sperimentali e le simulazioni sono in ottimo accordo tra loro, come evidenziato in Figura 7.19. Il modello proposto è quindi in grado di descrivere i dati sperimentali ottenuti con soluzioni complesse in via completamente predittiva, senza la necessità di parametri aggiustabili.



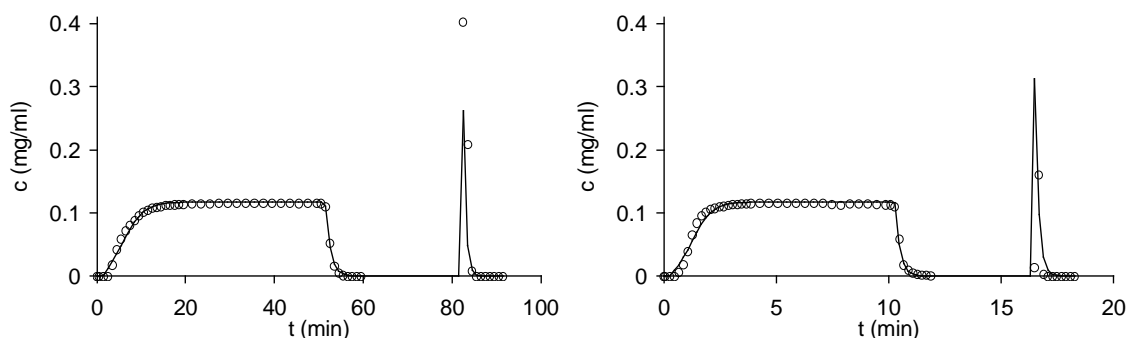


Figura 7.19: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) nelle fasi di adsorbimento, lavaggio ed eluzione per la prova condotta ad 1 ml/min (a sinistra) ed a 5 ml/min (a destra).

## 7.6 Adsorbimento di IgG umana su membrane B14-TA-Epoxy2: modello dispersivo di equilibrio

Anche per queste membrane è stata condotta un'estesa caratterizzazione dinamica (§ 3.3.2), per cui i risultati sperimentali si prestano bene per un accurato studio di modellazione.

Nei precedenti paragrafi è sempre stato applicato il modello di trasporto in cui il termine dispersivo è stato trascurato. In letteratura questo modus operandi è molto condiviso, sia nel caso di membrane [19, 20] che di resine impaccate [21, 22]. Tuttavia questo termine è di fondamentale importanza, e solo dopo un'attenta verifica può essere ignorato.

In effetti, alcuni esperimenti preliminari condotti con un modulo cromatografico per monoliti hanno evidenziato la presenza di importanti fenomeni di tipo dispersivo. Questa indicazione ha fatto supporre che anche nei sistemi cromatografici con membrane il termine di dispersione assiale debba essere considerato.

In Tabella 7.15 si riporta per completezza il risultato dei parametri necessari nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna.

Tabella 7.15: Volumi del PFR e del CSTR del modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna.  $F$  in ml/min.

$V_{PFR}$ (ml)	$V_{CSTR}$ (ml)
$1.75 + 0.03 \times F$	0.69

### 7.6.1 Soluzioni di IgG pura

I dati sperimentali ottenuti per questo sistema hanno mostrato che la curva di adsorbimento è praticamente indipendente dalla portata (Figura 3.26), dunque,

secondo quanto introdotto nei § 7.4.1 e 7.5.1, si può ipotizzare che la reazione di adsorbimento sia all'equilibrio. Se si suppone valido il meccanismo di reazione di Langmuir, l'equazione cinetica 5.19 in condizioni di equilibrio si riduce alla 5.21. Derivando questa espressione rispetto al tempo si ottiene:

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = \frac{c_l K_d}{(c + K_d)^2} \frac{\partial c}{\partial t} \quad 7.9$$

Tale espressione rappresenta il termine generativo presente nell'equazione di bilancio di materia. Per sostituzione nell'equazione di trasporto (eq. 5.12) si ottiene:

$$\frac{\partial c}{\partial t} \left[ 1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{c_l K_d}{(c + K_d)^2} \right] + v \frac{\partial c}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad 7.10$$

e nel caso in cui venisse trascurata la dispersione assiale, l'equazione di bilancio assumerebbe la seguente forma:

$$\frac{\partial c}{\partial t} \left[ 1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{c_l K_d}{(c + K_d)^2} \right] + v \frac{\partial c}{\partial z} = 0 \quad 7.11$$

a cui devono essere associate le seguenti condizioni iniziali ed al contorno:

$$c = 0 \quad \text{per } z \geq 0, \quad t = 0 \quad 7.12$$

$$c = c_{in} \quad \text{per } z = 0, \quad t > 0 \quad 7.13$$

Dal punto di vista matematico, la 7.11 è un'equazione differenziale iperbolica non lineare, e si può verificare che, con le condizioni espresse dalle 7.12 e 7.13, la sua soluzione deve ammettere un fronte d'urto [23]. In termini pratici, se si applica questa equazione alla fase di adsorbimento il profilo di concentrazione risultante sarà un gradino, con un salto pressoché istantaneo da 0 a  $c_0$  in corrispondenza della saturazione della colonna. Siffatta soluzione è chiaramente inadeguata per descrivere i dati sperimentali, in cui il profilo di concentrazione ha un andamento piuttosto regolare.

Sembra chiaro dunque che il termine dispersivo non possa essere trascurato. In molti lavori presenti in letteratura [24, 25] il termine dispersivo viene approssimato sostituendo il coefficiente di dispersione assiale con il coefficiente di diffusione molecolare. Questa posizione è piuttosto grossolana, in quanto i due coefficienti possono essere diversi tra loro di svariati ordini di grandezza [26].

L'equazione usata per descrivere i dati sperimentali di adsorbimento è per l'appunto la 7.10, in cui le condizioni al contorno sono espresse dalle 5.33, 5.35, e 5.36. Non è più necessaria la condizione iniziale sulla concentrazione di proteina nella fase stazionaria, che può essere determinata direttamente dalla relazione dell'isoterma di Langmuir (eq. 5.21).

Il coefficiente di dispersione della colonna cromatografica,  $D_L$ , può essere determinato per via teorica attraverso il metodo dei momenti (§ 5.2), ma la sua applicabilità pratica è limitata dagli errori strumentali dovuti al rumore del segnale registrato [27] e dai contributi degli elementi esterni [28]. Si è pensato allora di usare il coefficiente di dispersività,  $\alpha$ , come parametro aggiustabile del modello.

La costante di dissociazione di Langmuir usata nelle simulazioni è pari a quella determinata sperimentalmente, ovvero 0.037 mg/ml, mentre la capacità di adsorbimento è stata considerata un parametro aggiustabile. Infatti anche in queste prove è stato registrato un evidente allargamento della curva di breakthrough nella porzione terminale, per cui il fitting dei dati è limitato all'80% della concentrazione nell'alimentazione. Per una maggiore precisione nella stima dei parametri aggiustabili (Tabella 7.16), tutti i 20 cicli sperimentali sono stati interpolati contemporaneamente.

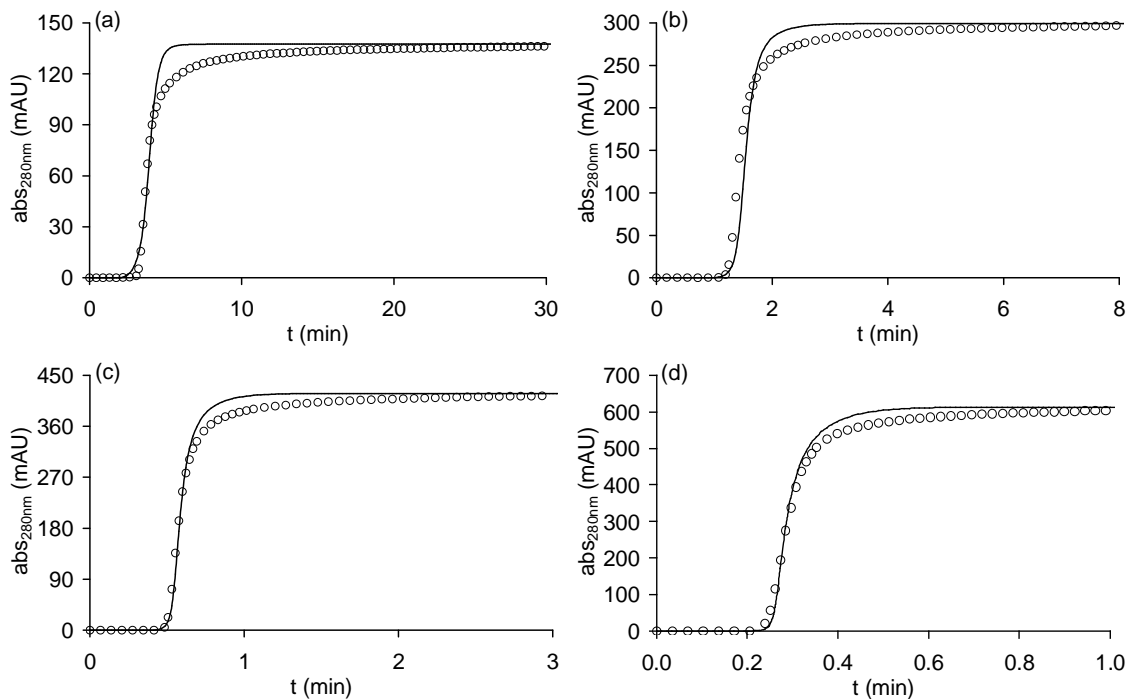


Figura 7.20: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) nella fase di adsorbimento. Condizioni operative: a)  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.48$  mg/ml; b)  $F = 2$  ml/min,  $c_0 = 1.05$  mg/ml; c)  $F = 5$  ml/min,  $c_0 = 1.47$  mg/ml; d)  $F = 10$  ml/min,  $c_0 = 2.15$  mg/ml.

Tabella 7.16: Parametri aggiustabili ottenuti per interpolazione dei dati sperimentali di adsorbimento.

$c_i$ (mg/ml)	$\alpha$ (cm)
$4.37 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.03$

Il modello è in grado di descrivere perfettamente la porzione iniziale della curva di breakthrough in tutte le condizioni operative analizzate, come si può notare negli esempi riportati in Figura 7.20, L'errore commesso nell'approssimazione è mediamente del 5.0%. Data la mole di dati sperimentali e l'ampio intervallo di condizioni operative studiate, si può affermare che il modello proposto è valido per l'adsorbimento di IgG umana su membrane B14-TA-Epoxy2.

Il coefficiente di dispersività interpolato sui dati sperimentali può essere utile per il calcolo del numero di Péclet assiale<sup>2</sup>:

$$Pe = \frac{L}{\alpha} \quad 7.14$$

Nel caso in esame il numero di Péclet assiale è pari a 0.37. Si ricorda che il numero di Péclet è una stima del rapporto tra il tempo caratteristico per la dispersione assiale e per la convezione. Dunque se il numero di Péclet è prossimo all'unità, entrambi i fenomeni sono ugualmente importanti, e devono essere considerati contemporaneamente, a dimostrazione del fatto che il termine dispersivo non possa essere trascurato.

Le curve di eluizione hanno invece mostrato un allargamento progressivo con l'aumentare della portata (Figura 3.27), quindi questa fase non può essere considerata all'equilibrio e non possono estese le considerazioni fatte per l'adsorbimento. Inoltre si osserva che la fase di eluizione ha un leggero ritardo rispetto alle curve di dispersione nei volumi esterni alla colonna. È probabile quindi che la reazione di desorbimento avvenga solo dopo che la concentrazione del tampone di eluizione abbia raggiunto una soglia minima. Dunque, le relazioni usate per descrivere i picchi di eluizione sperimentali sono l'equazione di bilancio, eq. 5.12, e l'equazione cinetica espressa dalla 5.45, ovvero reazione irreversibile del primo ordine con concentrazione critica dell'eluente. Bisogna puntualizzare che l'eluente rappresenta una seconda specie presente in soluzione, per cui deve essere scritta un'apposita equazione di bilancio di materia, simile alla 5.12, ma in cui è assente il termine generativo. Le condizioni iniziali sono espresse dalle 5.50, 5.52 – 5.54 per l'IgG, mentre per l'eluente si usano le condizioni 5.55 – 5.57.

---

<sup>2</sup>  $Pe = \frac{vL}{D_L} = \frac{vL}{\alpha v} = \frac{L}{\alpha}$

Tabella 7.17: Parametri aggiustabili ottenuti per interpolazione dei dati sperimentali di eluizione.

$k_e$ (1/min)	$c_{crit}^{eluyente} / c_0^{eluyente}$
$10.51 \pm 0.20$	$0.30 \pm 0.01$

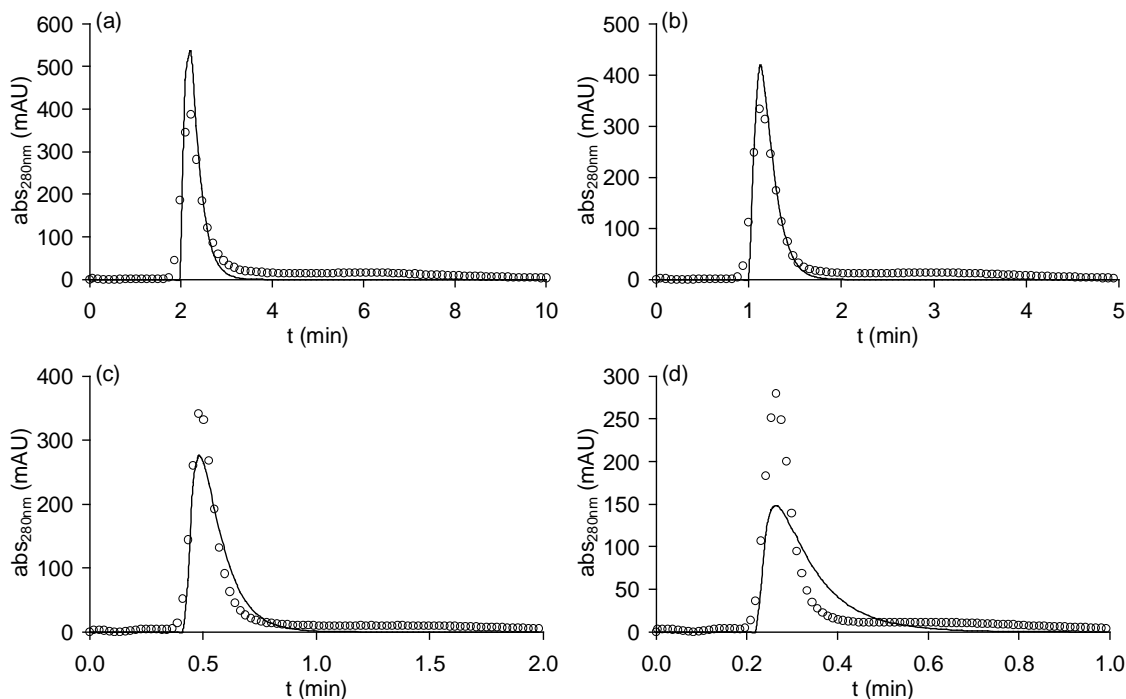


Figura 7.21: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) nella fase di eluizione. Condizioni operative: a)  $F = 1$  ml/min,  $c_0 = 0.48$  mg/ml; b)  $F = 2$  ml/min,  $c_0 = 1.05$  mg/ml; c)  $F = 5$  ml/min,  $c_0 = 1.47$  mg/ml; d)  $F = 10$  ml/min,  $c_0 = 2.15$  mg/ml.

Le simulazioni sono state condotte assumendo il coefficiente di dispersività pari a quello determinato nella fase di adsorbimento, mentre la costante cinetica di eluizione e la concentrazione di eluente critica sono i parametri aggiustabili del modello in questa fase. L'interpolazione è stata eseguita su tutti i risultati sperimentali contemporaneamente; i parametri aggiustabili risultanti sono riportati in Tabella 7.17; in Figura 7.21 sono invece riportati alcuni confronti tra curve sperimentali e simulazioni a diverse condizioni operative.

Le simulazioni ottenute con il modello proposto mostrano un profilo dipendente dalla portata, in cui si registra un progressivo appiattimento del picco con l'aumentare della velocità di alimentazione in maniera del tutto analoga a quanto osservato sperimentalmente. Tuttavia tale dipendenza è più marcata per le simulazioni che non per i dati misurati. Infatti alle basse velocità di alimentazione il picco generato dal modello è più alto e stretto rispetto quello sperimentale, viceversa alle alte portate, in cui è il picco sperimentale ad essere più marcato

rispetto quello simulato. Il modello proposto per la fase di eluizione è in grado di descrivere solo qualitativamente i profili misurati.

I tempi caratteristici dei fenomeni considerati nel modello sono riportati in Tabella 7.18. La reazione di eluizione avviene con una velocità che è confrontabile con quella della convezione e della dispersione assiale, e questo spiega la forte dipendenza dei picchi simulati con la portata.

È probabile che l'equazione cinetica proposta non sia comprensiva di tutti i fenomeni in gioco durante l'eluizione, si dovrebbero quindi considerare meccanismi di reazione diversi rispetto quello del primo ordine [29].

Tabella 7.18: tempi caratteristici per la convezione, la dispersione assiale e la reazione di eluizione in funzione della portata.

$F$ (ml/min)	1	2	5	10
$t_c$ (s)	12.4	6.2	2.4	1.2
$t_{DL}$ (s)	4.6	2.3	0.9	0.5
$t_e$ (s)			5.7	

## 7.6.2 Surnatante industriale

Nel capitolo precedente è stata dimostrata la validità del modello dispersivo di equilibrio per descrivere l'adsorbimento di IgG pura su membrane B14-TA-Epoxy2. Risulta d'obbligo verificare la bontà del modello anche nel caso in cui si trattino dati relativi ad esperimenti condotti con il surnatante industriale.

Come osservato per altri sistemi sperimentali, anche le membrane B14-TA-Epoxy2 trattate con il surnatante industriale hanno mostrato una capacità di adsorbimento inferiore rispetto quella ottenuta alimentando soluzioni di IgG pura (§ 3.3.2.2). Inoltre si riscontra un allargamento nella zona terminale della curva di breakthrough, per cui la capacità dinamica da usare nel modello non può coincidere con quella sperimentale.

Per ovviare a queste due limitazioni sono state proposte le seguenti ipotesi:

- si definisce  $\phi$  come il rapporto tra la capacità massima simulata,  $c_l$ , e sperimentale,  $DBC_{max}$ , e si suppone che tale rapporto sia identico per le prove condotte con soluzioni pure e con il surnatante industriale;
- si applica la 7.1 per determinare la capacità massima dai dati dell'isoterma.

Combinando le due congetture proposte si ottiene:

$$c_l = \frac{(c_0 + K_d)}{c_0} DBC_{100\%} \phi \quad 7.15$$

in cui  $DBC_{100\%}$  è la capacità sperimentale della prova eseguita con il surnatante industriale,  $c_l$  è la capacità massima da implementare nel modello e  $\phi$  è calcolato a partire dai dati ottenuti con soluzioni pure di IgG. Con questa procedura si evita di considerare la capacità massima come parametro aggiustabile, calcolandola con semplicità a partire dai dati già in possesso. Inoltre il coefficiente di dispersività,  $\alpha$ , è posto uguale a quello determinato per interpolazione dei dati relativi a soluzioni pure, dunque il modello così posto non necessita di nessun parametro aggiustabile.

Le simulazioni della curva di lavaggio sono state condotte supponendo valida la 5.37, ovvero che la concentrazione di proteina adsorbita sulla fase stazionaria rimanga costante durante questa fase. L'eluizione invece non è stata simulata a causa della scarsità di dati sperimentali affidabili.

In Figura 7.22 sono presentati i confronti tra i risultati sperimentali e le simulazioni eseguite con la strategia risolutiva proposta. Il modello è in grado di descrivere con precisione il tratto iniziale della curva di adsorbimento e l'intera fase di lavaggio. Si può concludere che il modello è in grado di simulare il comportamento del sistema sperimentale senza l'ausilio di parametri aggiustabili.

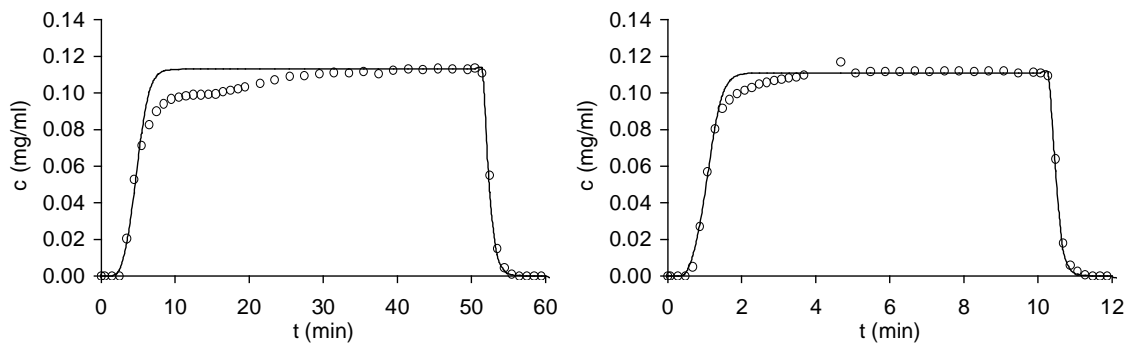


Figura 7.22: Confronto tra i risultati sperimentali (o) e le simulazioni generate dal modello (-) per la prova condotta con il surnatante industriale ad 1 ml/min (a sinistra) ed a 5 ml/min (a destra).

## Bibliografia

1. Wikipedia, The Free Encyclopedia, Mathematical model.
2. Sarfert, F. T., Etzel, M. R., *Mass transfer limitations in protein separations using ion-exchange membranes*, Journal of Chromatography A, 1997, 764, 3–20.
3. Suen, S. Y., Etzel, M. R., *A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations*, Chemical Engineering Science, 1992, 47, 1355–1364.
4. Boi, C., Lamberti, L., Sarti, G. C., *Selectivity of affinity membranes for immunoglobulin capture*, AIChE Annual Meeting and Fall Showcase Conference

- Proceedings on CD. AIChE Annual Meeting 2006. San Francisco, California. 12-17 Novembre 2006.
5. Boi, C., Algeri, C., Sarti, G. C., *Preparation and characterization of polysulfone affinity membranes bearing a synthetic peptide ligand for the separation of murine immunoglobulins*, *Biotechnology Progress*, **2008**, 24, 1304–1313.
  6. Guiochon, G., Felinger, A., Shirazi, D. G., Katti, A. M., *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, seconda edizione, **2006**, Elsevier Inc., San Diego, California.
  7. Boi, C., Dimartino, S., Van Beijeren, P., Sarti, G. C., *Evaluation of affinity membrane adsorbers for antibody purification*, *AIChE Annual Meeting and Fall Showcase Conference Proceedings on CD. AIChE Annual Meeting 2006*. San Francisco, California. 12-17 Novembre 2006.
  8. Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G. C., *Modelling and simulation of affinity membrane adsorption*, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1162, 24–33.
  9. Giddings, J. C., Byring, H., *A Molecular Dynamic Theory of Chromatography*, *Journal of Physical Chemistry*, **1955**, 59, 416–421.
  10. Puerta, A., Vidal-Madjar, C., Jaulmes, A., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Frontal analysis for characterizing the adsorption–desorption behavior of  $\beta$ -lactoglobulin on immunoadsorbents*, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1119, 34–42.
  11. Bak, H., Thomas, O. R. T., Abildskov J., *Lumped parameter model for prediction of initial breakthrough profiles for the chromatographic capture of antibodies from a complex feedstock*, *Journal of Chromatography B*, **2007**, 848, 131–141.
  12. Yang, H., Etzel, M. R., *Evaluation of three kinetic equations in models of protein purification using ion–exchange membranes*, *Industrial Engineering and Chemistry Research*, **2003**, 42, 890–896.
  13. Ghose, S., Hubbard, B., Cramer, S. M., *Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials*, *Biotechnology and Bioengineering*, **2007**, 96, 768–779.
  14. Castilho, L. R., Anspach, F. B., Deckwer, W. D., *Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins*, *Journal of Membrane Science*, **2002**, 207, 253–264.



15. Liu, H. C., Fried, J. R., *Breakthrough of lisozyme through an affinity membrane of cellulose cibacron blue*, *AIChE Journal*, **1994**, 40, 40–49.
16. van Beijeren, P., Kreis, P., Hoffmann, A., Mutter, M., Sommerfeld, S., Bäcker, W., Górak, A., *Computer-aided process design of affinity membrane adsorbers: a case study on antibodies capturing*, *Chemical Papers*, **2008**, 62, 458–463.
17. Dimartino, S., Boi, C., Sarti, G. C., *Dynamic characterization of affinity membranes for monoclonal antibodies purification*. *AIChE Annual Meeting and Fall Showcase Conference Proceedings on CD*. *AIChE Annual Meeting 2007*. Salt Lake City, Utah, 4-9 Novembre 2007.
18. Sportsman, J. R., Wilson, G., S., *Chromatographic properties of silica-immobilized antibodies*, *Analytical Chemistry*, **1980**, 52, 2013–2018.
19. Sarfert, F. T., Etzel, M. R., *Mass transfer limitations in protein separations using ion-exchange membranes*, *Journal of Chromatography A*, **1997**, 764, 3–20.
20. Tejeda–Mansir, A., Juvera, J. M., Magaña, I., Guzmán, R., *Design of affinity membrane chromatographic columns*, *Bioprocess Engineering*, **1998**, 19, 115–119.
21. Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke. C. R., *Analysis of affinity separations I: predicting the performance of affinity adsorbers*, *The Chemical Engineering Journal*, **1985**, 30, B9–B23.
22. Horstmann, B. J., Chase, H. A., *Modelling the affinity adsorption of Immunoglobulin G to Protein A immobilized to agarose matrices*, *Chemical Engineering Research and Design*, **1989**, 67, 243–254.
23. Strauss, W. A., *Partial differential equations: an introduction*, **1992**, Wiley, New York.
24. Suen, S. Y., Etzel. M. R., *Sorption kinetics and breakthrough curves for pepsin and chymosin using pepstatin A affinity membranes*, *Journal of Chromatography A*, **1994**, 686, 179–192.
25. Montesinos–Cisneros, R. M., de la Vega Olivas, J., Ortega, J., Guzmán, R., Tejeda–Mansir, A., *Breakthrough performance of plasmid DNA on ion exchange membrane column*, *Biotechnology Progress*, **2007**, 23, 881–887.
26. Dullien F. A. L., *Porous media : fluid transport and pore structure*, seconda edizione, **1992**, Academic Press, San Diego, California.

27. Miyabe, K., Guiochon, G., *Measurement of the parameters of the mass transfer kinetics in high performance liquid chromatography*, *Journal of Separation Science*, **2003**, 26, 155–173.
28. Sternberg, J. C., *Extracolumn contributions to chromatographic band broadening*, *Advances in Chromatography*, **1966**, 2, 205–270.
29. Arve, B. H., Liapis, A. I., *Modeling and analysis of elution stage of biospecific adsorption in Finite bath*, *Biotechnology and Bioengineering*, **1988**, 31, 240–249.

# CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di dottorato è stata valutata la possibilità di utilizzare membrane di affinità in alternativa alle convenzionali colonne cromatografiche impaccate per la purificazione di anticorpi.

Il lavoro si inserisce all'interno del progetto europeo AIMS (Advanced Interactive Materials by Design), il quale si prefigge l'obiettivo di ricercare dei materiali con migliori prestazioni, sia in termini di processo che economici, rispetto l'attuale purificazione selettiva per la produzione di immunoglobulina G (IgG). La cromatografia di affinità con membrane microporose rappresenta una delle alternative considerate.

Le membrane studiate durante il progetto europeo sono il risultato dell'immobilizzazione di opportuni ligandi di affinità su diverse matrici polimeriche. I ligandi presi in considerazione sono sia di origine naturale, la proteina A, che di origine sintetica, il D-PAM, l'A2P e il B14.

I materiali sviluppati durante il progetto AIMS sono stati oggetto di un esteso lavoro sperimentale condotto sia con soluzioni di IgG pura che con un surnatante industriale contenente IgG. In questa fase sono state determinate le diverse proprietà delle membrane, quali la capacità dinamica, l'affinità e la selettività nei confronti dell'IgG ed il recupero in eluzione.

L'applicazione di modelli matematici affidabili è indispensabile per eseguire un'ottimizzazione economica e lo scale-up del processo di cromatografia di affinità con membrane. Dunque, in vista di una possibile applicazione industriale delle membrane più promettenti, i diversi modelli matematici proposti sono stati validati con i risultati sperimentali.

Le membrane di affinità che supportano il ligando D-PAM hanno mostrato un buon recupero, con valori che si aggirano intorno all'80%. Tuttavia è stato evidenziato un calo della capacità dinamica tra un ciclo cromatografico ed il successivo. Lo stesso problema è stato riscontrato con le membrane in cui è stato immobilizzato il ligando A2P. Per questi sistemi il recupero in eluzione è molto basso o addirittura nullo e, nel caso in cui vengono trattate delle miscele complesse, l'A2P è poco selettivo nei confronti dell'IgG e viene irreversibilmente

bloccato dai contaminanti. Inoltre il ligando A2P è sensibile all'acido pluronico F68, che ne limita la capacità di interagire con l'IgG.

D'altro canto, le combinazioni del ligando sintetico B14 con le membrane Sartobind Epoxy ed Epoxy2 hanno mostrato prestazioni di separazione promettenti. Infatti è stato osservato che il ligando B14 non solo è particolarmente affine nei confronti dell'IgG, ma anche selettivo; inoltre il recupero di proteina nella fase di eluizione è prossimo al 100%. Se si confrontano le due membrane, le B14-TA-Epoxy2 possiedono una capacità massima circa il 40% superiore rispetto alle B14-TA-Sartoepoxy, oltre ad una maggiore resa di eluizione. Considerazioni sulle proprietà strutturali delle membrane hanno dimostrato che le B14-TA-Epoxy2 possono essere oggetto di un'ottimizzazione mirata ad un ulteriore miglioramento delle sue prestazioni.

Le membrane SartoAIMs ProteinA, in cui è immobilizzato il ligando naturale specifico per le IgG, hanno mostrato un recupero prossimo al 100% ed un'elevata capacità dinamica di adsorbimento, circa 3-4 volte maggiore rispetto le membrane basate sul ligando B14. Gli esperimenti condotti con il surnatante industriale hanno evidenziato un'ottima selettività nei confronti dell'IgG; inoltre le frazioni di eluizione raccolte non solo hanno un buon grado di purezza, ma hanno un titolo di IgG maggiore rispetto alla miscela di partenza. Visti i risultati molto promettenti, le membrane SartoAIMs ProteinA sono state successivamente utilizzate in moduli cromatografici per applicazioni analitiche e su scala pilota. È stata così valutata la capacità di scale-up e scale-down del processo di cromatografia di affinità con membrane. Mentre il modulo per applicazioni analitiche ha mostrato risultati confrontabili con con gli altri esperimenti condotti, il modulo pilota ha rivelato di avere delle scarse prestazioni ed è necessaria una sua ottimizzazione fluidodinamica.

Infine è stato progettato un nuovo modulo per membrane piane. Un dettagliato studio sperimentale ha dimostrato che questo modulo consente di eseguire prove di adsorbimento affidabili e ripetibili, in cui si riescono a sfruttare al massimo le caratteristiche delle membrane.

Un'analisi matematica dei modelli proposti ha valutato le conseguenze causate da una distribuzione della dimensione dei pori nei supporti utilizzati. È stato dimostrato che questo problema può essere limitato utilizzando una pila di membrane sovrapposte. In particolare, è stato osservato che già con cinque membrane sovrapposte possono essere ignorati gli effetti della distribuzione della dimensione dei pori sui risultati sperimentali.

Inoltre è stato valutato il contributo legato al trasporto di materia nello strato limite nella globalità del processo di cromatografia con membrane. Considerazioni

teoriche sui tempi caratteristici dei fenomeni coinvolti hanno evidenziato che il termine di trasporto di materia nello strato limite può essere trascurato in qualsiasi condizione operativa.

L'applicazione dei modelli matematici proposti ai risultati sperimentali ha fornito degli ottimi risultati. Per ogni sistema studiato, il modello è stato opportunamente adattato in modo da prendere in considerazione le evidenze sperimentali osservate.

In particolare si menziona il modello con cinetica bi-Langmuir, usato per modellare i dati sperimentali di adsorbimento ottenuti con le membrane A2P-Sartoepoxy. Il modello è stato formulato sulla base di diverse osservazioni sperimentali, come il doppio picco nella fase di eluizione e l'alto adsorbimento non specifico. Dunque è stata presa in considerazione la possibilità che le interazioni tra la proteina ed il supporto di affinità possano essere di due tipi, specifiche e non specifiche. Il modello proposto è in ottimo accordo con i dati sperimentali misurati a diverse condizioni operative, sia per il primo ciclo di utilizzo che per i cicli successivi al primo.

Al fine di descrivere l'intero processo cromatografico di affinità, il modello è stato esteso anche alle fasi di lavaggio e di eluizione. Il riferimento scelto per la validazione del modello è costituito dai dati relativi alle caratterizzazioni dinamiche eseguite sulle membrane SartoAIMs ProteinA con soluzioni pure di IgG. Le simulazioni sono state generate con il modello con parametro cinetico globale, in cui i fenomeni cinetici e di trasporto presenti nella colonna cromatografica vengono conglobati nella costante cinetica apparente. L'accordo tra le simulazioni ed i dati sperimentali è più che buono in tutte le fasi cromatografiche e per tutte le condizioni operative studiate.

Questo risultato ha fornito i presupposti per estendere il modello anche a miscele multicomponenti. I risultati relativi ai contaminanti sono stati descritti con successo tramite il modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, mentre i risultati per l'IgG sono stati simulati con il modello a parametro cinetico globale.

Questo modello è stato applicato anche per descrivere i dati di cicli di affinità ottenuti con le membrane B14-TA-Sartoepoxy. I risultati sperimentali relativi a prove eseguite con soluzioni di IgG sono stati utilizzati come confronto per la determinazione dei parametri aggiustabili del modello. Le simulazioni generate sono in grado di descrivere puntualmente le curve sperimentali. I parametri aggiustabili del modello determinati nel caso di simulazioni di esperimenti condotti con soluzioni di IgG pura sono stati utilizzati per approssimare i cicli cromatografici eseguiti con il surnatante industriale; si osserva un ottimo accordo delle simulazioni con i risultati sperimentali senza l'ausilio di parametri

aggiustabili. Dunque il modello proposto è in grado di prevedere la risposta del sistema sperimentale in un ampio intervallo di condizioni operative sia quando si trattano soluzioni pure di IgG che soluzioni complesse.

Inoltre sono state fatte alcune considerazioni teoriche sui parametri aggiustabili ottenuti per interpolazione del modello con parametro cinetico globale ai dati sperimentali. Tali osservazioni hanno suggerito di applicare il modello dispersivo di equilibrio ai dati di adsorbimento relativi alla caratterizzazione dinamica condotta con le membrane B14-TA-Epoxy2. In questo modello si suppone che, oltre alla convezione, il principale fenomeno di trasporto sia costituito dalla dispersione assiale; inoltre si assume che la reazione di adsorbimento sia molto veloce rispetto agli altri fenomeni di trasporto, che quindi è considerata all'equilibrio. Il picco di eluizione è invece modellato con una cinetica di reazione del primo ordine irreversibile, che ha luogo solo se il tampone di eluizione ha superato localmente una determinata soglia critica. Tale meccanismo è stato considerato per motivare il ritardo che si nota nella fase di eluizione.

Le simulazioni generate con il modello dispersivo di equilibrio sui risultati sperimentali confermano la validità di questo modello relativamente alla fase di adsorbimento, e sono in grado di descrivere qualitativamente la fase di eluizione. Per migliorare l'accordo tra le simulazioni e i dati di eluizione sono da studiare più approfonditamente i meccanismi di reazione che sono coinvolti in questa fase.

Infine, il modello dispersivo di equilibrio è stato impiegato per descrivere i risultati sperimentali di adsorbimento ottenuti con il surnatante industriale. Le simulazioni sono in ottimo accordo con i dati sperimentali senza la necessità di introdurre ulteriori parametri aggiustabili. La validità del modello dispersivo di equilibrio è dunque confermata anche nel caso in cui si trattino soluzioni complesse. Questo modello può essere sfruttato in maniera predittiva sul sistema sperimentale di riferimento.

Si può concludere che i modelli proposti in questo lavoro di tesi sono uno strumento utile per descrivere la risposta delle membrane studiate in una varietà di condizioni operative; inoltre può essere applicato sia per soluzioni di IgG pura che nel caso di miscele complesse.

Più in generale, dopo aver valutato i fenomeni cinetici e di trasporto predominanti, i modelli proposti possono essere impiegati su un qualsiasi sistema cromatografico di affinità con membrane. Una loro applicazione necessita di una taratura preliminare con dati relativi a cicli di affinità con soluzioni di IgG pura, dopodichè possono essere sfruttati per prevedere la risposta del sistema anche nel caso in cui siano trattate soluzioni complesse.

# NOTAZIONE MATEMATICA

## Lettere latine

$a(c)$	generica funzione che descrive l'isoterma di equilibrio
$Abs_\lambda$	assorbanza del campione alla lunghezza d'onda $\lambda$ , AU
$A_S$	area superficiale, $\text{cm}^2$
$c_{in}^{CSTR}$	concentrazione in ingresso al CSTR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{in}^{PFR}$	concentrazione in ingresso al PFR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{out}^{CSTR}$	concentrazione in uscita dal CSTR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{out}^{PFR}$	concentrazione in uscita dal PFR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c^*$	concentrazione adimensionale nella fase mobile, $c^* = c/c_0$
$c$	concentrazione nella fase mobile, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_0$	concentrazione nell'alimentazione, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{BTP}$	concentrazione del soluto nel punto di breakthrough, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{DS}$	concentrazione in uscita dal sistema composto dalla serie CSTR – PFR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{eluyente}$	concentrazione di eluente nel caso di eluizione non specifica, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{eluyente}^{crit}$	concentrazione di eluente critico nel caso di eluizione non specifica, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{eluyente}^{in}$	concentrazione di eluente in ingresso alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{eq}$	concentrazione nella fase mobile all'equilibrio con la fase stazionaria, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_I^*$	concentrazione adimensionale all'interfaccia fase mobile – fase stazionaria, $c_I^* = c_I/c_0$
$c_I$	concentrazione all'interfaccia fase mobile – fase stazionaria, $\text{mg ml}^{-1}$

$c_{in}^*$	concentrazione adimensionale nella soluzione in ingresso alla colonna, $c_{in}^* = c_{in}/c_0$
$c_{in}$	concentrazione nella soluzione in ingresso alla colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_l$	capacità massima della colonna, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_{s, eq}$	concentrazione nella fase stazionaria all'equilibrio con la fase mobile, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_s$	concentrazione nella fase stazionaria, $\text{mg ml}^{-1}$
$c_s^*$	concentrazione adimensionale nella fase stazionaria, $c_s^* = c_s/c_l$
$c_s^{elu}$	concentrazione media della proteina desorbibile dal supporto nella fase di eluizione, $\text{mg ml}^{-1}$
$Da$	numero di Damköhler, $Da = k_a c_0 L/v$
$DBC_{100\%}$	capacità di adsorbimento dinamica sperimentale al 100% di breakthrough, $\text{mg ml}^{-1}$
$DBC_{Langmuir}$	capacità di adsorbimento dinamica teorica calcolata dall'isoterma di Langmuir alla concentrazione di soluto nell'alimentazione, $\text{mg ml}^{-1}$
$DBC_{max}$	capacità di adsorbimento dinamica massima, $\text{mg ml}^{-1}$
$D_c$	coefficiente di diffusione molecolare del soluto nei pori della resina cromatografica, $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$
$D_m$	coefficiente di diffusione molecolare del soluto nella fase mobile, $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$
$D_L$	coefficiente di dispersione del soluto nella fase mobile, $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$
$d_p$	diametro dei pori, $\text{cm}$
$F$	portata volumetrica della fase mobile, $\text{ml min}^{-1}$
$H$	lunghezza del cammino ottico, $\text{cm}$
$I_0$	funzione di Bessel modificata di ordine zero
$J$	funzione ausiliaria nel modello di Thomas
$k_a$	costante cinetica della reazione di adsorbimento, $\text{ml mg}^{-1} \text{min}^{-1}$
$K_a$	costante di equilibrio di associazione di Langmuir, $\text{ml mg}^{-1}$
$k_f$	coefficiente di trasporto di materia nello strato limite, $\text{cm min}^{-1}$
$k_d$	costante cinetica della reazione di desorbimento, $\text{min}^{-1}$
$K_d$	costante di equilibrio di dissociazione di Langmuir, $\text{mg ml}^{-1}$
$k_e$	costante cinetica della reazione di eluizione per meccanismo irreversibile del primo ordine, $\text{min}^{-1}$
$k_e'$	costante cinetica della reazione di eluizione con dispersione nei volumi esterni alla colonna, $\text{min}^{-1}$



$k_c^1$	costante cinetica della reazione diretta di eluizione per meccanismo reversibile del secondo ordine, $\text{ml mg}^{-1} \text{min}^{-1}$
$k_c^2$	costante cinetica della reazione inversa di eluizione per meccanismo reversibile del secondo ordine, $\text{min}^{-1}$
$L$	altezza complessiva delle membrane, cm
$L_m$	altezza di una membrana, cm
$m$	capacità di saturazione, $m = (1 - \epsilon)c_l/\epsilon_0$
$m_{ads}$	massa di proteina adsorbita sulla colonna, mg
$m_{alim}$	massa di proteina alimentata durante la fase di adsorbimento, mg
$m_{des}$	massa di proteina desorbita dalla colonna durante la fase di lavaggio, mg
$m_{clu}^{reale}$	massa di proteina recuperata nella fase di eluizione, mg
$m_{clu}^{teorica}$	massa di proteina teoricamente recuperabile nella fase di eluizione, mg
$m_l$	massa di ligando immobilizzata sulla fase stazionaria, mg
$m_{lav}$	massa di proteina in uscita dal sistema durante la fase di lavaggio, mg
$m_{out}$	massa di proteina in uscita dal sistema durante la fase di adsorbimento, mg
$m_{sis}$	massa di proteina nella soluzione contenuta nei volumi del sistema sperimentale, mg
$M$	massa molecolare, $\text{mg mmol}^{-1}$
$M_n$	momento n-esimo, $\text{mg min}^n \text{ml}^{-1}$
$n$	numero di unità di trasporto, $n = (1 - \epsilon)c_l k_a L/\epsilon v$
$n_m$	numero di membrane sovrapposte costituenti la colonna cromatografica
$n_p$	numero di pori teoricamente presenti su una membrana
$p(z)$	profilo della concentrazione lungo la direzione assiale nella fase mobile alla fine della fase di adsorbimento
$Pe$	numero di Péclet assiale, $Pe = vL/D_L$
$Pe_p$	numero di Péclet di poro, $Pe = v d_p/D_m$
$q$	numero di unità di trasporto, $q = 4k_c L/d_p v$
$q(z)$	profilo della concentrazione lungo la direzione assiale nella fase stazionaria alla fine della fase di adsorbimento
$r$	fattore di separazione, $r = 1 + c_0/K_d$
$r(z)$	profilo della concentrazione lungo la direzione assiale nella fase mobile alla fine della fase di lavaggio

$R$	recupero di proteina in fase di eluizione
$R_a$	velocità della reazione di adsorbimento, $\text{mg min}^{-1} \text{cm}^{-2}$
$R_d$	velocità della reazione di desorbimento, $\text{mg min}^{-1} \text{cm}^{-2}$
$R_p$	raggio delle particelle cromatografiche, cm
$r_p$	raggio dei pori, cm
$r_0$	raggio medio dei pori, cm
$s$	fattore di separazione, $s = c_0/K_d$
$s(z)$	profilo della concentrazione lungo la direzione assiale nella fase stazionaria alla fine della fase di lavaggio
$SBC_{\max}$	capacità di adsorbimento massima valutata in condizioni batch, $\text{mg ml}^{-1}$
$S_t$	sezione trasversale della colonna, $\text{cm}^2$
$t$	tempo, min
$t_e$	inizio fase di eluizione, min
$t_p$	durata dell'impulso, min
$t_r$	tempo di ritenzione, min
$t_w$	inizio fase di lavaggio, min
$T$	volume adimensionale in uscita dalla colonna, $T = \epsilon K_d r (\tau - 1) / [(1 - \epsilon) c_l]$
$t_d$	tempo di ritardo associato al PFR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, min
$v$	velocità interstiziale della fase mobile, $\text{cm min}^{-1}$
$u$	velocità superficiale della fase mobile, $\text{cm min}^{-1}$
$V$	volume alimentato alla colonna cromatografica, ml
$V_{ads}$	volume alimentato nella fase di adsorbimento, ml
$V_{CSTR}$	volume del CSTR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, ml
$V_{elu}$	volume alimentato nella fase di eluizione, ml
$V_{lav}$	volume alimentato nella fase di lavaggio, ml
$V_{mem,p}$	volume di membrana associata ad un poro, ml
$V_{mem,sol}$	volume solido nella colonna, ml
$V_{mem,tot}$	volume totale della colonna, ml
$V_{mem,vuoti}$	volume dei vuoti nella colonna, ml
$V_{PRF}$	volume del PFR nel modello di dispersione nei volumi esterni alla colonna, ml
$V_{sis}$	volume totale del sistema cromatografico, ml
$x$	primo argomento della funzione ausiliaria $J$ nel modello di Thomas

$y$	secondo argomento della funzione ausiliaria $J$ nel modello di Thomas
$z$	coordinata spaziale lungo la colonna, cm

## Lettere greche

$\alpha$	coefficiente di dispersività, cm
$\beta_1$	rapporto tra la capacità specifica e la capacità totale nel modello bi-Langmuir
$\beta_2$	rapporto tra la capacità non specifica e la capacità totale nel modello bi-Langmuir
$\chi$	utilizzazione di ligando
$\delta$	spessore dello strato limite a ridosso dell'interfaccia, cm
$\delta_0$	contributo al momento primo assoluto dell'equilibrio di reazione
$\delta_{ax}$	contributo al momento secondo assoluto della dispersione assiale, min
$\delta_f$	contributo al momento secondo assoluto del trasporto di materia, min
$\delta_d$	contributo al momento secondo assoluto della diffusione nei pori, min
$\Delta p$	perdite di carico attraverso le membrane, bar
$\varepsilon$	grado di vuoto totale della fase stazionaria
$\varepsilon_e$	grado di vuoto esterno alla resina cromatografica
$\varepsilon_p$	grado di vuoto interno della resina cromatografica
$\varepsilon_\lambda$	coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda $\lambda$ , AU cm <sup>2</sup> mg <sup>-1</sup>
$\eta$	viscosità della fase mobile, Pa·s
$\psi$	variabile di integrazione nel modello di Thomas
$\gamma$	costante relativa al termine di diffusione molecolare per la determinazione del coefficiente di dispersione assiale
$\mu_n$	momento n-esimo assoluto, min <sup>n</sup>
$\bar{\mu}_n$	momento n-esimo assoluto centrale, min <sup>n</sup>
$\mu_1^{inj}$	momento primo dell'iniezione del campione, min
$\mu_1^{sys}$	momento primo degli elementi esterni alla colonna, min
$\bar{\mu}_2^{inj}$	momento secondo dell'iniezione del campione, min <sup>2</sup>
$\bar{\mu}_2^{sys}$	momento secondo degli elementi esterni alla colonna, min <sup>2</sup>
$\rho_{epoxy}$	densità dei gruppi epossidici, mg cm <sup>-2</sup>
$\rho_l$	densità di ligando volumetrica, mg ml <sup>-1</sup>
$\rho_{l,s}$	densità di ligando superficiale, mg cm <sup>-2</sup>

$\rho_p$	densità della resina cromatografica, $\text{mg ml}^{-1}$
$\sigma$	deviazione standard
$\sigma_{rel}$	deviazione standard relativa
$\tau$	tempo adimensionale, $\tau = tv/L$
$\tau_a$	tempo caratteristico per la reazione di adsorbimento, $\tau_a = 1/k_a c_0$ , min
$\tau_c$	tempo caratteristico per la convezione, $\tau_c = L/v$ , min
$\tau_d$	tempo caratteristico per la reazione di desorbimento, $\tau_d = 1/k_d$ , min
$\tau_e$	tempo caratteristico per la reazione di eluizione, $\tau_e = 1/k_e$ , min
$\tau_m$	tempo caratteristico per la diffusione molecolare, $\tau_{Dm} = \delta^2/D_m$ , min
$\tau_{DL}$	tempo caratteristico per la dispersione assiale, $\tau_{DL} = L^2/D_L$ , min
$\tau_f$	tempo caratteristico per il trasporto di materia nello strato limite, $\tau_f = \delta/k_f$ , min
$\tau_r$	tempo di riempimento del sistema, min
$\zeta$	coordinata spaziale adimensionale, $\zeta = z/L$