

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

**SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

*DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CIVILE, CHIMICA, AMBIENTALE E DEI MATERIALI*

*CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA CHIMICA E DI PROCESSO*

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

in

Bioreactors And Downstream Processes M

**CARATTERIZZAZIONE DI MEMBRANE PER LA  
PURIFICAZIONE DI ANTICORPI**

CANDIDATO:  
Claudia Troiano

RELATORE:  
Prof. Cristiana Boi

CORRELATORE:  
Ing. Eleonora Lalli

Anno Accademico 2015/2016

---

Sessione II



# INDICE

Capitolo 1:

<b>Introduzione</b> .....	5
1.1 Stato dell'arte.....	5
1.1.1 La cromatografia per la purificazione di biomolecole.....	5
1.1.2 Il processo di purificazione degli anticorpi monoclonali.....	8
1.2 Finalità della tesi.....	19

Capitolo 2:

<b>Tecniche cromatografiche per la separazione di proteine</b> .....	22
2.1 Introduzione.....	22
2.2 I processi cromatografici.....	24
2.2.1 La cromatografia ad esclusione di forma (SEC).....	24
2.2.2 La cromatografia ad interazione idrofobica (HIC).....	26
2.2.3 La cromatografia a fase inversa (RPC).....	27
2.2.4 La cromatografia a scambio ionico (IEC).....	28
2.2.4.1 Introduzione.....	28
2.2.4.2 Il meccanismo di separazione.....	29
2.2.4.3 Le matrici per cromatografia a scambio ionico.....	31
2.2.5 La cromatografia di affinità.....	33
2.2.5.1 Introduzione.....	33
2.2.5.2 Stadi di un processo cromatografico di affinità.....	34
2.2.5.3 Tipi di trasporto nei processi cromatografici di affinità.....	37
2.2.5.4 Processi cromatografici di affinità con resine e membrane.....	38
2.2.5.5 Moduli cromatografici con membrane.....	41
2.2.5.6 Preparazione del supporto cromatografico di affinità.....	41
2.2.5.6.1 Il supporto.....	42
2.2.5.6.2 Lo spaziatore.....	44
2.2.5.6.3 Il ligando.....	45
2.2.5.6.4 Attivazione del supporto e protocollo di immobilizzazione del ligando.....	47
2.2.5.6.5 Protocollo di endcapping .....	48

Capitolo 3:

<b>Immunoglobuline</b> .....	49
3.1 Struttura e funzione.....	49
3.2 Le immunoglobuline di classe G.....	51
3.3 I metodi di produzione.....	53
3.3.1 Produzione di anticorpi policlonali.....	54
3.3.2 Produzione di anticorpi monoclonali.....	56
3.3.3 Produzione di frammenti di anticorpi.....	59
3.4 Il mercato degli anticorpi.....	60

Capitolo 4:

<b>Materiali e metodi</b> .....	62
4.1 Introduzione.....	62
4.2 Materiali.....	62
4.2.1 Le membrane di affinità.....	62
4.2.1.1 Le membrane SartoBind Epoxy.....	62
4.2.1.2 Il complesso ligando-spaziatore.....	64
4.2.1.3 Protocolli di modifica delle membrane.....	65
4.2.1.3.1 Protocollo di immobilizzazione dello spaziatore 2LP.....	65
4.2.1.3.2 Protocollo di immobilizzazione del complesso ligando-spaziatore.....	66
4.2.1.3.3 Protocollo di reticolazione dei gruppi epossidici e dei gruppi amminici.....	67
4.2.2 Le membrane a scambio ionico.....	69
4.2.2.1 Le membrane a scambio cationico PTA-OH.....	69
4.2.2.2 Le membrane a scambio cationico SartoBind S.....	71
4.2.3 Proteine e siero umano.....	72
4.2.3.1 Le immunoglobuline di classe G.....	72
4.2.3.2 Altre proteine: i contaminanti.....	73
4.2.3.3 Siero umano.....	74
4.3 Metodi analitici per lo studio delle proteine.....	75
4.3.1 Spettroscopia di assorbimento nell'UV-visibile.....	75
4.3.2 Elettroforesi.....	79
4.3.3 Metodi colorimetrici.....	82
4.3.3.1 Saggio di Bradford.....	82
4.3.3.2 Saggio del BCA.....	83
4.3.4 Analisi cromatografiche: HPLC.....	86
4.3.4.1 Colonna di affinità con proteina A.....	87

4.3.4.2 Colonna SEC (Size Exclusion Liquid Chromatography).....	88
4.4 L'apparato sperimentale: FPLC ÄKTA purifier 100.....	89
4.5 Prove batch.....	93
4.5.1 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali.....	93
4.5.2 Elaborazione dei dati.....	95
4.6 Prove dinamiche.....	97
4.6.1 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali.....	97
4.6.1.1 Curva di Breakthrough.....	99
4.6.1.2 Curva di dispersione.....	101
4.6.2 Elaborazione dei dati.....	101
4.6.3 Porosità del supporto cromatografico.....	104
4.6.3.1 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali.....	104
4.6.3.2 Il metodo dei momenti.....	105
4.6.3.3 Porosità di supporti cromatografici costituiti da membrane.....	106
Capitolo 5:	
<b>Risultati delle prove sperimentali in batch.....</b>	<b>108</b>
5.1 Introduzione.....	108
5.2 Studio dell'adsorbimento non specifico.....	110
5.2.1 Acetaldeide.....	110
5.2.2 Acetone.....	115
5.3 Prove batch con membrane di affinità: soluzioni pure.....	118
5.4 Prove batch con membrane di affinità: miscele.....	120
5.4.1 Miscela IgG 0.5 mg/mL – BSA 0.25 mg/mL.....	121
5.4.2 Miscela IgG 0.5 mg/mL – BSA 0.75 mg/mL.....	123
5.4.3 Siero.....	125
Capitolo 6:	
<b>Risultati delle prove sperimentali in condizioni dinamiche.....</b>	<b>130</b>
6.1 Introduzione.....	130
6.2 Le membrane a scambio cationico PTA-OH.....	131
6.2.1 Determinazione del grado di vuoto.....	131
6.2.2 Cicli cromatografici in condizioni dinamiche.....	133
6.2.2.1 Le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35.....	134
6.2.2.2 Le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30.....	136
6.3 Le membrane a scambio cationico SartoBind S.....	140

6.3.1 Determinazione del grado di vuoto.....	140
6.3.2 Cicli cromatografici in condizioni dinamiche.....	142
<b>Conclusioni</b> .....	144
<b>Appendice</b> .....	151
A. Curve di calibrazione.....	151
A.1 Spettroscopia di assorbimento nell'UV-visibile.....	151
A.2 HPLC: Colonna proteina A.....	155
A.3 Saggio del BCA.....	155
B. Composizione delle soluzioni utilizzate nelle analisi con l'HPLC.....	156
<b>Bibliografia</b> .....	158

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 STATO DELL'ARTE

#### 1.1.1 La cromatografia per la purificazione di biomolecole

Il termine cromatografia indica un insieme di tecniche il cui scopo è quello di separare una miscela nei suoi componenti, in modo da permetterne un'analisi di tipo quantitativo e/o qualitativo.

Le basi della cromatografia sono state gettate da Mikhail Tswett, botanico russo che nel 1901 utilizzò una colonna cromatografica per l'adsorbimento liquido-solido con carbonato di calcio come adsorbente e miscele di etere di petrolio ed etanolo come eluenti per separare la clorofilla ed i carotenoidi [1]. Il metodo fu presentato lo stesso anno presso il Congresso dei Naturalisti e Fisici a Pietroburgo, ma il termine "cromatografia" venne usato per la prima volta nei suoi articoli nel 1906.

Dietro alla generica definizione del termine, si nascondono molte tecniche, fra loro estremamente diverse: le distinzioni riguardano i principi chimici e chimico-fisici sfruttati, le caratteristiche delle sostanze da separare e le finalità della separazione. Le applicazioni trovano spazio sia su scala da laboratorio che su scala industriale, coinvolgendo una vasta gamma di settori produttivi: campo medico, ambientale, petrolchimico, biotecnologico, farmaceutico e così via.

Oggi particolare interesse è rivolto alla cromatografia di affinità e al suo utilizzo nel campo farmaceutico per la purificazione di biomolecole [2]. L'obiettivo è separare le sostanze sfruttando le interazioni specifiche fra un ligando immobilizzato sulla fase stazionaria ed il componente di interesse; il ligando è una molecola che viene legata covalentemente ad una matrice e che si lega con alta specificità alla proteina da purificare, la quale dovrà essere poi eluita e recuperata: è quindi necessario che il legame ligando-proteina sia reversibile. La fase di eluizione, che consente il recupero della proteina favorendo il suo distacco dal ligando, può essere effettuata seguendo diverse procedure, per esempio mediante l'utilizzo di soluzioni ad

alta concentrazione di ligando libero, oppure mediante soluzioni con pH o forza ionica diversi rispetto alle condizioni del tampone di alimentazione, facendo però attenzione a non innescare processi di denaturazione della molecola da recuperare. A causa dell'alta specificità delle interazioni, la selettività della cromatografia per affinità è potenzialmente la più alta tra tutti i tipi di cromatografia, offrendo la possibilità di purificazione in un singolo stadio di una molecola specifica da una miscela anche complessa [3].

La purificazione di biomolecole nel campo farmaceutico mediante questa tecnica rappresenta un mercato in continua crescita, all'interno del quale la purificazione di anticorpi monoclonali (o immunoglobuline) va assumendo un ruolo sempre più importante. Nonostante molte molecole siano in fase di sperimentazione o di studio, molte altre hanno già completato la fase sperimentale, dando vita a nuovi farmaci che stanno profondamente modificando la cura dei tumori e delle leucemie. Gli anticorpi sono utilizzati anche nel trattamento di alcune infezioni virali, di patologie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto da trapianto [4]; inoltre, alcuni esami per accertare la gravidanza o per individuare malattie infettive come l'epatite C fanno uso di anticorpi monoclonali. E' possibile affermare che più di un terzo del mercato dei farmaci biotecnologici nel mondo è costituito da queste biomolecole [5]. Si tratta tuttavia di terapie molto costose, il cui costo annuale può raggiungere \$ 35.000 per paziente sottoposto a trattamento di cura per il cancro; inoltre, tali farmaci vengono utilizzati principalmente per patologie croniche, di conseguenza molti studi scientifici sono incentrati sullo sviluppo di metodi di produzione e di purificazione di anticorpi monoclonali che siano sempre più vantaggiosi in termini di tempi e costi, in modo da riuscire a soddisfare la domanda di mercato [6].

In campo medico vengono utilizzati diversi tipi di immunoglobuline e, nel corso del tempo, sono state sviluppate molteplici strategie di produzione; se si considera il processo produttivo, la purificazione riveste un ruolo di particolare importanza, dovendo garantire un'elevata purezza della molecola di interesse, senza alterarne o danneggiarne le caratteristiche biochimiche. Per questi motivi i costi relativi all'insieme dei processi di purificazione rappresentano una percentuale importante dei costi totali di produzione, che può variare fra il 50 e l'80% [7], ed è quindi di fondamentale interesse la ricerca di alternative più economiche.

Un esempio è rappresentato dal caso delle immunoglobuline di classe G (IgG): lo stadio più costoso nell'ambito della purificazione è costituito dal processo cromatografico di affinità con proteina A, il ligando naturale biospecifico per le IgG, dotato quindi di grande selettività, ma



molto caro (costi fino all' 80% dei costi totali di purificazione [8]). Attualmente la fase di purificazione degli anticorpi monoclonali prevede tre cicli cromatografici successivi: il primo si avvale dell'utilizzo della proteina A, il secondo ed il terzo possono essere due colonne a scambio ionico oppure una colonna a scambio ionico più una colonna ad interazione idrofobica [9,10].

Per la purificazione delle IgG sono state studiate diverse alternative, come la precipitazione e la cristallizzazione [11], ma gli studi attuali sono principalmente dedicati alla ricerca di processi cromatografici più economici rispetto alla cromatografia convenzionale con proteina A. A tal proposito, la cromatografia di affinità con membrane riveste un ruolo di primaria importanza e presenta numerosi vantaggi rispetto ai processi convenzionali con resine; infatti quest'ultima tecnica è caratterizzata da un trasporto di materia limitato dalla diffusione nei pori ciechi dei granuli, problema che invece non limita i processi con le membrane, nelle quali il principale fenomeno di trasporto è rappresentato dalla convezione; questo porta ad un significativo risparmio, sia in termini di tempo necessario per la separazione sia in termini di quantità di soluzioni tampone utilizzate. Altri vantaggi dei processi che impiegano le membrane riguardano le perdite di carico, che risultano irrisorie se paragonate alle perdite di carico che invece caratterizzano i convenzionali processi cromatografici con resine, permettendo quindi di migliorare la produttività globale del processo grazie all'utilizzo di portate più alte [12, 13].

Nonostante ciò l'utilizzo di membrane nell'ambito di processi cromatografici per la cattura degli anticorpi non è ancora decollato, principalmente a causa dei bassi valori osservati in termini di capacità di adsorbimento [14].

Un altro importante aspetto da valutare per ridurre i costi nei processi di purificazione delle IgG, è la ricerca di ligandi sintetici alternativi alla proteina A, che siano caratterizzati da una buona affinità per tali anticorpi; ad oggi tali ligandi sono stati immobilizzati su diversi supporti polimerici seguendo svariati protocolli di attivazione e, seppure alcune strategie abbiano portato a risultati promettenti, nessuna è stata in grado di offrire le stesse prestazioni ottenute tramite la cromatografia convenzionale con proteina A [14].

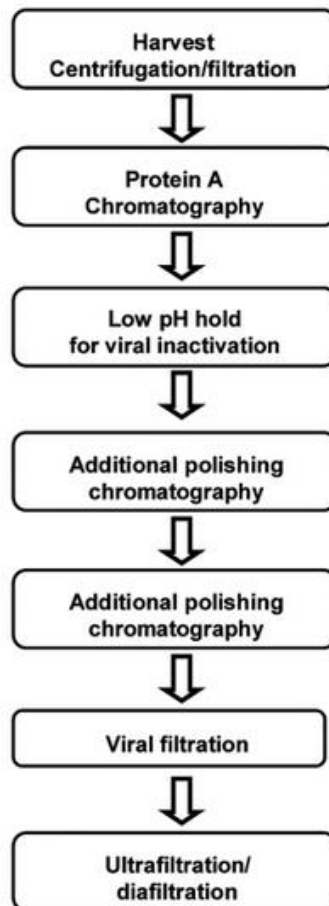
### 1.1.2 Il processo di purificazione degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi sono proteine complesse che l'organismo produce naturalmente come parte della risposta immunitaria ai germi, ai vaccini e ad altre sostanze o corpi estranei; si possono raggruppare in cinque classi (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) e sono caratterizzati da una stessa struttura di base: sono costituiti da due coppie di molecole proteiche disposte a formare una Y e legate fra loro mediante ponti disolfuro, ossia mediante l'interazione di atomi di zolfo. Due catene proteiche hanno un elevato peso molecolare e sono perciò dette "pesanti", mentre le altre due hanno un peso molecolare inferiore e sono dette "leggere". Sia nelle catene pesanti sia in quelle leggere vi sono regioni definite costanti, ovvero caratterizzate da una struttura simile negli anticorpi appartenenti ad una stessa classe; le regioni variabili sono invece estremamente differenziate, cioè formate da amminoacidi diversi, e permettono agli anticorpi il riconoscimento di una vasta quantità di molecole estranee, gli antigeni [2]. Il riconoscimento tra un anticorpo e un antigene avviene secondo un principio di complementarità dei rispettivi siti di legame.

Grazie alla biologia molecolare, si è in grado di sintetizzare anticorpi che attaccano e distruggono le cellule malate di un organismo, come avviene nel caso di alcuni tumori, in modo altamente specifico. Le IgG utilizzate nell'industria biotecnologica vengono prodotte principalmente a partire da colture cellulari di CHO, cellule ovariche di criceto cinese, o da altre cellule mammifere, mediante la tecnica del DNA ricombinante. Si tratta di proteine extracellulari che, dopo essere state prodotte e raccolte, devono subire un processo di purificazione opportuno che permetta di raggiungere il grado di purezza richiesto.

Alcuni recettori, come la proteina A o la proteina G, sono in grado di legarsi al dominio costante delle immunoglobuline ed è su questa interazione specifica che si basa il processo di purificazione di anticorpi mediante cromatografia di affinità con proteina A. In particolare, la proteina A è un costituente della membrana cellulare nei ceppi di *Staphylococcus Aureus* e presenta una spiccata affinità per molte immunoglobuline [15].

Nella seguente figura è illustrato un tipico processo per la purificazione di anticorpi monoclonali, in cui viene impiegata la cromatografia di affinità con proteina A:



*Figura 1.1: Tipico processo per la purificazione di anticorpi monoclonali [16].*

La prima fase di purificazione per anticorpi prodotti mediante colture cellulari di mammifero prevede la rimozione di cellule e frammenti di cellule, per ottenere un prodotto chiarificato mediante microfiltrazione o centrifugazione (“Harvest centrifugation/filtration”). Segue lo stadio cromatografico (“Protein A chromatography”), mediante utilizzo del ligando biospecifico per le immunoglobuline, la proteina A, che permette di ottenere elevati gradi di purezza (superiori al 90%) ed un elevato valore di recupero, anche con un singolo ciclo. Come già evidenziato, questa è la fase più costosa fra tutte le operazioni presenti nel processo di purificazione degli anticorpi. Il pH acido necessario per ottenere l’eluizione delle biomolecole dalla colonna proteina A viene sfruttato nello stadio seguente, che prevede l’inattivazione virale (“Low pH hold for viral inactivation”), la quale avviene mantenendo il fluido uscente dalla colonna proteina A a bassi valori di pH, per un tempo che dipende dal tipo di anticorpo da purificare.

Seguono uno o due stadi cromatografici (“Additional polishing chromatography”), necessari per rimuovere DNA, proteina A persa, aggregati molecolari o altre impurità. Le modalità scelte per l’esecuzione di questa fase dipendono dal tipo di anticorpo da purificare e da quantità e tipo di

contaminanti presenti. Si può procedere combinando in modo opportuno alcune tipologie di cromatografia, come la cromatografia a scambio cationico, la cromatografia a scambio anionico e la cromatografia ad interazione idrofobica.

Il prodotto ottenuto a valle dei processi cromatografici, deve essere sottoposto ad una filtrazione, mirata alla rimozione dei virus (“Viral filtration”), stadio richiesto dalla normativa per le sostanze a scopo terapeutico; successivamente, tramite ultrafiltrazione o diafiltrazione, si ottiene il prodotto nella formulazione desiderata (“Ultrafiltration/diafiltration”) [16].

Fra tutte le operazioni illustrate, la cromatografia di affinità con proteina A rappresenta il collo di bottiglia dell’intero processo. Come già accennato, molti studi sono volti alla ricerca di alternative più economiche, come l’impiego di membrane al posto delle resine comunemente utilizzate o di ligandi sintetici, da immobilizzare su opportuni supporti e che posseggano determinate caratteristiche: devono essere in grado di legarsi in modo selettivo agli anticorpi da purificare, devono essere meno costosi, più piccoli e più stabili rispetto alla proteina A; infine, devono potersi legare alle membrane in modo stabile al fine di prevenire eventuali perdite di ligando e conseguente contaminazione degli anticorpi.

Molti ligandi sintetici sono stati studiati ed immobilizzati su membrane polimeriche. Bayramoglu G. et al. [17] hanno caratterizzato il ligando Reactive Green 5-pHEMA, ma la purificazione delle immunoglobuline a partire dal siero non ha portato a risultati soddisfacenti, a causa dell’elevato adsorbimento non specifico riscontrato, soprattutto di albumina; questo problema è causato principalmente dal calo di idrofilicità delle membrane a seguito dell’immobilizzazione del ligando, che ha come conseguenza la creazione di interazioni di tipo idrofobico.

Una classe importante di ligandi sintetici è quella costituita da molecole a base di triazina, che sono il risultato della combinazione di studi computazionali ed attività sperimentali: ligandi A2P, B14 e 22/8, i quali differiscono fra loro nei due gruppi scelti per ottenere una triazina disostituita. Questi tre ligandi sono stati immobilizzati su membrane polimeriche e ne è stato studiato il comportamento sia con soluzioni di IgG pure sia con miscele complesse [18-21]. I problemi principali legati a questa classe di ligandi sintetici riguardano il fenomeno dell’adsorbimento non specifico e lo scarso rendimento in fase di eluizione, sebbene le capacità di adsorbimento siano alte. Fa eccezione il ligando B14, in grado di raggiungere un valore di recupero di IgG maggiore del 90% [22, 8].

Un altro ligando sintetico studiato è il polipeptide tetramerico D-PAM, il quale però, pur avendo dimostrato ottima selettività nei confronti di IgG murine e IgM umane, non si dimostra altrettanto efficiente nella purificazione di IgG umane [23]. Il D-PAM non può quindi essere considerato un ligando valido come sostituto della proteina A, ma potrebbe essere studiato per applicazioni il cui scopo sia separare le IgM dalle IgG nel sangue umano.

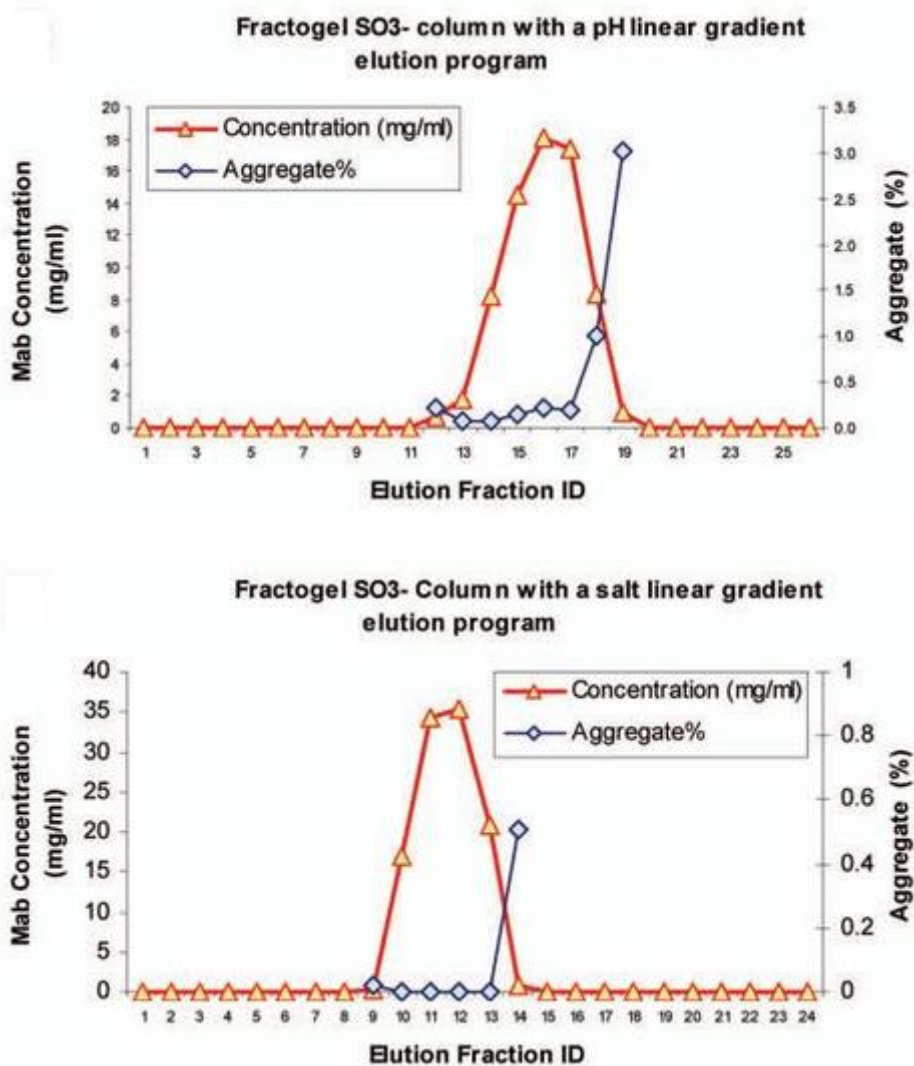
In conclusione, sebbene siano stati studiati molti ligandi sintetici, ad oggi nessuno di questi ha dimostrato di possedere le caratteristiche necessarie per poter sostituire la proteina A nella fase di purificazione degli anticorpi monoclonali; inoltre, è emerso che il protocollo di immobilizzazione del ligando al supporto ha una grande influenza sulle prestazioni delle membrane di affinità e, in particolare, l'effetto dello spaziatore può influenzare significativamente parametri importanti, quali la capacità di adsorbimento, la selettività ed il recupero della biomolecola di interesse. Lo spaziatore è una molecola di basso peso molecolare che viene posta fra il supporto cromatografico ed il ligando di affinità, con il fine di risolvere eventuali problemi di ingombro sterico legati alla scarsa accessibilità dei siti di legame sul ligando da parte delle molecole da purificare. Attraverso un approccio combinato basato su simulazioni di dinamica molecolare e risultati sperimentali, si possono identificare le molecole adatte a questo scopo, come è avvenuto per il caso del TRZ (1,2,3-triazolo), utilizzato in combinazione con i ligandi A2P e B14. Un altro spaziatore studiato in combinazione con l'A2P è il 2LP (1,2-diamminoetano), molecola utilizzata in questo lavoro di tesi, ma con un ligando differente, l'HPTA, in quanto i risultati ottenuti con il complesso 2LP-A2P, immobilizzato su membrane commerciali, non sono stati soddisfacenti [24].

Il processo per la purificazione di anticorpi monoclonali illustrato in figura 1.1, prevede almeno uno stadio di cromatografia a scambio ionico, necessario per la rimozione di aggregati ad alto peso molecolare, residui di DNA, proteina A persa e particelle virali.

In particolare, la cromatografia a scambio anionico si basa sull'uso di gruppi carichi positivamente immobilizzati sul supporto cromatografico e viene utilizzata in modalità "flow-through": le impurezze si legano al supporto cromatografico, mentre le biomolecole di interesse non interagiscono con esso; si lavora ad un valore di pH tale da favorire l'interazione delle impurità e sfavorire le interazioni degli anticorpi con il supporto (pH neutro).

Oltre alla cromatografia a scambio anionico, può essere utilizzata la cromatografia a scambio cationico, in cui il supporto cromatografico presenta gruppi funzionali carichi negativamente; tale tecnica può essere utilizzata nei processi di purificazione di anticorpi il cui pI sia neutro-

basico: le IgG<sub>1</sub> e le IgG<sub>2</sub> sono candidate perfette. In generale, si lavora in modalità “bind and elute”: gli anticorpi si legano al supporto e verranno successivamente eluiti mediante metodo a gradiente di sale o di pH [16]. Come esempio, si considerino i seguenti grafici:



**Figura 1.2:** Eluizione di anticorpi monoclonali IgG<sub>1</sub> con metodo a gradiente di pH (figura in alto) e con metodo a gradiente di sale (figura in basso) per lo scambiatore cationico Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> [16].

Le eluizioni, in riferimento ai grafici della figura 1.2, sono state ottenute aumentando la concentrazione di sale da 5 mM a 250 mM NaCl a pH 6 (eluizione in gradiente di sale) e aumentando il pH da 6 a 8 (eluizione in gradiente di pH): gli anticorpi che si sono legati alla resina a scambio cationico (caratterizzata in questo caso dalla presenza di gruppi funzionali SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) durante la fase di adsorbimento, vengono eluiti, e anche gli aggregati vengono rimossi, con risultati simili nei due casi considerati [16]. Solitamente, la scelta delle condizioni di eluizione

dipende, oltre che dalla capacità di recupero degli anticorpi, dalle condizioni richieste dalla fase successiva scelta per proseguire il processo di purificazione delle biomolecole.

Anche la cromatografia ad interazione idrofobica è molto utile per la separazione di proteine: il campione viene solitamente caricato in condizioni di alta concentrazione di sale, il quale interagisce con le molecole di acqua e riduce la solvatazione delle biomolecole: in questo modo le regioni idrofobiche delle proteine sono libere di legarsi al supporto cromatografico. Ovviamente, più è idrofobica la molecola, meno sale sarà necessario per promuovere il legame anticorpo-supporto. Per ottenere l'eluizione, basterà diminuire la concentrazione di sale: al calare della forza ionica, l'esposizione delle regioni idrofiliche delle molecole aumenterà e queste ultime inizieranno quindi a staccarsi dal supporto in ordine di idrofobicità crescente [16].

Molto utilizzata è anche la cromatografia idrofobica per induzione di carica (HCIC: "hydrophobic charge induction chromatography"), basata sulla dipendenza del comportamento dei ligandi, che costituiscono i gruppi con i quali andranno ad interagire le molecole, dal pH: se la densità di ligando è elevata, l'adsorbimento avviene mediante interazione idrofobica senza che vi sia bisogno di alte concentrazioni di sale, mentre l'eluizione è facilitata abbassando il pH, in modo da produrre una repulsione di carica fra il ligando e la proteina ad esso legata, entrambe cariche positivamente in queste condizioni. A causa del costo elevato, ma anche della bassa resistenza a determinate condizioni che caratterizzano la proteina A, la HCIC è stata suggerita come potenziale alternativa per la fase iniziale di cattura e purificazione degli anticorpi; tuttavia tale metodo cromatografico presenta un problema, non trascurabile, relativo al fenomeno dell'adsorbimento non specifico, che lo rende meno efficiente rispetto alla cromatografia di affinità con proteina A, per cui sono necessari ulteriori studi per apportare delle modifiche che permettano di migliorare i problemi riscontrati [16].

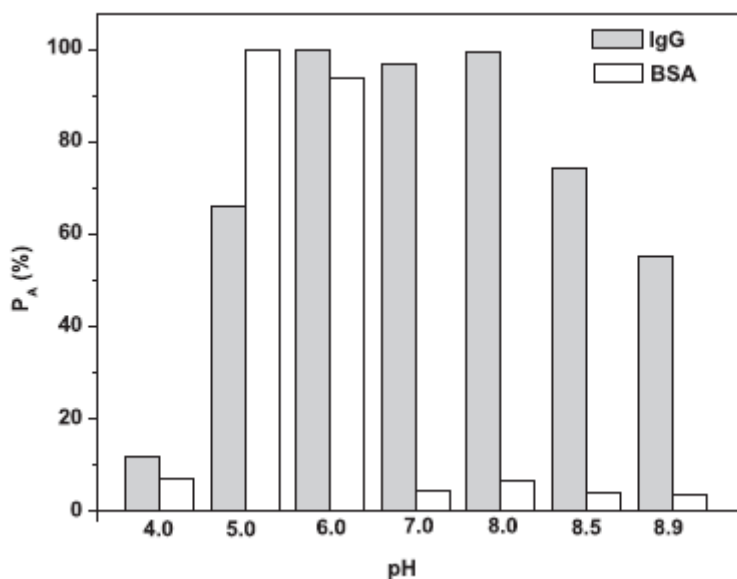
Infine, si cita la cromatografia multimodale: le resine con ligandi detti multimodali possono essere utilizzate a valle del processo cromatografico convenzionale con proteina A, inserendosi all'interno della categoria che abbiamo definito "additional polishing chromatography". Il principio di funzionamento si basa sulla combinazione di differenti tipologie di interazione, come interazioni ioniche, legami idrogeno ed interazioni idrofobiche, in modo da migliorare la selettività del processo. A causa della versatilità e della complessità della tecnica, è necessaria ancora molta ricerca sperimentale per poter definire le condizioni operative e le caratteristiche del ligando ottimali.

Le tipologie di cromatografia appena descritte vengono solitamente utilizzate nei processi industriali di purificazione di anticorpi monoclonali, a valle dello stadio cromatografico con proteina A, ma un'opportuna combinazione di più processi in serie ed un'ottimizzazione dei parametri operativi potrebbe definire una valida strada da percorrere per ottenere immunoglobuline a prezzi più vantaggiosi, eliminando la cromatografia di affinità con proteina A.

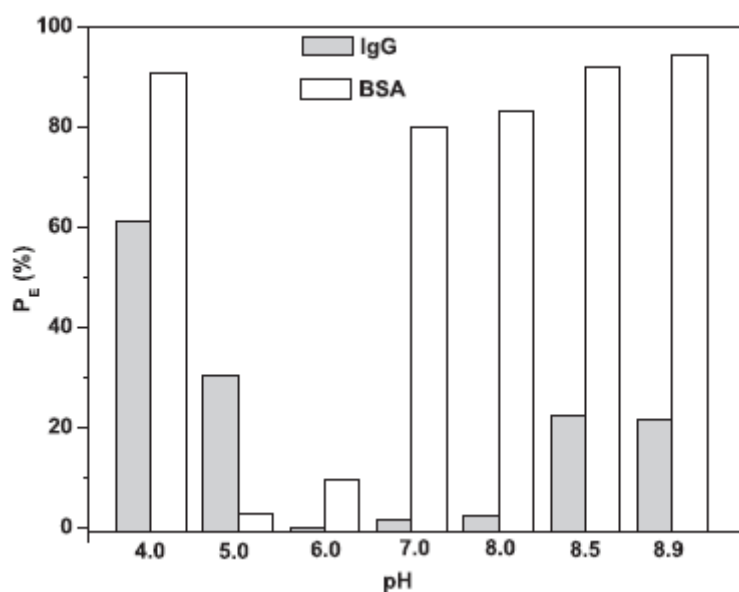
Per esempio, Yu et al. [25] hanno proposto un metodo per la purificazione di anticorpi, a partire dalle foglie di tabacco, così strutturato: lo stadio di cattura degli anticorpi è stato eseguito mediante membrane commerciali a scambio cationico, mentre per la purificazione successiva sono state utilizzate membrane ad interazione idrofobica e seguente operazione di filtrazione. Seguendo questo schema, sono stati in grado di ottenere elevati gradi di purezza nel prodotto finale ed un valore di recupero pari a circa il 77% di anticorpi monoclonali.

Hong et al. [26] hanno proposto la cromatografia idrofobica ad interazione di carica come possibile sostituta della cromatografia convenzionale con proteina A per la purificazione di anticorpi; in particolare, hanno utilizzato la resina MEP, il cui ligando è la 4-mercaptoetilpiridina, che non risulta carico in condizioni di pH neutro, ma si carica positivamente in condizioni acide, per dare il catione piridinico. Le proteine vengono adsorbite sul supporto nelle condizioni in cui il ligando non è carico, per mezzo di interazioni idrofobiche, e vengono eluite grazie alla repulsione elettrostatica che si crea fra la biomolecola ed il ligando carico. Queste condizioni si basano su variazioni di pH, quindi è importante studiare il comportamento delle soluzioni in adsorbimento e in eluizione considerando diverse condizioni operative, in modo da determinare le condizioni ottimali di separazione. In questo modo hanno proceduto Hong et al., prendendo come campione da purificare una miscela binaria di IgG e albumina di siero bovino; nei seguenti grafici vengono illustrati alcuni dei risultati:





**Figura 1.3:** Influenza del pH sull'adsorbimento di IgG e BSA [26].



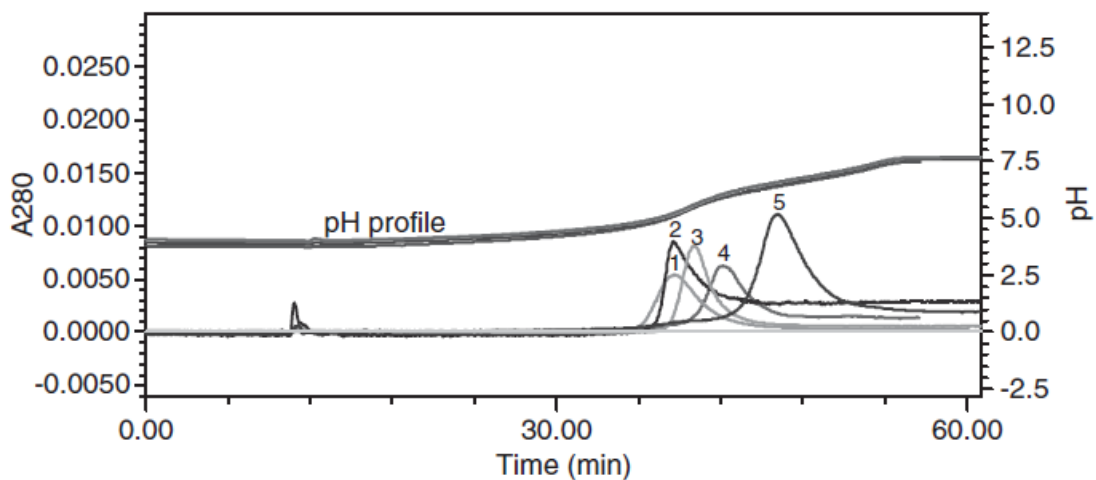
**Figura 1.4:** Influenza del pH sull'eluizione di IgG e BSA [26].

Osservando i grafici, si nota che l'adsorbimento di IgG e BSA è fortemente influenzato dal valore del pH e che il comportamento delle due sostanze è differente: nell'intervallo di pH compreso fra 7 e 8 si ottiene una grande capacità di adsorbimento di anticorpi ed un'alta selettività. Per studiare il rendimento in fase di eluizione, l'alimentazione è stata caricata a pH 6, in modo che sia gli anticorpi sia le albumine fossero entrambe adsorbite quasi completamente dal supporto; dalla figura 1.5, si nota che il valore ottimale di pH per l'eluizione delle IgG è 4 (in queste condizioni si creano repulsioni elettrostatiche fra la proteina ed il ligando, entrambi

carichi positivamente). Si può quindi procedere usando come condizioni di lavaggio tamponi a pH 8, in modo da rimuovere l'albumina dal supporto, ed eluire gli anticorpi a pH 4.

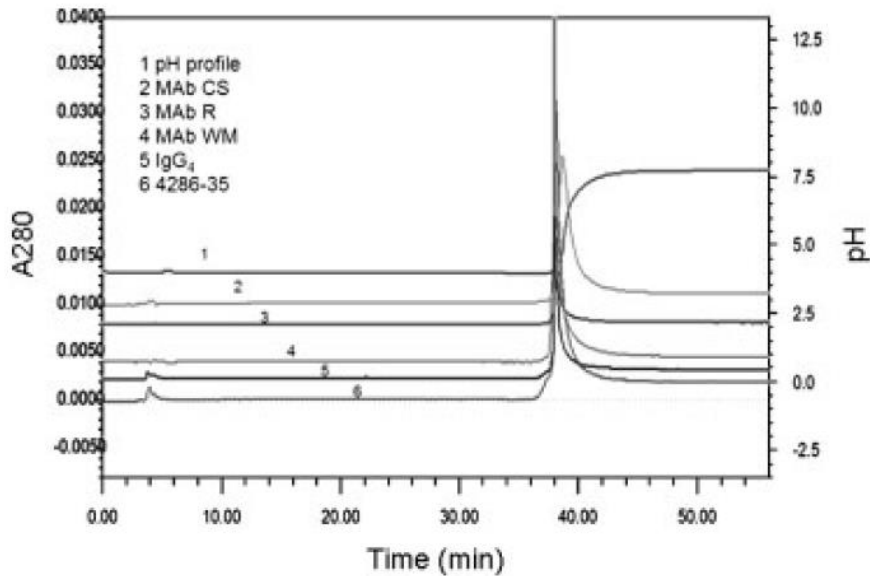
Sottolineando la necessità di migliorare la selettività del processo, soprattutto a causa della presenza nel prodotto finale di albumina, gli stessi autori hanno studiato anche l'influenza di alcuni additivi con il fine di migliorare l'efficienza in fase di eluizione ed aumentare la purezza delle IgG: il sale NaCl si è rivelato utile a tale scopo, contribuendo alla rimozione dell'albumina dal supporto cromatografico senza influenzare l'adsorbimento degli anticorpi [26].

Paul K. Ng e Mark A. Snyder [3] hanno considerato l'utilizzo di uno scambiatore cationico come possibile alternativa per la fase di cattura degli anticorpi. In particolare, hanno studiato la resina Nuvia S e hanno utilizzato variazioni di pH per valutare la capacità di adsorbimento ed il rendimento in fase di eluizione per anticorpi con cinque differenti punti isoelettrici. Gli anticorpi sono stati adsorbiti in un tampone acido (pH 4,5) ed eluiti seguendo il metodo del gradiente di pH, che è stato fatto variare da 4,5 a 8; l'andamento dell'assorbanza con il tempo per la fase di eluizione è mostrato nella seguente figura:



**Figura 1.5:** Eluizione di anticorpi monoclonali con il metodo del gradiente di pH [3].

Nella figura, i numeri da 1 a 5 indicano gli anticorpi in ordine di punto isoelettrico crescente. In questo caso, è possibile ottenere l'eluizione anche variando direttamente il valore di pH da 4,5 a 8, ottenendo il seguente cromatogramma:



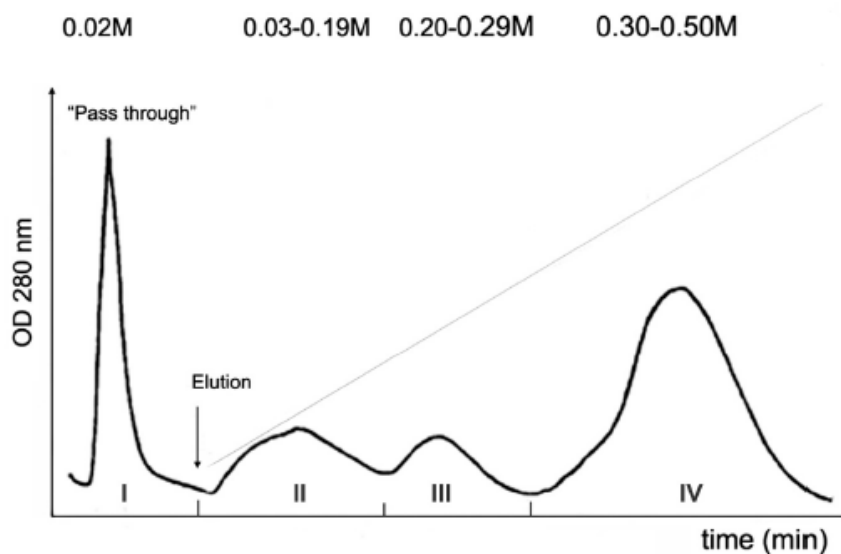
*Figura 1.6: Eluizione di anticorpi monoclonali variando il pH da 4,5 a 8 in un singolo stadio [3].*

Lo scopo degli autori è quello di dimostrare la possibilità di sostituire il processo cromatografico con proteina A mediante un processo cromatografico a scambio cationico per la purificazione di anticorpi su scala industriale. Solitamente la cromatografia di affinità è seguita da altri stadi, quali la cromatografia a scambio anionico con successiva cromatografia ad interazione idrofobica oppure di tipo multimodale. Quindi, utilizzando un campione costituito da una miscela complessa dalla quale si vogliono purificare gli anticorpi, gli autori propongono di eseguire un ciclo cromatografico di scambio cationico con la resina Nuvia S, e di procedere successivamente con un ciclo cromatografico a scambio anionico (utilizzando la resina Nuvia Q), seguito da un processo cromatografico multimodale, per rimuovere completamente le impurezze. I risultati ottenuti dimostrano che la sequenza di operazioni presentata permette di ottenere un prodotto caratterizzato da valori accettabili di impurezze residue.

Molti altri autori hanno studiato la cromatografia a scambio cationico e la possibilità di utilizzare questo metodo per sostituire la cromatografia con proteina A: per esempio, T. Müller-Späth et al. suggeriscono di procedere tramite due operazioni successive: precipitazione e scambiatore cationico [27].

Altri autori, invece, si sono concentrati sullo studio della cromatografia a scambio anionico come metodo per la purificazione delle immunoglobuline in sostituzione dello stadio con colonna proteina A, evidenziandone i vantaggi rispetto alla cromatografia di affinità: minore costo, maggiore stabilità, facilità di lavaggio e pulizia, oltre all'alta efficienza nella separazione, che può essere raggiunta determinando le condizioni più opportune da applicare in fase di

adsorbimento ed eluizione. Vesna Ilić et al. [28] hanno utilizzato uno scambiatore anionico con ammine quaternarie quali gruppi ionici (resina Q Sepharose Fast Flow) per purificare campioni di siero umano. Il tampone di adsorbimento utilizzato è costituito da 20 mM Tris pH 7,5: in queste condizioni il 42% delle IgG è passata attraverso la colonna senza interagire con lo scambiatore, mentre il 58% è stato adsorbito. L'eluizione è stata ottenuta aumentando la concentrazione di sale NaCl con il metodo del gradiente, ottenendo il cromatogramma riportato nella seguente figura:



**Figura 1.7:** Eluizione di campioni di siero umano ottenuta con il metodo del gradiente di sale [28].

Si nota la presenza di quattro picchi: il primo picco è dato dalle proteine che passano attraverso la colonna senza interagire con lo scambiatore, gli altri tre picchi corrispondono alle proteine che si sono legate al supporto ed eluiscono a diversi valori della concentrazione di sale. Mediante analisi elettroforetica, è emerso che circa il 70% di IgG si trova nei primi due picchi, in cui sono assenti IgA e IgM; nei picchi 3 e 4 il contenuto totale di IgG è invece pari al 30% e sarà quindi fortemente contaminato dalle altre proteine del siero. Gli anticorpi parzialmente purificati mediante cromatografia a scambio anionico possono essere ulteriormente purificati con un processo di cromatografia a scambio cationico per raggiungere il livello di purezza richiesto.

Dopo aver descritto alcuni degli studi condotti con l'obiettivo comune di determinare una strada alternativa al processo di cattura degli anticorpi monoclonali con la proteina A, è bene sottolineare che, a livello industriale, vengono utilizzate resine come supporto cromatografico, con le limitazioni discusse nel paragrafo 1.1.1. La sostituzione di resine con membrane porose

nei vari processi cromatografici descritti, porterebbe a numerosi vantaggi, come minori perdite di carico e possibilità di operare con portate maggiori, con conseguente riduzione dei tempi di processo e dei quantitativi di tampone utilizzati. Nonostante ciò, la cromatografia con membrane deve superare alcune limitazioni prima di poterne considerare un possibile impiego a livello industriale: in particolare, è necessario migliorare le capacità di adsorbimento e la distribuzione del flusso, scopo che può essere raggiunto ottimizzando la dimensione dei pori, lo spessore ed il numero delle membrane che costituiscono il modulo di separazione.

## 1.2 FINALITA' DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi di laurea è la ricerca di una combinazione ligando-spaziatore che possa sostituire il ruolo della proteina A nella cattura delle immunoglobuline G, utilizzando processi di cromatografia di affinità con membrane. La tesi si inserisce all'interno di un lavoro già iniziato dal gruppo di ricerca e, quindi, si sviluppa a partire dai risultati precedenti, cercando di risolvere eventuali problemi riscontrati.

In particolare, è già stato studiato il complesso ligando-spaziatore A2P-2LP per la purificazione di IgG; è stato sviluppato il protocollo di immobilizzazione alle membrane e sono stati effettuati gli studi sulla cinetica, in modo da conoscere il tempo necessario per raggiungere le condizioni di equilibrio nelle varie fasi del ciclo cromatografico. Le prove sono state eseguite utilizzando soluzioni pure di IgG e, sebbene siano stati ottenuti risultati soddisfacenti in merito alla capacità del complesso di legare gli anticorpi, sono stati riscontrati dei problemi nella fase di eluizione riguardo la reversibilità del legame [24]. A questo punto si è deciso di studiare un nuovo ligando, realizzato proprio pensando di migliorare la fase di eluizione: si tratta del complesso HPTA-2LP, che è stato utilizzato sia in prove batch che in cicli cromatografici eseguiti in condizioni dinamiche, sia con soluzioni pure che con miscele, per valutare l'effetto dei contaminanti sul processo cromatografico.

Gli studi hanno evidenziato il problema dell'adsorbimento non specifico relativo a tale complesso, per la risoluzione del quale sono stati indagati il ruolo del supporto, dell'agente utilizzato per eseguire i protocolli di reticolazione e dello spaziatore, oltre al ruolo rivestito dal ligando. Infatti è necessario conoscere l'effetto di ognuno di questi elementi sul processo al fine di apportare le opportune modifiche e migliorare capacità e selettività delle matrici.

Utilizzando le membrane SartoBind Epoxy come supporto, è stato ottimizzato il protocollo di endcapping (stadio necessario per neutralizzare i siti attivi residui che potrebbero portare a fenomeni di adsorbimento non specifico) ed è stato scelto come agente il  $\beta$ -mercaptoetanololo [24].

Attraverso prove con le IgG e alcuni fra i più importanti contaminanti, quali l'albumina ed il lisozima, sia in miscela che in soluzioni pure, è emerso che la causa principale dell'adsorbimento non specifico è da ricercare nello spaziatore, mentre lo scarso rendimento che si ottiene durante la fase di eluizione costituisce un problema ancora da risolvere, seppure il ligando HPTA si sia rivelato migliore a tal proposito rispetto al precedente ligando studiato (A2P). E' stata inoltre evidenziata una perdita di efficienza da parte del ligando nel legare le IgG nei cicli cromatografici successivi al primo [24].

Gli studi precedenti suggeriscono quindi di indagare il ruolo rivestito dallo spaziatore nel fenomeno dell'adsorbimento non specifico, il quale deve essere limitato al minimo al fine di evitare la formazione di legami con i contaminanti: lo spaziatore 2LP, infatti, introduce gruppi amminici sul supporto, i quali possono interagire con le impurità dando luogo a legami idrogeno stabili e questo creerebbe un ostacolo all'adsorbimento delle immunoglobuline. In particolare, un eventuale legame della BSA con lo spaziatore, a causa del suo ingombro sterico, andrebbe ad ostacolare il trasporto degli anticorpi verso i siti attivi del ligando; inoltre, poiché i legami fra lo spaziatore e la BSA sono molto forti, durante la fase di eluizione questo contaminante viene rilasciato solo in minima parte, creando un impedimento anche al recupero delle IgG e portando ad un calo dei siti attivi disponibili nel ligando da un ciclo cromatografico al successivo. Oltre alla BSA, possono formarsi legami indesiderati anche con altri contaminanti, quali il lisozima, ma in questo caso la tendenza alla creazione di legami idrogeno stabili con i gruppi amminici dello spaziatore è minore, per cui il lisozima non costituisce l'ostacolo principale all'adsorbimento e alla successiva eluizione delle immunoglobuline.

Alla luce delle ricerche precedenti, il lavoro di tesi parte da un'indagine sulle cause dell'adsorbimento non specifico, in particolare si vuole conoscere l'influenza dello spaziatore su tale fenomeno e trovare una strategia per limitarlo, in modo da ottenere anche migliori rendimenti in fase di eluizione rispetto ai risultati precedenti. A questo scopo, inizialmente si eseguono cicli cromatografici in batch utilizzando membrane attivate non con l'intero complesso ligando-spaziatore, ma unicamente con lo spaziatore, cercando di definire il protocollo più opportuno da applicare per effettuare l'endcapping dei gruppi amminici ritenuti

responsabili dell'adsorbimento non specifico. Le prove vengono eseguite con soluzioni pure di albumina di siero bovino e con soluzioni pure di lisozima.

In secondo luogo, si eseguono cicli cromatografici in batch con membrane di affinità, ovvero immobilizzando sul supporto cromatografico l'intero complesso ligando-spaziatore, con il fine di ottenere una caratterizzazione in termini di capacità di adsorbimento della proteina di interesse e di efficienza nella fase di eluizione. Oltre alle prove con soluzioni pure, si effettuano prove con miscele binarie di IgG e contaminanti e prove con siero umano, contenente il 10% circa di composti organici (soprattutto proteine, albumine e globuline), fra i quali vi sono le immunoglobuline da purificare.

Infine, si passa dalla cromatografia di affinità alla cromatografia a scambio ionico e, in particolare, si studiano membrane per cromatografia a scambio cationico. Tale tecnica è comunemente utilizzata per i processi di purificazione degli anticorpi monoclonali, a valle del processo cromatografico di affinità con proteina A, ma potrebbe essere considerata anche come una possibile alternativa al processo di cattura convenzionale delle IgG [3, 27, 29], magari combinando in modo opportuno più processi cromatografici in serie, come discusso nel paragrafo 1.1.2.

E' stato deciso di studiare sia membrane non commerciali a base di politriazolo (PTA-OH), funzionalizzate con gruppi solfonici, sia membrane commerciali (SartoBind S): si effettuano cicli cromatografici in condizioni dinamiche utilizzando soluzioni pure di lisozima, con lo scopo di determinare la capacità dinamica di adsorbimento del supporto ed il rendimento in fase di eluizione. Inoltre, si eseguono prove ad impulso per determinare il grado di vuoto di questi supporti.

## CAPITOLO 2

# TECNICHE CROMATOGRAFICHE PER LA SEPARAZIONE DI PROTEINE

### 2.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo verranno illustrate diverse tecniche cromatografiche sfruttate per la purificazione delle proteine, con particolare attenzione alla cromatografia di affinità ed alla cromatografia a scambio ionico.

Il termine cromatografia indica un insieme di metodi il cui scopo è quello di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne un'analisi di tipo qualitativo e/o quantitativo; il processo cromatografico rappresenta una delle tecniche di separazione più utilizzata, in quanto estremamente efficiente e versatile, permettendo di raggiungere purezze elevate del prodotto di interesse.

L'invenzione viene attribuita a Mikhail Tswett, biochimico russo che nel 1906, utilizzò tale tecnica per separare i pigmenti colorati presenti nelle foglie dei vegetali [1]. La cromatografia è nata quindi come tecnica di separazione e, solo successivamente, è stata sfruttata anche come tecnica analitica.

Nei metodi cromatografici i componenti si separano distribuendosi fra due fasi, una chiamata fase fissa o fase stazionaria, e l'altra chiamata fase mobile, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa.

In generale, si tratta di un adsorbimento a letto fisso: una colonna, contenente il supporto cromatografico, la fase stazionaria, viene alimentata con la miscela contenente i componenti da separare, la fase mobile; le sostanze devono potersi sciogliere nella fase mobile e devono possedere la capacità di interagire in qualche modo con la fase stazionaria, secondo un qualsiasi principio chimico o chimico-fisico: introducendo nella colonna la miscela, se un componente non mostra alcun tipo di interazione con la fase stazionaria, uscirà alla stessa velocità della fase mobile; al contrario, se un componente dovesse interagire in modo irreversibile con la fase stazionaria, non uscirebbe più dalla colonna.

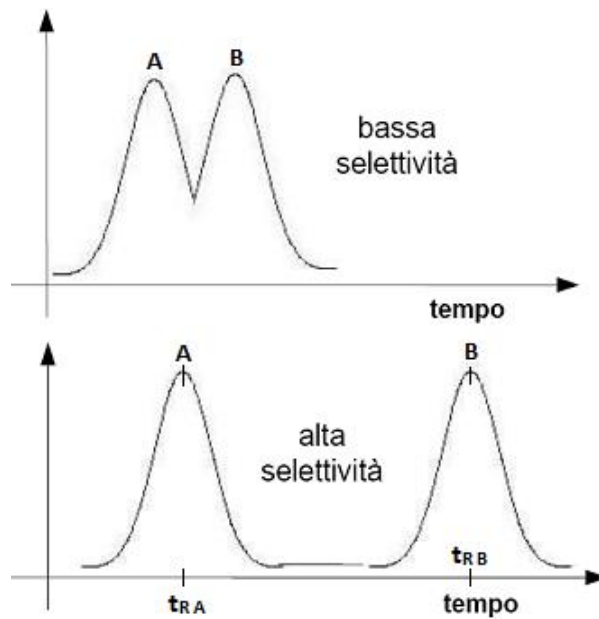


In un sistema cromatografico ben organizzato, si scelgono le condizioni operative (pH, velocità della fase mobile, temperatura, natura chimica della fase stazionaria e mobile, etc...) in modo che le sostanze da separare interagiscano in modo reversibile con la fase stazionaria [30]. Nei più comuni processi industriali, i soluti vengono adsorbiti dal materiale di riempimento finché non viene saturata la capacità del letto; in seguito la colonna deve essere sottoposta ad una fase di lavaggio, per rimuovere le impurezze dagli spazi interstiziali, ed infine deve essere sottoposta alla fase di eluizione, che viene eseguita mediante l'uso di solventi in grado di rompere i legami delle proteine con la fase stazionaria e rendere agevole il recupero delle biomolecole.

La metodologia generale appena illustrata è valida per tutti i processi cromatografici, ad eccezione della cromatografia ad esclusione di forma: in questo caso il principio di separazione è basato sulle differenze fra i vari componenti in termini di struttura e dimensione molecolare, a causa delle quali si otterranno diverse velocità di migrazione delle sostanze attraverso la colonna [31].

Il cromatogramma, generato solitamente da software dedicati, è il grafico prodotto da un'analisi cromatografica, che correla la risposta del rivelatore (l'assorbanza) al tempo: consiste in una serie di picchi, ognuno dei quali corrisponde all'eluizione di un componente che inizialmente si trovava nella miscela da separare [32]. Il successo di una separazione cromatografica è giudicato in base alla capacità del sistema di separare il picco di ogni analita presente nel campione iniziale dai picchi relativi alle altre sostanze. Ogni componente subirà un ritardo differente e l'uscita di ogni singola sostanza non sarà concentrata in un istante infinitesimo, ma occuperà un certo lasso di tempo, entro il quale la concentrazione salirà velocemente fino a raggiungere un valore massimo, per poi calare in modo altrettanto veloce descrivendo una curva (in un grafico assorbanza-tempo) simile ad una gaussiana. Il tempo impiegato da ogni componente della miscela per percorrere la colonna, dal momento della sua introduzione al momento della sua uscita corrispondente al massimo della gaussiana, prende il nome di tempo di ritenzione [33].

Si consideri come esempio una miscela composta da due componenti, A e B, da separare attraverso una tecnica cromatografica. Nella seguente figura viene illustrato un cromatogramma (contenente due picchi, uno relativo ad A ed uno relativo a B), in cui si evidenzia il tempo di ritenzione caratteristico di ciascuno dei due componenti e l'importanza della selettività, ovvero l'importanza di ottenere picchi ben separati l'uno dall'altro:



**Figura 2.1:** Esempio di cromatogramma, con indicazione dei tempi di ritenzione, per una miscela costituita da due sostanze, A e B, nel caso in cui si abbia bassa selettività (figura superiore) o alta selettività (figura inferiore).

La separazione cromatografica può essere effettuata sfruttando varie proprietà delle proteine e dei materiali utilizzati come fase adsorbente, in particolare bisogna valutare la composizione chimica della miscela reagente, la struttura e la stabilità dei componenti, la carica elettrica ad un certo pH, il punto isoelettrico della proteina, il carattere idrofobico o idrofilico e la dimensione delle molecole. Sulla base di questa valutazione, si seleziona il metodo cromatografico più opportuno.

## 2.2 I PROCESSI CROMATOGRAFICI

Come già evidenziato, le tecniche cromatografiche si distinguono l'una dall'altra in base ai diversi principi sfruttati per la separazione e la purificazione delle biomolecole di interesse. Di seguito vengono illustrati alcuni dei processi cromatografici più utilizzati.

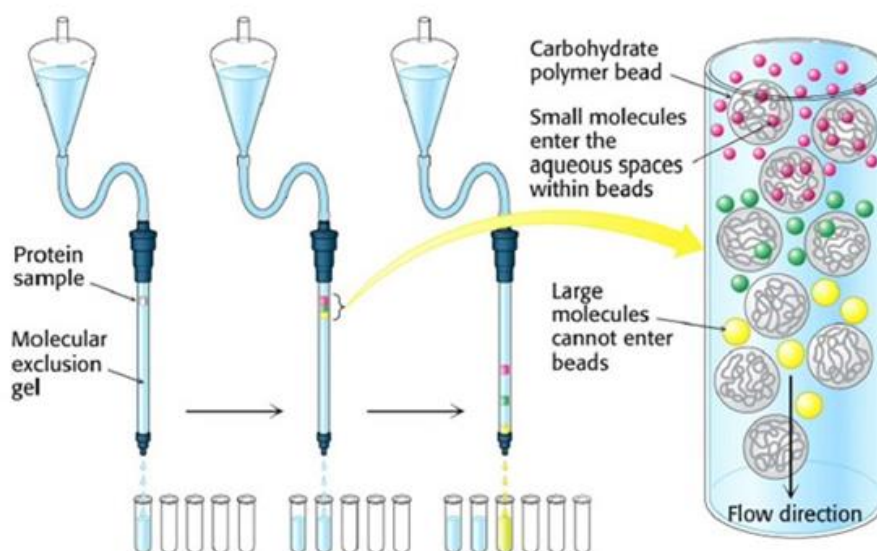
### 2.2.1 La cromatografia ad esclusione di forma (SEC)

La cromatografia ad esclusione di forma, o gel filtrazione, sfrutta la forma ed il peso molecolare delle molecole per ottenerne la separazione. La fase stazionaria è costituita da un materiale inerte poroso (gel); il gel consiste in una rete aperta tridimensionale, i cui pori possono essere attraversati solo dalle molecole più piccole, che si distribuiscono nel volume di solvente

presente sia all'interno che all'esterno del setaccio molecolare, mentre le molecole più grandi saranno escluse dal volume di solvente presente all'interno dei pori e, di conseguenza, attraverseranno la colonna più rapidamente rispetto agli altri soluti [34]. Quindi, se la proteina che si intende separare risulta molto più grande o molto più piccola rispetto alle altre molecole presenti nel campione, la cromatografia ad esclusione di forma riuscirà a separare tale biomolecola dalla miscela alimentata alla colonna in modo soddisfacente.

I materiali più usati per la cromatografia ad esclusione di forma sono il destrano (un polimero del glucosio ad alto peso molecolare), l'agarosio e la poliacrilammide.

Nella seguente figura viene illustrato uno schema della cromatografia ad esclusione di forma:



**Figura 2.2:** Schema di un processo cromatografico ad esclusione di forma [35].

Il campione contenente le proteine da separare viene alimentato alla colonna: le molecole gialle, più “grandi”, non entrano nei pori e saranno le prime ad uscire dal letto, le molecole rosa, più “piccole”, entrano nei pori e, di conseguenza, usciranno dalla colonna impiegando tempi maggiori. Come mostrato in figura, è possibile raccogliere separatamente le varie frazioni eluite.

Diversamente dalle altre tecniche cromatografiche, nella cromatografia ad esclusione di forma non si assiste alla formazione di legami fra le molecole ed il supporto e questo costituisce un vantaggio del metodo, in quanto è possibile variare le condizioni di lavoro senza alterare il processo separativo [36].

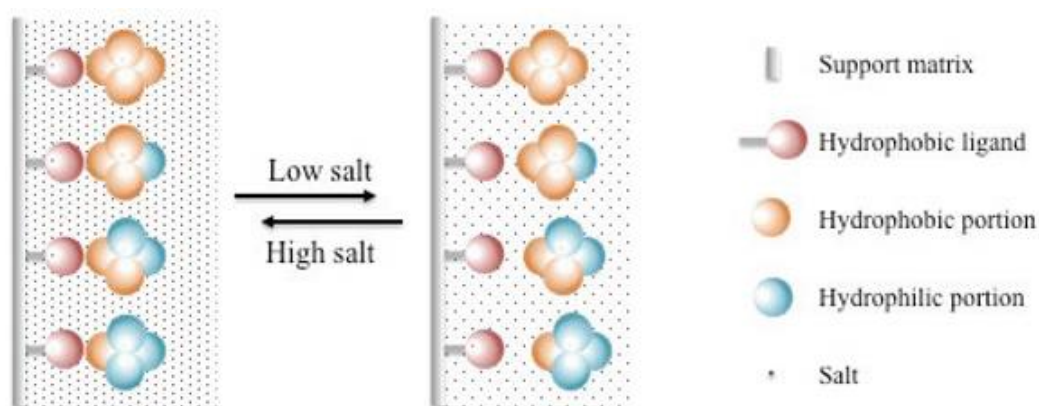
## 2.2.2 La cromatografia ad interazione idrofobica (HIC)

La cromatografia ad interazione idrofobica è un tipo di cromatografia sviluppato per la purificazione delle proteine, che sfrutta la loro idrofobicità superficiale [37].

La fase stazionaria è costituita da una matrice inerte (ad esempio agarosio) alla quale sono legati gruppi idrofobici (ad esempio gruppi fenile) che andranno ad interagire con le biomolecole da separare; queste ultime posseggono sulla superficie un film di molecole di acqua in struttura ordinata in corrispondenza delle regioni idrofobiche: tali strutture prendono il nome di clatrati. I clatrati possono venire disgregati e le aree idrofobiche possono essere “scoperte” in presenza di alte concentrazioni di sali, i quali fanno in modo che i gruppi idrofobici delle proteine possano interagire con quelli della fase stazionaria. L’interazione è incrementata aumentando la forza ionica: al crescere della concentrazione di sale si favorisce l’interazione proteina-fase fissa; al contrario, in condizioni di basse concentrazioni saline, le biomolecole legate alla fase fissa vengono eluite. In pratica, si carica la colonna in condizioni di alta forza ionica e poi si eluisce mediante un gradiente a forza ionica decrescente, che consente un distacco graduale delle proteine dalla fase stazionaria [38]. Lo stato nativo delle proteine viene mantenuto durante la fase di eluizione.

Poiché in condizioni di elevata forza ionica le proteine possono anche interagire tra loro, si ottiene una migliore risoluzione quando il materiale di partenza è già stato parzialmente purificato.

Nella seguente figura viene illustrato uno schema che rappresenta il processo cromatografico per interazione idrofobica:

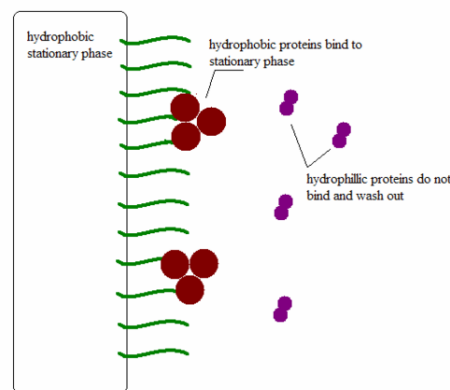


**Figura 2.3:** Schema della cromatografia ad interazione idrofobica: le molecole vengono trattenute in condizioni di alta concentrazione salina (figura a sinistra) ed eluite riducendo la concentrazione di sale (figura a destra) [39].

### 2.2.3 La cromatografia a fase inversa (RPC)

La cromatografia a fase inversa è una tipologia di cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria è apolare (spesso un idrocarburo), mentre quella mobile è relativamente polare (di solito acqua, metanolo, acetonitrile o miscele di questi solventi).

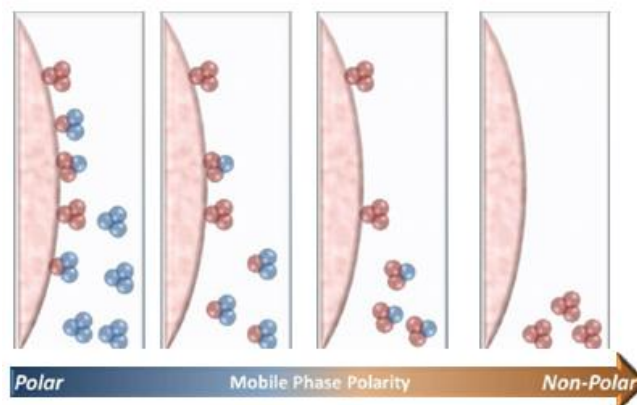
La ritenzione è basata sulla ripartizione dell'analita fra la fase mobile e la fase stazionaria: analiti più polari hanno maggiore affinità per la fase mobile e vengono eluiti prima, analiti meno polari sono caratterizzati da maggiore affinità per la fase stazionaria e vengono trattenuti [40], come illustrato nella seguente immagine:



**Figura 2.4:** Schema della cromatografia a fase inversa: ripartizione delle proteine fra la fase stazionaria e la fase mobile, in base al carattere idrofobico o idrofilico [41].

Le proteine in questi solventi sono solitamente denaturate, per cui tale tecnica viene utilizzata più come metodo analitico che come metodo per separare e purificare le biomolecole [38].

L'eluizione si può ottenere modificando la polarità della fase mobile, come illustrato nella seguente figura:



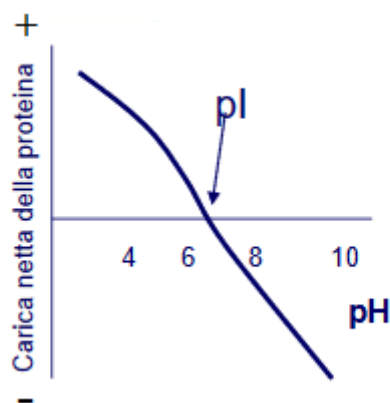
**Figura 2.5:** Schema della cromatografia a fase inversa: variazione della polarità della fase mobile [42].

## 2.2.4 La cromatografia a scambio ionico (IEC)

### 2.2.4.1 Introduzione

La cromatografia a scambio ionico si basa su interazioni di tipo elettrostatico, ovvero sull'attrazione che si verifica tra molecole cariche di segno opposto [37]. Molte sostanze biologiche, quali le proteine, contengono gruppi ionizzabili ed il fatto che la loro carica netta sia positiva oppure negativa può essere sfruttato per ottenere la separazione dalle miscele che li contengono. Il pH del sistema gioca un ruolo fondamentale in questo tipo di cromatografia, dato che tramite le sue variazioni si può modificare la carica delle molecole del campione: la carica netta posseduta da una proteina dipende infatti dal suo punto isoelettrico e dal pH della soluzione [43].

Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della sostanza è pari a zero: per valori di pH maggiori del punto isoelettrico la proteina è carica negativamente, mentre per valori di pH minori la proteina è carica positivamente, come illustrato nella seguente figura:

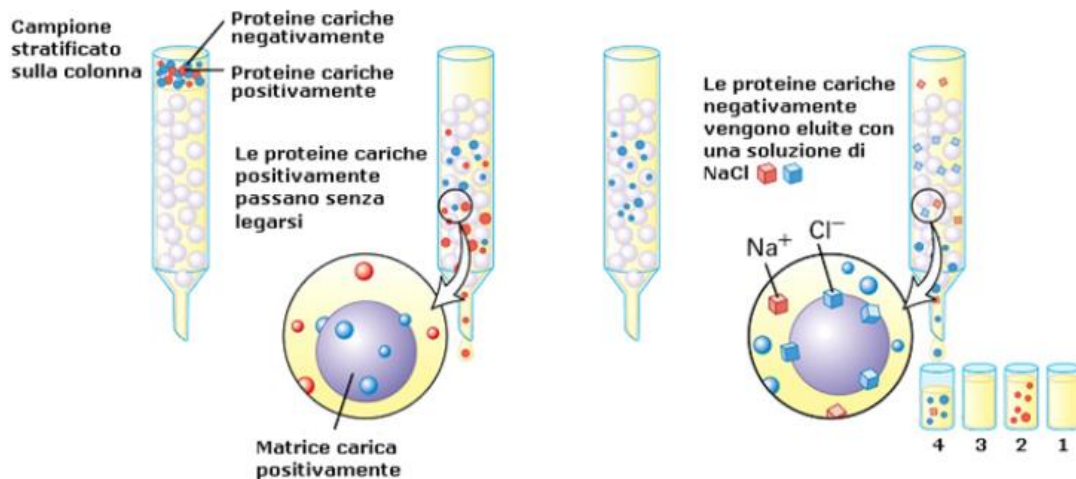


**Figura 2.6:** Carica netta di una proteina al variare del pH della soluzione, in base al suo punto isoelettrico, pI.

Le cromatografia a scambio ionico prevede l'utilizzo di colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni e, in particolare, esistono due tipi di resine: gli scambiatori di tipo cationico e gli scambiatori di tipo anionico. Le resine anioniche possiedono gruppi carichi positivamente (ad esempio il gruppo  $-\text{NR}_3^+$ ), ed attraggono quindi molecole cariche negativamente; al contrario, le resine cationiche possiedono gruppi carichi negativamente (ad esempio i gruppi  $-\text{SO}_3^-$  e  $-\text{COO}^-$ ), per cui attraggono molecole cariche positivamente [44]. Si parla di scambiatori ionici forti quando l'intervallo di pH di utilizzo è ampio, altrimenti si parla di scambiatori di tipo debole.

### 2.2.4.2 Il meccanismo di separazione

Il meccanismo che sta alla base della cromatografia a scambio ionico è illustrato nella seguente figura:

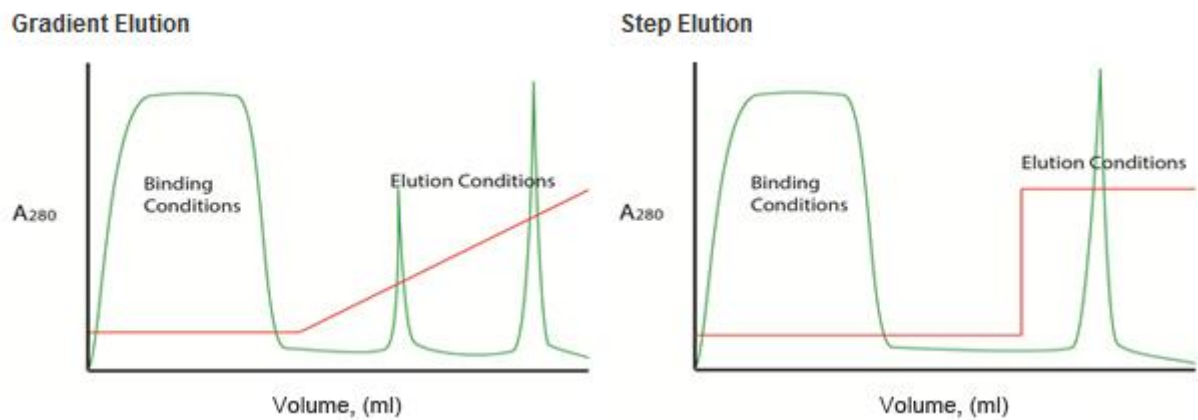


**Figura 2.7:** Schema della cromatografia a scambio ionico, con matrice carica positivamente. Vengono rappresentate in rosso le proteine cariche positivamente ed in blu le proteine cariche negativamente [45].

Le proteine cariche negativamente che hanno interagito con il supporto cromatografico, devono essere eluite: nel caso presentato si utilizza una soluzione di NaCl. In generale, mentre il pH e la forza ionica iniziali devono essere tali da consentire il legame al supporto cromatografico delle molecole contenute nel campione, durante la fase di eluizione si dovrà usare un tampone che favorisca il distacco ed il recupero delle proteine di interesse. Tale fase può essere realizzata con una soluzione salina, seguendo uno dei seguenti metodi [46]:

1. Eluizione a gradiente: si varia la composizione del solvente per aumentarne gradualmente la forza eluente, ovvero si aumenta la concentrazione salina in modo lineare, cosicché le proteine legate debolmente escano per prime, mentre quelle legate in modo più forte escano per ultime. In questo modo è possibile migliorare le separazioni.
2. Eluizione a step: si utilizza un tampone contenente una determinata concentrazione salina, metodo utilizzabile se si conosce l'intervallo di concentrazione in cui la biomolecola viene eluita e se i contaminanti vengono eluiti a concentrazioni saline molto diverse dalla proteina di interesse.

Nella seguente immagine vengono illustrati i cromatogrammi relativi ai due metodi di eluizione appena descritti:



**Figura 2.8:** Cromatogramma caratteristico che si ottiene utilizzando un tipico scambiatore cationico: eluizione a gradiente (sinistra) ed eluizione a step (destra) [47].

Nella cromatografia a scambio ionico delle proteine, i campioni vengono solitamente caricati in condizioni di bassa forza ionica, mentre le molecole che si legano al supporto cromatografico vengono eluite, mediante eluizione a gradiente o a step, utilizzando un tampone caratterizzato da una forza ionica più alta. La proteina si lega ad una resina a scambio anionico se il pH del tampone è più alto del suo punto isoelettrico, viceversa per gli scambiatori cationici. Alcuni dei tamponi cationici più usati sono il Tris (impiegato durante il lavoro di tesi) e le alchilammine; i tamponi più usati nel caso di scambiatori anionici sono il fosfato e l'acetato [48].

Una precisazione importante riguarda la stabilità del campione: molte biomolecole, infatti, sono stabili solo se non si superano determinati valori di pH, per cui il processo cromatografico dovrà essere condotto in modo da non uscire al di fuori di un certo intervallo.

Si noti inoltre che, grazie alla natura delle interazioni idrofobiche ed alla forza ionica, la cromatografia ad interazione idrofobica e la cromatografia a scambio ionico possono essere usate sequenzialmente: dopo uno scambiatore di tipo ionico, la biomolecola si trova in condizioni di alta concentrazione salina e potrà quindi essere direttamente caricata su una colonna ad interazione idrofobica; al contrario, una colonna ad interazione idrofobica viene eluita in condizioni di bassa concentrazione salina, situazione che favorisce il legame delle proteine con un supporto cromatografico a scambio ionico.



### 2.2.4.3 Le matrici per cromatografia a scambio ionico

A livello industriale, la separazione mediante cromatografia a scambio ionico è condotta su colonne impaccate con resine scambiatrici di ioni. Tali resine sono costituite da un reticolo tridimensionale di catene di natura organica unite tra loro da legami incrociati: per esempio, uno scheletro polistirenico può essere ottenuto per copolimerizzazione dello stirene con il divinilbenzene; in base al contenuto di divinilbenzene è possibile variare il grado di reticolazione. Gli anelli benzenici possono essere modificati per produrre una resina a scambio cationico contenente gruppi solfonici ( $-\text{SO}_3^-$ ) oppure una resina anionica contenente gruppi ammoniacali ( $-\text{NR}_3^+$ ); se al posto dello stirene si usa un acido metacrilico, si ottiene una resina con gruppi attivi carbossilici ( $-\text{COO}^-$ ) e scheletro acrilico-divinilbenzenico [48].

Il grado di reticolazione nelle resine a scambio ionico è scelto in base alle caratteristiche che dovrà presentare lo scambiatore: resine con alto grado di reticolazione sono rigide e poco porose, ma molto selettive, le resine con basso grado di reticolazione sono più veloci nel raggiungere l'equilibrio ma sono meno selettive.

Oltre ai polimeri dello stirene, le matrici di supporto possono essere costituite da cellulosa, destrano o agarosio.

Nella seguente tabella si riportano alcuni dei supporti attualmente disponibili in commercio:

**Tabella 2.1:** Matrici e nomi commerciali di alcune delle resine per scambio ionico disponibili sul mercato: resine per scambio anionico (a sinistra) e resine per scambio cationico (a destra) [49].

Anion Exchange Media		Cation Exchange Media	
Matrix	Brand Names/ Functionality	Matrix	Brand Names/ Functionality
Agarose DEAE: 45-165 µm Q FF: 45-165 µm Q HP: 24-44 µm	Sepharose® DEAE CL-6B DEAE FF Q FF Q HP	Agarose CM: 45-165 µm SP FF: 45-165 µm SP HP: 24-44 µm	Sepharose® CM CL-6B FF SP Sepharose FF HP
Cellulose 40-160 µm (microgranular)	DEAE Sephacel®	Cellulose fibrous microgranular	CM Phosphate
Dextran 40-125 µm	Sephadex® DEAE QAE	Dextran 40-120 µm	Sephadex CM SP
Methacrylate C: 60-150 µm M: 40-90 µm S: 20-50 µm	Toyopearl® DEAE QAE Q	Methacrylate C: 60-150 µm M: 40-90 µm S: 20-50 µm	Toyopearl® CM SP
Polystyrene strong anion most 16-50 mesh (297-1000 µm)	Types I & II Amberlite® Diaion™ Dowex®	Polystyrene strong cation most 16-50 mesh (297-1000 µm)	Amberlite® Diaion™ Dowex® Duolite® SO <sub>3</sub> H
Polystyrene weak anion 16-50 mesh (297-1000 µm)	Amberlite Diaion alkylamine Dowex polyamine Duolite® polyamine	Polyacrylic weak cation most 16-50 mesh (297-1000 µm)	Amberlite Diaion Dowex Duolite COOH

Molti studi stanno valutando la possibilità di sostituire le tradizionali resine a scambio ionico con membrane, in modo da poter usufruire dei vantaggi (discussi nel seguente paragrafo 2.2.5) che un tale processo comporterebbe.

Heater L. Knudsen et al. [50], per esempio, hanno utilizzato membrane a scambio ionico acquistate da Sartorius (SartoBind S e SartoBind Q) per studiare i processi di purificazione di anticorpi. Le membrane sono entrambe costituite da un supporto in cellulosa; le SartoBind S, che contengono gruppi solfonici, possono essere utilizzate in processi di cromatografia a scambio cationico per lo stadio di cattura delle IgG, mentre le SartoBind Q, che contengono ammonio quaternario come gruppo ionico, possono essere utilizzate in processi di cromatografia a scambio anionico per rimuovere le impurezze dalla miscela complessa contenente le IgG, quali tracce di DNA e virus.

Per rendere il processo con membrane competitivo su scala industriale, sono necessari ancora studi e modifiche, affinché si possano superare alcuni dei problemi riscontrati, quali la non

uniforme distribuzione del flusso in ingresso al modulo e la non uniforme distribuzione dei pori nel supporto. Inoltre è necessario eseguire molte prove sperimentali prima di determinare le condizioni operative opportune che permettano al supporto di adsorbire in modo ottimale le molecole o di rilasciarle durante la fase di eluizione.

## 2.2.5 La cromatografia di affinità

### 2.2.5.1 Introduzione

La cromatografia di affinità rappresenta uno dei metodi più utilizzati per la purificazione di biomolecole (quali enzimi, ormoni, vaccini, frammenti di DNA, di RNA ed anticorpi monoclonali) contenute in fluidi complessi di provenienza biologica [51].

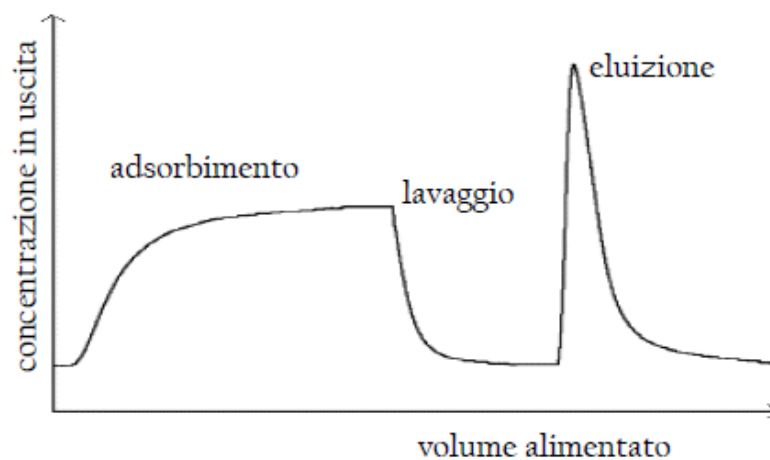
L'obiettivo è separare le molecole sfruttando le interazioni specifiche fra un ligando immobilizzato sulla fase stazionaria e le sostanze stesse; il ligando è una molecola che si lega con alta specificità alla proteina di interesse: questa interazione fa sì che solo la biomolecola sia trattenuta, mentre le impurità fluiscono attraverso la colonna. La biomolecola dovrà essere poi eluita e recuperata: è quindi necessario che il legame ligando-proteina sia reversibile. La fase di eluizione, che consente il recupero della proteina, favorendo il suo distacco dal ligando, può essere effettuata seguendo diverse procedure, per esempio mediante l'utilizzo di soluzioni ad alta concentrazione di ligando libero, oppure modificando il pH o la forza ionica, facendo però attenzione a non innescare processi di denaturazione della molecola da recuperare. A causa dell'alta specificità delle interazioni, la selettività della cromatografia per affinità è potenzialmente la più alta tra i tipi di cromatografia, offrendo la possibilità di purificazione in un singolo stadio di una molecola specifica da una miscela anche complessa. Solitamente il ligando è legato alla fase stazionaria tramite un braccio spaziatore, per rendere più agevole l'interazione con la proteina.

La matrice ideale da utilizzare deve possedere determinate caratteristiche: deve contenere gruppi reattivi numerosi e adatti a legare covalentemente il ligando e deve essere stabile nelle condizioni in cui viene fatta avvenire la reazione di immobilizzazione del ligando; deve inoltre essere stabile nelle condizioni in cui si verifica l'interazione con la biomolecola, in quelle in cui avviene l'eluizione (pH acidi) ed in quelle in cui avviene la rigenerazione; infine, non deve

interagire con molecole diverse dalla proteina da purificare, ovvero non deve causare il fenomeno dell'adsorbimento non specifico.

### 2.2.5.2 Stadi di un processo cromatografico di affinità

Le separazioni di affinità avvengono attraverso tre stadi successivi, preceduti da una fase di equilibratura. Nella seguente figura viene illustrato il profilo qualitativo di un ciclo completo di affinità:



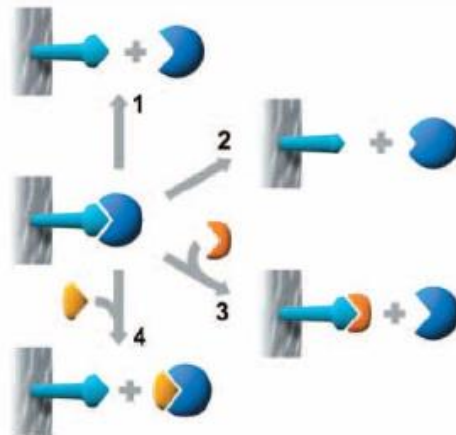
*Figura 2.9: Profilo qualitativo di un ciclo cromatografico di affinità.*

Si procede quindi attraverso un susseguirsi delle seguenti fasi:

1. Equilibratura: fase in cui la colonna cromatografica viene alimentata con una soluzione tampone caratterizzata da pH e forza ionica simili a quelle della biomolecola da analizzare e/o purificare.
2. Adsorbimento: la soluzione da purificare viene messa a contatto con il supporto solido sul quale viene adsorbita la proteina di interesse.
3. Lavaggio: fase in cui vengono eliminate tutte le molecole rimaste nel sistema ed eventualmente anche le molecole adsorbite in modo non specifico; solitamente si utilizza una soluzione tampone identica a quella usata per l'equilibratura.
4. Eluizione: viene scisso il legame proteina-ligando in modo da recuperare la biomolecola di interesse; questo scopo può essere raggiunto seguendo diverse strade [52]:
  - Metodo 1, eluizione non specifica: si modifica la composizione del tampone così da recuperare la biomolecola senza danneggiarla;

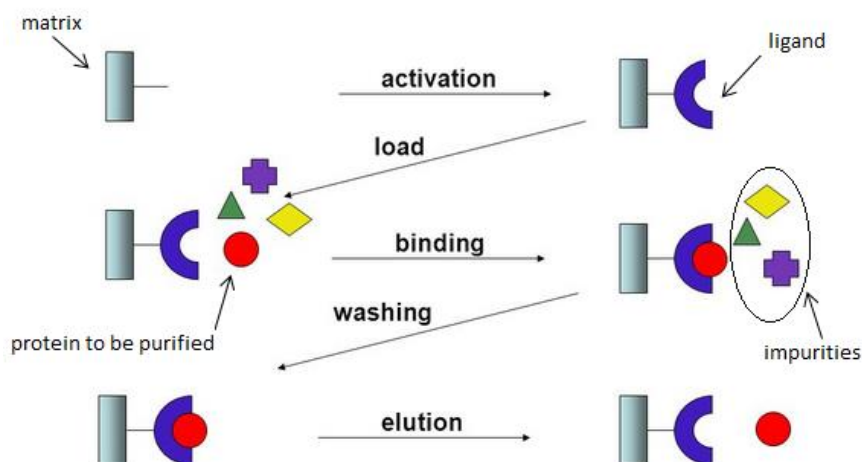
- Metodo 2, eluizione non specifica: si gioca sul pH o si utilizzano agenti denaturanti, rischiando di danneggiare la proteina;
- Metodi 3 e 4, eluizione specifica: si basa sull'introduzione nel sistema di un competitore per il sito di legame.

I metodi di eluizione appena descritti sono mostrati nella seguente immagine:



**Figura 2.10:** Metodi di eluizione [52].

Uno schema complessivo delle fasi che caratterizzano un ciclo cromatografico di affinità è rappresentato schematicamente nella seguente figura:

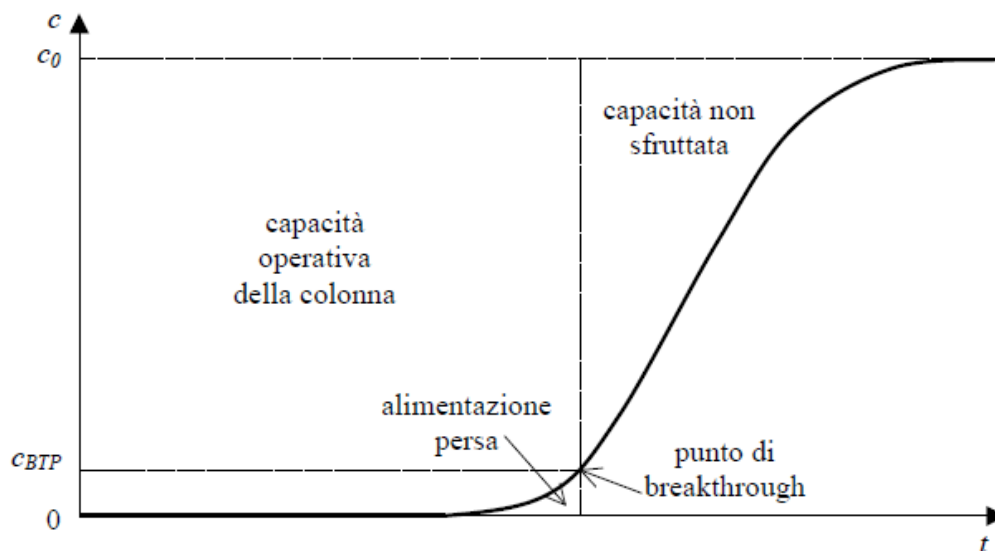


**Figura 2.11:** Schema delle fasi che caratterizzano la cromatografia di affinità: dopo aver immobilizzato il ligando sul supporto cromatografico (attivazione), si procede con l'equilibratura della colonna ed il successivo caricamento del campione (load); la biomolecola di interesse si legherà in modo specifico al ligando (binding), mentre le altre biomolecole verranno trascinate al di fuori della colonna durante la fase di lavaggio (washing). Infine, la proteina viene recuperata (elution) [53].

Alla fine di un ciclo cromatografico, è importante procedere con uno stadio di rigenerazione del supporto, in modo da riportare la colonna ed il sistema in condizioni da poter eseguire un nuovo ciclo.

Nelle applicazioni cromatografiche, si definisce curva di breakthrough (BTC) la curva che descrive l'andamento della concentrazione di proteina nella soluzione in uscita dalla colonna in funzione del tempo. Idealmente si dovrebbe avere un gradino in corrispondenza della saturazione delle membrane, che coincide con il passaggio da una concentrazione in uscita nulla ad una concentrazione pari a quella dell'alimentazione, ma nella realtà si assiste ad una crescita graduale della curva, in quanto la concentrazione aumenta da zero al valore di saturazione all'interno di un certo intervallo di tempo, a causa di cinetiche di adsorbimento lente e fenomeni di miscelamento [7].

Nella seguente figura viene illustrato il profilo qualitativo di una BTC:



**Figura 2.12:** Profilo qualitativo di una BTC.  $c_0$ : concentrazione dell'alimentazione;  $c_{BTP}$ : concentrazione in corrispondenza del punto di breakthrough [7].

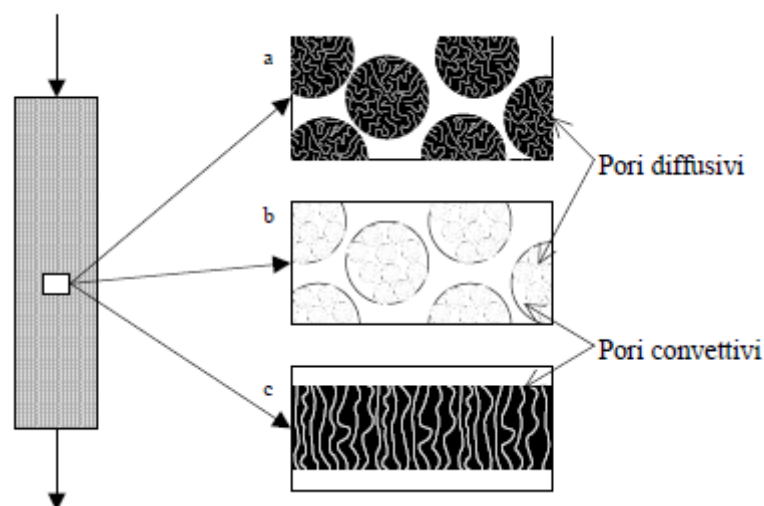
Dopo aver iniettato il campione, la proteina viene inizialmente trattenuta dal supporto cromatografico e la sua concentrazione in uscita sarà nulla, per iniziare ad aumentare quando la colonna inizia a saturarsi, fino a raggiungere un valore pari a quello di alimentazione. A livello industriale, la fase di adsorbimento si considera conclusa quando la concentrazione in uscita dalla colonna raggiunge un valore pari ad una determinata frazione della concentrazione che si ha in alimentazione, ovvero in un punto definito punto di breakthrough (BTP). In questo modo la colonna non è completamente sfruttata, ma si evita la perdita di una grande quantità di

biomolecola. L'area sottesa alla curva rappresenta infatti la quantità di proteina in uscita dalla colonna, quindi persa, mentre l'area compresa tra la curva e la retta parallela all'asse delle ascisse e passante per  $c_0$  rappresenta la quantità di proteina adsorbita. Sarà quindi opportuno cercare di ottimizzare il sistema in modo da ottenere un'alta capacità della colonna ed una BTC abbastanza ripida.

La posizione della curva lungo l'asse dei tempi dipende dalla concentrazione che si ha in alimentazione e dalla capacità di adsorbimento: maggiore è la capacità della colonna, più la BTC sarà spostata verso destra [7].

### 2.2.5.3 Tipi di trasporto nei processi cromatografici di affinità

In base al meccanismo di trasporto dominante grazie al quale la biomolecola entra in contatto con il ligando, si distinguono diversi metodi per effettuare le separazioni di affinità. Il tipo di trasporto può essere diffusivo, perfusivo o convettivo [54]; a tal proposito si consideri la seguente figura:



**Figura 2.13:** Schema relativo ai diversi tipi di trasporto nella cromatografia di affinità: con particella diffusiva (a), con particelle perfusive (b), con membrane microporose (c) [52].

Uno dei metodi più diffusi consiste nell'utilizzare una colonna impaccata la cui fase adsorbente è composta da particelle porose, con diametro compreso fra 50 e 100  $\mu\text{m}$ , sulle quali viene immobilizzato il ligando. Tale metodo è caratterizzato da distanze molto grandi che la molecola deve percorrere nei pori per diffusione affinché possa interagire con il ligando e questo

comporta prestazioni limitate del sistema. Si può pensare di utilizzare particelle più piccole, per diminuire la distanza diffusiva ed aumentare l'area superficiale, ma ciò determina un incremento delle perdite di carico e, quindi, dei costi.

L'utilizzo di particelle perfusive implica l'uso di supporti cromatografici caratterizzati da una struttura biodispersa, costituita da una rete di pori larghi, i pori diretti, e da una rete di pori più piccoli che rende intercomunicanti i pori diretti. In questo caso la velocità convettiva non è nulla, per cui il processo sarà caratterizzato da prestazioni migliori rispetto a quelle che si ottengono in caso di particelle puramente diffusive.

Infine, il processo con membrane microporose di affinità prevede l'utilizzo di una colonna cromatografica in cui il supporto cromatografico sia costituito da un pacchetto di membrane sovrapposte. Il ligando è immobilizzato sulla superficie interna dei pori, i quali possiedono un diametro solitamente compreso fra 0,4 e 3  $\mu\text{m}$ , mentre la porosità del mezzo varia fra il 60% e l'80%. Le limitazioni causate da un trasporto di tipo diffusivo vengono eliminate dal flusso convettivo che si instaura attraverso i pori, rendendo questo metodo di separazione più efficiente rispetto al metodo convenzionale con particelle porose [55].

#### 2.2.5.4 Processi cromatografici di affinità con resine e membrane

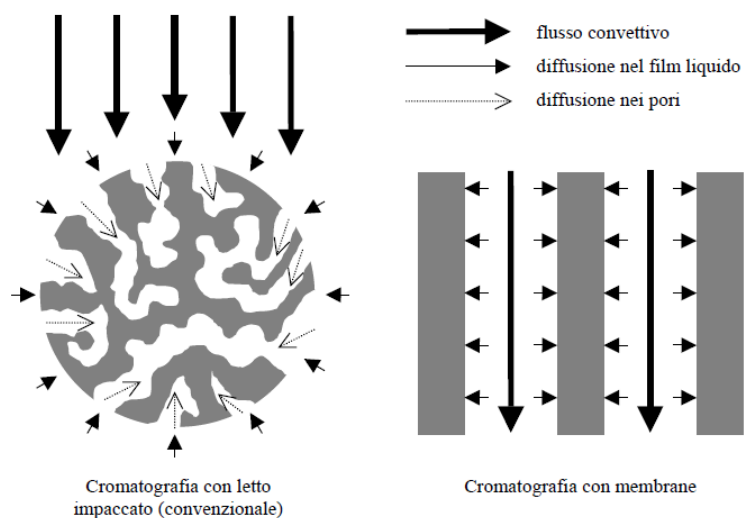
Dopo aver descritto i principali tipi di trasporto che si possono verificare in un processo cromatografico di affinità, si considerano di seguito i vantaggi e gli svantaggi legati all'utilizzo di membrane rispetto ad un letto impaccato, ovvero ad un processo di bioseparazione cromatografica convenzionale.

Come evidenziato nel paragrafo precedente, uno dei principali problemi che caratterizza un letto impaccato è la dipendenza dalla diffusione del trasporto delle biomolecole verso i siti di legame posti all'interno dei pori; come conseguenza, il tempo necessario per la separazione aumenta rispetto al tempo richiesto in un processo cromatografico con membrane ed il volume dei tamponi utilizzati risulterà maggiore. Questo significa che le biomolecole potranno essere esposte per tempi lunghi a condizioni sfavorevoli che potrebbero favorirne la denaturazione durante la fase di eluizione. Un'altra limitazione che caratterizza i processi di bioseparazione convenzionali, è data dalle alte perdite di carico, il cui valore tende inoltre ad aumentare nel tempo a causa dell'accumulo di materiale colloidale, che si traduce in un intasamento della colonna. Inoltre, nella cromatografia con letto impaccato, è frequente la formazione di passaggi



preferenziali per il flusso della soluzione, che porta ad una scarsa utilizzazione del letto: si parla del fenomeno del “channelling” [56].

Nella seguente figura vengono posti a confronto il processo cromatografico convenzionale ed il processo cromatografico con membrane:



**Figura 2.14:** Confronto fra le tipologie di trasporto in cromatografia convenzionale (a sinistra) e in cromatografia con membrane (a destra) [52].

Quindi, in un processo cromatografico con membrane, poiché il principale fenomeno di trasporto è rappresentato dalla convezione piuttosto che dalla diffusione, i tempi necessari per la separazione ed il volume dei tamponi utilizzati sono minori [57]. Inoltre, le perdite di carico risultano molto basse se confrontate con quelle che caratterizzano un processo cromatografico convenzionale con letto impaccato e l'efficienza nella separazione solitamente non dipende dalla portata di alimentazione, per cui si potranno utilizzare anche portate relativamente alte.

Le biomolecole con peso molecolare superiore a 150 kDa, come virus e frammenti di DNA, hanno difficoltà a diffondere all'interno dei pori delle particelle di un letto impaccato, adsorbendosi principalmente sulla superficie esterna disponibile senza sfruttare completamente la capacità del letto: è soprattutto per queste grandi biomolecole che la cromatografia con membrane è particolarmente utile, in quanto la superficie disponibile a legarsi con le proteine risulta maggiore [58, 59].

Sebbene i vantaggi legati all'utilizzo di membrane microporose siano molti, il processo di cromatografia di affinità con questo tipo di supporto presenta ancora alcuni problemi che devono essere risolti prima di poterne considerare un possibile impiego a livello industriale. In

particolare, a causa della grande sezione frontale rispetto allo spessore delle membrane, si verificano problemi legati alla distribuzione del flusso; per evitare un calo delle prestazioni del sistema, bisogna trovare il modo di distribuire uniformemente il flusso all'ingresso, ma anche all'uscita della colonna. La soluzione da applicare consiste nell'utilizzo di distributori radiali, che possono essere ricavati mediante scanalature nel materiale che costituisce la cella o possono essere distributori di flusso in materiale inerte posti all'interno della colonna sia all'ingresso che all'uscita del modulo [60]. In questo modo si dovrebbe evitare il fenomeno della distorsione del fronte dei soluti, i quali dovrebbero arrivare contemporaneamente alla prima membrana, ma questa situazione è comunque difficile da realizzare.

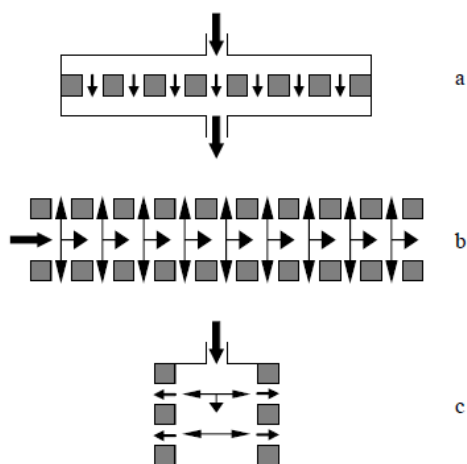
Un altro importante problema da risolvere riguarda la distribuzione delle dimensioni dei pori, i quali non sono solitamente caratterizzati da un diametro uniforme, ma si osserva una distribuzione della dimensione dei pori all'interno della membrana. Questo ovviamente comporta il passaggio preferenziale del flusso attraverso i pori più larghi, mentre solo una piccola parte di alimentazione fluisce nei pori di dimensioni minori. Le potenzialità del supporto non saranno quindi sfruttate a pieno, con conseguente calo delle prestazioni del modulo [61, 62]. Il problema può essere risolto sovrapponendo un certo numero di membrane in modo da limitare al minimo la possibilità di formazione di flussi preferenziali; comunque, è bene che i pori abbiano un diametro che differisca meno dell'1% dal diametro medio.

Si considerano inoltre i problemi legati ad un'eventuale non uniformità dello spessore delle membrane, le cui conseguenze sono del tutto simili a quelle che si verificano nel caso in cui si abbia una distribuzione dei pori non uniforme: il flusso attraverserà la membrana preferenzialmente laddove lo spessore è minore, mentre solo una minima parte lambirà la membrana nelle zone di maggiore spessore, a causa della maggiore resistenza al passaggio incontrata in questo caso. Suen, S. Y. et al. [61] suggeriscono che, per non avere cali significativi in termini di prestazione del processo, la variazione dello spessore in una membrana debba essere mantenuta al di sotto del 3%. Si nota tuttavia che le membrane attualmente disponibili in commercio sono caratterizzate da uno spessore sufficientemente uniforme.

In conclusione, la cromatografia con membrane rappresenta un'ottima alternativa ai processi cromatografici convenzionali, offrendo un gran numero di vantaggi, che si traducono in risparmio in termini tempo e costi; tuttavia tale tecnica è ancora poco sfruttata a causa di limitazioni da risolvere cosicché si possa considerare l'utilizzo di membrane su scala industriale.

### 2.2.5.5 Moduli cromatografici con membrane

Quando si progetta un modulo a membrane, è possibile scegliere fra tre configurazioni [63], illustrate nella seguente figura:



**Figura 2.15:** Configurazioni e regimi di flusso nel caso di membrane piane (a), fibre cave (b) e modulo con flusso radiale (c) [52].

Il modulo a fibre cave è costituito da membrane a geometria cilindrica, le fibre, con diametro compreso fra 0,25 e 2,5 mm; il flusso di alimentazione è parallelo alla superficie della membrana e gradualmente inizia a passare attraverso i pori. Il modulo a flusso radiale si ottiene avvolgendo una membrana piana su un'anima porosa, mentre il modulo a membrane piane è ottenuto per sovrapposizione di membrane piane e l'alimentazione viene introdotta in direzione normale alla loro superficie: il flusso convettivo trasporta i soluti attraverso i pori ed il regime, nelle condizioni operative normalmente adoperate, è di tipo laminare. Questa configurazione è quella maggiormente utilizzata nel caso di membrane di affinità ed è stata scelta per questo lavoro di tesi.

### 2.2.5.6 Preparazione del supporto cromatografico di affinità

Il supporto cromatografico di affinità deve presentare determinate caratteristiche: deve essere stabile fisicamente e chimicamente, deve essere in grado di legare in modo specifico e reversibile la biomolecola di interesse e non deve dare luogo al fenomeno dell'adsorbimento non specifico; inoltre, il costo deve essere contenuto. A livello commerciale sono disponibili membrane polimeriche sulle quali viene immobilizzato un ligando specifico per la biomolecola

da purificare ed eventualmente uno spaziatore che faciliti l'interazione ligando-proteina. In base allo scopo del processo, si dovranno scegliere in modo opportuno il supporto, il ligando e lo spaziatore, ed identificare i protocolli migliori per l'immobilizzazione del ligando e la reticolazione di eventuali gruppi che potrebbero essere responsabili di adsorbimento di molecole diverse dalla biomolecola di interesse.

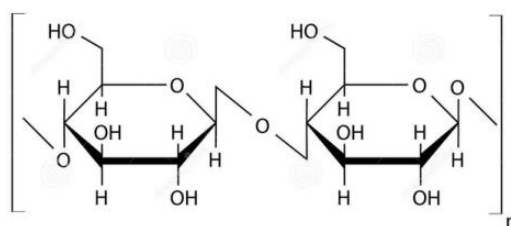
### 2.2.5.6.1 Il supporto

Il supporto deve presentare le seguenti caratteristiche:

- Buona resistenza meccanica;
- Distribuzione uniforme dei pori;
- Spessore uniforme;
- Porosità elevata, in modo che l'area disponibile per il legame con il ligando, e successivamente con la biomolecola, sia massimizzata;
- Superficie idrofila, che non dia luogo ad interazioni di tipo ionico;
- Stabilità chimica nei confronti dei tamponi utilizzati nelle varie fasi del ciclo cromatografico e nei confronti del tampone utilizzato per la rigenerazione del supporto;
- Stabilità nei solventi utilizzati per effettuare i protocolli di attivazione;
- Basso costo e facile reperibilità.

Di seguito si elencano alcuni dei materiali utilizzati come supporto nei processi cromatografici di affinità:

1. Cellulosa: è un polisaccaride lineare contenuto principalmente nei vegetali, formato da monomeri di glucosio uniti da legame  $\beta$  1-4 glicosidici (figura 2.16); la presenza di tre gruppi idrossilici per monomero rende la matrice molto idrofila. Il polimero non è tossico e risulta abbastanza stabile agli agenti chimico-fisici impiegati nella cromatografia di affinità, sebbene si degradi in alcuni acidi forti [64].

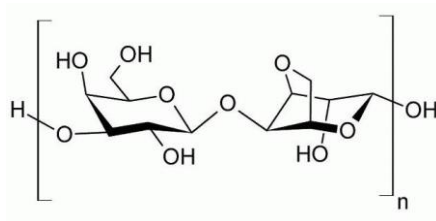


*Figura 2.16: Struttura della cellulosa.*

2. Agarosio: è un supporto di affinità ampiamente utilizzato nell'ambito delle separazioni biochimiche [65]; si tratta di un polisaccaride purificato dall'agar-agar, una sostanza gelatinosa isolata dalle alghe. E' un polimero lineare formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici ed è caratterizzato da catene lineari unite da legami idrogeno a formare una matrice tridimensionale.

L'agarosio presenta dei problemi di stabilità termica, chimica e meccanica.

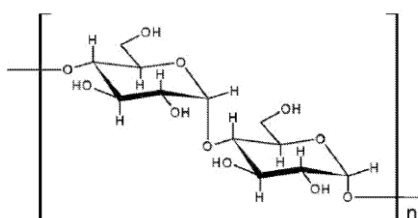
La sua struttura è illustrata nella seguente immagine:



**Figura 2.17:** Struttura dell'agarosio.

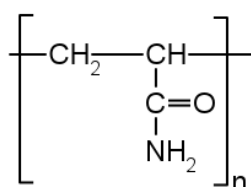
3. Destrano: è un polisaccaride extracellulare prodotto dal batterio *Leuconostoc Mesenteroides* ed è formato da catene di glucosio unite tramite legami  $\alpha$  1-6 glicosidici (Figura 2.18).

E' abbastanza stabile in soluzioni sia acide che alcaline. La porosità dei supporti a base di destrano è controllata dalla massa molecolare del destrano usato e dall'introduzione di legami crociati ottenuti con epicloridrina.



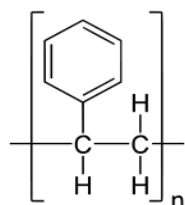
**Figura 2.18:** Struttura del destrano.

4. Poliacrilammide: si ottiene per polimerizzazione dell'acrilammide; l'agente che permette il cross-linking è la N, N' metilen-bisacrilammide. La matrice che si ottiene possiede una buona stabilità chimica, ma il monomero dell'acrilammide, tossico, può essere lentamente rilasciato. La sua struttura è mostrata nella seguente immagine:



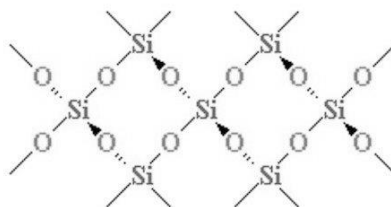
**Figura 2.19:** Struttura della poliacrilammide.

5. Polistirene e divinilbenzene: questo supporto si ottiene per polimerizzazione dello stirene legato con divinilbenzene; a causa del carattere idrofobico, è necessario apportare opportune modifiche per rendere la superficie del supporto idrofilica; si utilizza in applicazioni simili a quelle per le quali vengono utilizzate cellulosa e agarosio [66]. La struttura è la seguente:



*Figura 2.20: Struttura del polistirene.*

6. Supporti inorganici: fra questi, i più utilizzati sono i vetri porosi, caratterizzati dalla possibilità di ottenere una dimensione uniforme dei pori e da una struttura abbastanza rigida. In particolare, è molto utilizzata la silice porosa attivata con gruppi epossidici. Tuttavia tale supporto presenta lo svantaggio di essere poco stabile in condizioni alcaline e, di conseguenza, vengono spesso usati ossidi porosi più stabili, ma anche più costosi [66]. Nella figura seguente si illustra la struttura della silice:



*Figura 2.21: Struttura della silice in forma cristallina.*

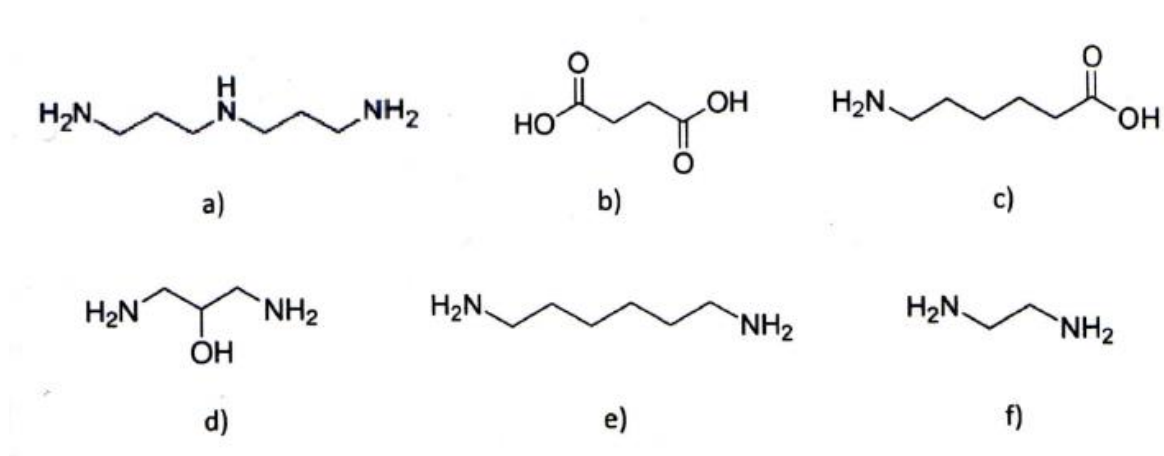
### 2.2.5.6.2 Lo spaziatore

Lo spaziatore è una molecola di basso peso molecolare che viene posta fra il supporto cromatografico ed il ligando di affinità; è solitamente composto da catene idrocarburiche con gruppi funzionali ad entrambe le estremità, in modo da poter reagire e legare sia la membrana che il ligando. Si procede quindi immobilizzando un'estremità dello spaziatore al supporto, per poi unire il secondo estremo al ligando, che si troverà ad una distanza dal supporto cromatografico pari alla lunghezza dello spaziatore. In questo modo è possibile risolvere eventuali problemi di ingombro sterico legati alla scarsa accessibilità dei siti di legame sul ligando da parte delle biomolecole da purificare. Tuttavia lo spaziatore non dovrà essere

eccessivamente lungo, in modo da limitare possibili interazioni non specifiche ed evitare che si ripieghi su se stesso.

L'introduzione di questa molecola può modificare il carattere idrofilico della matrice e favorire il fenomeno dell'adsorbimento non specifico a causa di interazioni idrofobiche; inoltre, potrebbe essere responsabile in parte di interazioni di tipo ionico.

Lo spaziatore da utilizzare deve essere scelto in modo opportuno in base al processo specifico in cui deve intervenire; nella seguente figura vengono illustrati alcuni fra gli spaziatori maggiormente utilizzati per immobilizzare ligandi di affinità:



**Figura 2.22:** Struttura chimica degli spaziatori più comunemente utilizzati: 3,3-diaminodipropilammina (a), acido succinico (b), acido 6-aminocaproico (c), 1,3-diamino 2-propanolo (d), 1,6-diamminoesano (e), 1,2-diamminoetano (f).

### 2.2.5.6.3 Il ligando

La selezione del ligando dipende strettamente dalla natura della biomolecola da purificare e dalle interazioni che permettono tale legame. La scelta può essere basata sui ligandi disponibili in commercio o è possibile sviluppare nuove molecole per ottenere determinate caratteristiche che possano migliorare la selettività nei confronti della proteina di interesse e la resa in fase di eluizione.

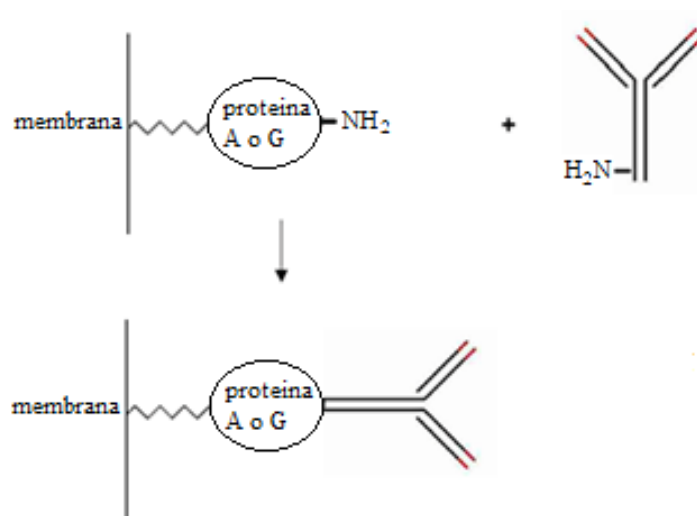
Il ligando deve essere immobilizzato sul supporto cromatografico ed il legame deve essere tale da prevenirne eventuali perdite durante il processo di purificazione, per questo motivo vengono generalmente preferiti legami covalenti. Inoltre, è importante che la densità di ligando immobilizzato al supporto ricada all'interno di un certo intervallo: una densità troppo bassa non

sarebbe sufficiente a garantire capacità di adsorbimento soddisfacenti, ma anche un valore di densità troppo elevato provocherebbe un effetto negativo sulla capacità di adsorbimento, a causa della scarsa accessibilità dei siti di legame da parte della biomolecola.

Per la purificazione di anticorpi vengono utilizzati i seguenti ligandi:

1. Ligando proteina A: è una proteina della membrana cellulare comune nei ceppi di *Staphylococcus Aureus*, che presenta una grande affinità per molte immunoglobuline, in particolare per il frammento Fc delle IgG, con particolare affinità per le sottoclassi IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>. Viene ampiamente utilizzata nei processi di purificazione di anticorpi monoclonali da miscele complesse: si lega agli anticorpi a pH 8,2, ma anche a pH neutro, e li rilascia in condizioni acide, per valori di pH prossimi a 3 [64].
2. Ligando proteina G: è una proteina di membrana espressa nei batteri streptococchi e viene utilizzata, come la proteina A, per la purificazione di anticorpi. E' in grado di legarsi alla regione Fc delle IgG, ma interagisce con una quantità di anticorpi maggiore rispetto alla proteina A. Inoltre, è in grado di legare l'albumina, proteina che rappresenta uno degli ostacoli maggiori alla purificazione delle IgG dal siero; per questo motivo si utilizzano forme ricombinanti di proteina G, in modo da ottenere una molecola che non leghi i contaminanti. E' stato osservato che la proteina G presenta capacità di adsorbimento più alte rispetto alla proteina A, ma il recupero della biomolecola in fase di eluizione risulta maggiormente difficoltoso e può essere ottenuto mediante condizioni che potrebbero causare denaturazione delle molecole [64].

Nella seguente figura viene illustrato il meccanismo di reazione della proteina A e della proteina G, che si legano alla regione Fc delle IgG:



**Figura 2.23:** Schema di reazione fra il ligando proteina A, o proteina G, e le IgG.



3. Ligandi biomimetici: le molecole appartenenti a questa classe sono state appositamente sviluppate, grazie a studi di modellazione molecolare, per interagire specificamente con gli anticorpi monoclonali. In particolare, lo scopo è la creazione di molecole che siano in grado di simulare la struttura della proteina A per favorire la formazione del complesso con l'IgG. Allo stesso tempo, è possibile apportare dei miglioramenti per superare alcune limitazioni che caratterizzano l'uso della proteina A, per esempio in termini di stabilità.

Si cita il ligando A2P, sviluppato da Prometic Biosciences e ampiamente studiato dal gruppo di ricerca: si tratta di una tricolorotriazina disostituita con 2 ammino-fenoli, che ha mostrato grande selettività nei confronti delle IgG, con un recupero in eluizione superiore all'85% [67]. Purtroppo, però, questo ligando è molto sensibile all'acido pluronico, sostanza solitamente presente nei terreni di coltura delle cellule utilizzate per la produzione di anticorpi, il quale spezza i legami fra l'A2P e le IgG.

#### 2.2.5.6.4 Attivazione del supporto e protocollo di immobilizzazione del ligando

L'attivazione del supporto cromatografico è quel processo che modifica chimicamente una matrice con lo scopo di renderla adatta alla formazione di legami covalenti con un opportuno ligando, o con un opportuno spaziatore. Esistono molte tecniche di attivazione, che variano in base al supporto cromatografico scelto, ma in commercio sono disponibili un gran numero di supporti pre-attivati. Durante il lavoro di tesi sono state utilizzate membrane commerciali in cellulosa rigenerata pre-attivate con gruppi epossidici.

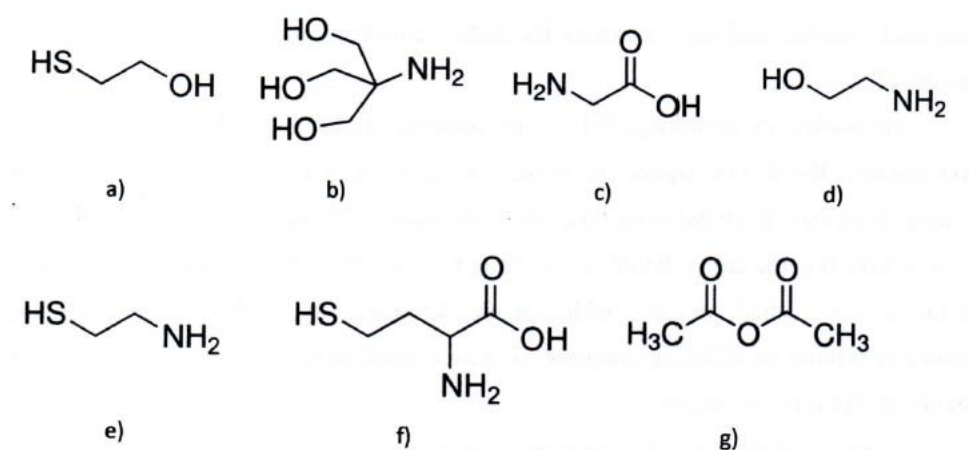
L'immobilizzazione dei ligandi avviene solitamente grazie ad un braccio spaziatore: è quest'ultimo infatti che, legandosi con un'estremità alla fase stazionaria e con l'altra estremità al ligando, assicura il legame con il supporto e rende il ligando disponibile alle interazioni con le immunoglobuline. Durante il lavoro di tesi è stato utilizzato lo spaziatore 2LP (1,2 diamminoetano), la cui formula di struttura è rappresentata in figura 2.22 (f): uno dei gruppi amminici è occupato nel legame con il ligando, mentre l'altro è libero di reagire con i gruppi funzionali esposti sul supporto attivato con i gruppi epossidici, durante quello che viene definito protocollo di immobilizzazione (descritto in dettaglio nel capitolo 4).

### 2.2.5.6.5 Protocollo di endcapping

Una volta che il ligando è stato immobilizzato sul supporto cromatografico, è possibile che alcuni dei siti attivi del supporto non abbiano reagito; questo può portare a problemi nella successiva fase di purificazione: le molecole presenti nella soluzione potrebbero infatti reagire, anche irreversibilmente, con questi gruppi e dar luogo al fenomeno indesiderato dell'adsorbimento non specifico; ciò andrebbe ad ostacolare l'adsorbimento della proteina di interesse, compromettendo l'efficienza dell'intero processo.

Per questo motivo, vengono eseguiti i protocolli di endcapping (o reticolazione), ovvero di "copertura" di quei gruppi reattivi che potrebbero legarsi alle molecole presenti nella soluzione da purificare.

Alcune delle sostanze comunemente utilizzate per effettuare il protocollo di endcapping sono mostrate nella seguente immagine:



**Figura 2.24:** Struttura chimica delle molecole più comunemente utilizzate per effettuare il protocollo di endcapping: mercaptoetanolo (a), tris amminometano (b), glicina (c), etanolamina (d), mercaptoetilamina (e), cisteina (f), anidride acetica (g).

Durante il lavoro di tesi è stato utilizzato il  $\beta$ -mercaptoetanolo per la "copertura" dei gruppi epossidici del supporto che non hanno reagito con il ligando (o con lo spaziatore) durante il protocollo di immobilizzazione, e sono inoltre state sperimentate alcune strategie per la "copertura" dei gruppi amminici dello spaziatore. Per una descrizione dettagliata di questi protocolli, si rimanda ai capitoli 4 e 5.

## CAPITOLO 3

# IMMUNOGLOBULINE

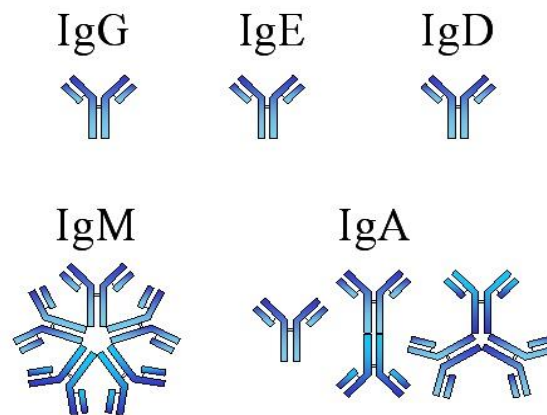
### 3.1 STRUTTURA E FUNZIONE

Le immunoglobuline, o anticorpi, sono glicoproteine di difesa circolanti nel sangue che vengono sintetizzate dai linfociti B; sono coinvolte nel riconoscimento di sostanze esogene, come virus e batteri [68]. La sostanza che viene riconosciuta e legata dall'anticorpo è l'antigene: il riconoscimento tra un anticorpo e un antigene avviene secondo un principio di complementarità dei rispettivi siti di legame [69].

Si distinguono cinque classi di immunoglobuline [70, 71]:

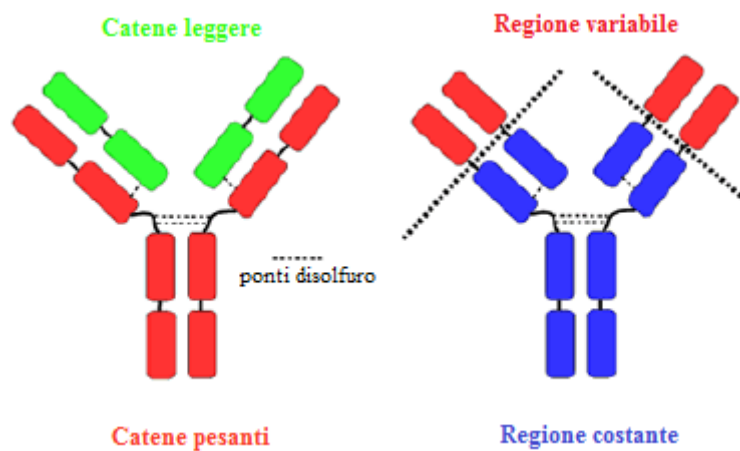
1. IgG (150 kDa): sono composte da due catene pesanti (50 kDa) e da due catene leggere (25 kDa) e contengono il 2-3% di carboidrati; nell'uomo rappresentano circa il 75% delle immunoglobuline plasmatiche e costituiscono il fulcro delle risposte immunitarie secondarie. Possono neutralizzare diverse tossine, impediscono ai virus di colonizzare le cellule e facilitano la fagocitosi batterica.
2. IgA (170 kDa): sono un gruppo di anticorpi presente soprattutto nelle secrezioni esterne, come saliva e lacrime, e rappresentano un importante mezzo di difesa contro le infezioni locali, impedendo la colonizzazione da parte di batteri patogeni.
3. IgM (900 kDa): rappresentano circa il 10% delle immunoglobuline presenti nel circolo sanguigno; sono le prime ad intervenire nel caso di contatto con un microrganismo estraneo, si tratta infatti di anticorpi associati alla risposta immunitaria primaria, ovvero quella che si verifica quando l'organismo entra in contatto con un certo antigene per la prima volta.
4. IgD (160 kDa): sono presenti nel plasma ad una concentrazione molto bassa, meno dell'1%, ma sono abbondantemente presenti sulla membrana di molti linfociti B circolanti; sono i recettori per l'antigene espressi dai linfociti B immaturi: stimolano la risposta anticorpale ed attivano la maturazione delle cellule B.
5. IgE (190 kDa): sono presenti nel plasma in basse concentrazioni; sono associate alle reazioni allergiche, aumentano infatti di numero durante i processi allergici e si trovano nelle secrezioni dell'apparato respiratorio e digerente.

La struttura delle cinque classi di immunoglobuline descritte è illustrata nella seguente immagine:



**Figura 3.1:** Struttura relativa alle 5 classi di immunoglobuline: IgG, IgE, IgD, IgM, IgA.

Tutte le immunoglobuline possiedono la stessa struttura monomerica, formata da coppie simmetriche di catene polipeptidiche, che vengono definite pesanti o leggere in base al peso molecolare. Nella figura seguente è illustrata la struttura base di un anticorpo:



**Figura 3.2:** Struttura base di un anticorpo, con indicazione delle catene leggere (verde) e pesanti (rosso) e della regione costante (blu) e variabile (rosso).

Si distinguono le catene leggere (L, “light chain”) e le catene pesanti (H, “heavy chain”); le catene H sono caratterizzate dalla presenza di quattro domini: un dominio amino-terminale, che presenta una notevole variabilità della sequenza amminoacidica, e tre domini carbossi-terminali, uguali in tutte le classi di immunoglobuline, che rappresentano le regioni costanti. Le catene leggere sono a loro volta caratterizzate dalla presenza di due domini: il dominio carbossi-terminale è identico in tutte le molecole appartenenti allo stesso isotipo ed è detto dominio

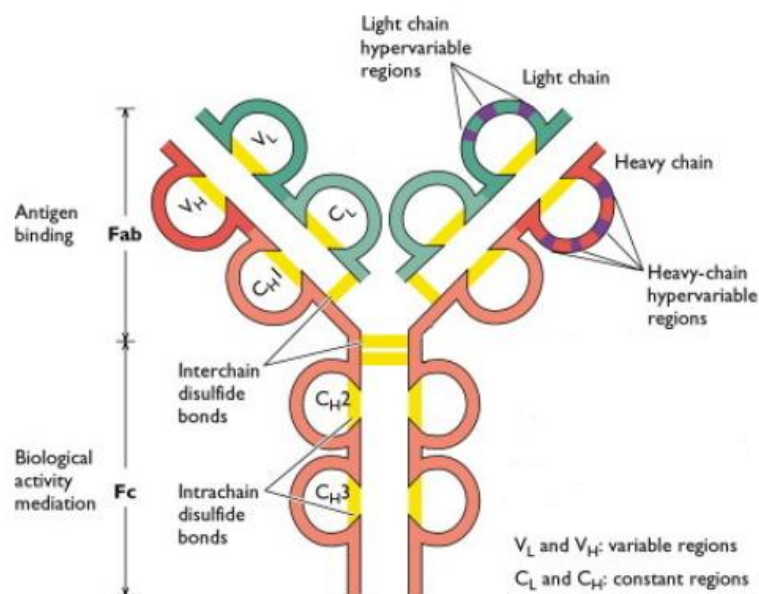
costante, mentre il dominio ammino-terminale varia da anticorpo ad anticorpo ed è detto regione variabile. Una catena anticorpale assume una forma ad Y, ed è composta da due catene H identiche, che ne definiscono la classe di appartenenza, e da due catene L; ogni catena leggera è legata ad una catena pesante tramite ponti disolfuro, e a loro volta le due catene pesanti sono legate fra loro in una regione specifica detta cerniera [72]. Quindi, la formula di struttura generale di una immunoglobulina è  $H_2L_2$ .

La regione variabile è l'unica responsabile della specificità per l'antigene, mentre tutte le altre funzioni biologiche sono espletate dalle strutture presenti nella regione costante.

### 3.2 LE IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE G

Fra tutte le immunoglobuline, le immunoglobuline di classe G, o gammaglobuline, sono le più studiate in campo medico; rappresentano la classe di anticorpi presente nell'organismo umano in maggior quantità (circa il 75% delle immunoglobuline totali) e la loro concentrazione nel siero umano varia fra 8 e 16 mg/mL. Sono prodotte in elevata quantità solo dopo la seconda esposizione all'antigene, ovvero sono implicate nella risposta immunitaria secondaria.

Lo schema della struttura di una IgG è illustrato nella seguente figura:



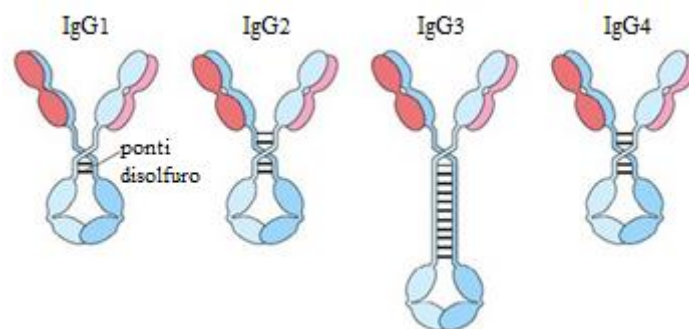
**Figura 3.3:** Struttura di un'immunoglobulina di classe G [73].

$V_L$  e  $V_H$  rappresentano le regioni variabili rispettivamente delle catene leggere e delle catene pesanti (corrispondono alle porzioni N-terminali delle quattro catene);  $C_L$  e  $C_H$  rappresentano le regioni costanti rispettivamente delle catene leggere e delle catene pesanti. Ciascuna catena pesante è costituita da 440 amminoacidi ed ha un peso molecolare pari a circa 50 kDa, mentre ogni catena leggera è costituita da 220 amminoacidi ed ha un peso molecolare pari a circa 25 kDa. Come si può osservare dalla figura, nella struttura delle immunoglobuline si identificano tre regioni: una porzione Fc (Fragment crystallizable) e due porzioni Fab (Fragment antigen binding). La prima regione è quella responsabile dell'attivazione della risposta immunitaria, ma non partecipa direttamente al legame con l'antigene; le regioni Fab sono invece responsabili del legame con l'antigene [69].

Alcune sequenze delle regioni variabili  $V_L$  e  $V_H$ , presentano un elevato grado di variabilità: il cambiamento anche di un solo amminoacido in una sola delle catene va a modificare profondamente le proprietà dell'immunoglobulina ed è grazie a questo che il sistema immunitario è in grado di riconoscere un grande numero di antigeni in modo altamente specifico.

Le regioni  $C_L$  e  $C_H$  sono costanti all'interno di una singola classe di immunoglobuline: è proprio la differenza nella sequenza di queste catene che permette di distinguere le immunoglobuline nelle 5 classi descritte nel paragrafo 3.1.

La classe delle IgG può a sua volta essere suddivisa in quattro sottoclassi, che differiscono fra loro per il numero di ponti di solfuro che legano le due catene pesanti nella zona della cerniera e per la posizione dei legami fra le catene leggere e le catene pesanti. Le quattro sottoclassi, la cui struttura è mostrata in figura 3.4, sono identificate tramite le seguenti sigle: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>.



**Figura 3.4:** Struttura delle quattro sottoclassi di IgG: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>.

Ogni sottoclasse deve rappresentare un determinata percentuale del totale delle IgG presenti nel siero umano: le IgG<sub>1</sub> devono essere comprese fra il 60 ed il 66%, le IgG<sub>2</sub> fra il 20 e il 30%, le IgG<sub>3</sub> fra il 4 e l'8%, mentre le IgG<sub>4</sub> sono le meno abbondanti (percentuali intorno al 3%) [74].

I deficit e gli aumenti delle singole sottoclassi di IgG possono essere indice di un'alterazione della risposta immunitaria e causare problemi di salute, quali infezioni delle vie aeree superiori, polmoniti, gastroenteriti, sinusiti ed otiti [74].

### 3.3 I METODI DI PRODUZIONE

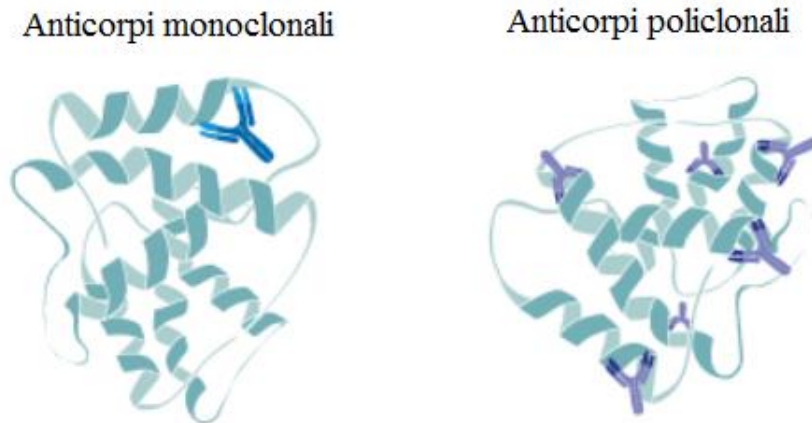
Nell'ambito dei processi produttivi, è necessario distinguere gli anticorpi in policlonali e monoclonali.

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono molecole prodotte da un solo tipo di cellule B e sono specifiche per un certo determinante antigenico; derivando da un unico clone plasmacellulare, sono identiche sia nella regione costante che nella regione variabile.

La scoperta degli anticorpi monoclonali risale al 1975, quando due ricercatori, Cesar Milstein e Georges Köhler, misero a punto la tecnica per sintetizzarli, vincendo nel 1984 il premio Nobel per la medicina [75].

Gli anticorpi policlonali (pAb) sono miscele di anticorpi che derivano da cloni plasmacellulari diversi e che presentano differenze nelle regioni costanti e nelle regioni variabili. L'eterogeneità strutturale può essere ridotta mediante un processo di cromatografia di affinità utilizzando un antigene immobilizzato su un supporto, in modo da ottenere anticorpi ad elevata specificità, ma che saranno comunque ancora eterogenei nelle loro regioni costanti.

La differenza fra anticorpi monoclonali e anticorpi policlonali è illustrata schematicamente nella seguente immagine:



**Figura 3.5:** Differenza fra anticorpi monoclonali (sinistra) e anticorpi policlonali (destra): i primi si legano ad un solo epitopo dell'antigene, i secondi si legano a più epitopi dello stesso antigene (ognuno riconosce un epitopo diverso).

### 3.3.1 Produzione di anticorpi policlonali

Il modo più semplice ed economico per ottenere anticorpi in grado di riconoscere una certa sostanza (antigene) consiste nel mettere quest'ultima a contatto con il sistema immunitario di un animale, sul quale sia stato preventivamente eseguito un prelievo di siero. Dopo aver iniettato l'antigene (attraverso iniezione sottocutanea, intramuscolare o endovenosa), si verifica la reazione immunitaria, ovvero i linfociti B iniziano a produrre le immunoglobuline specifiche per quella sostanza.

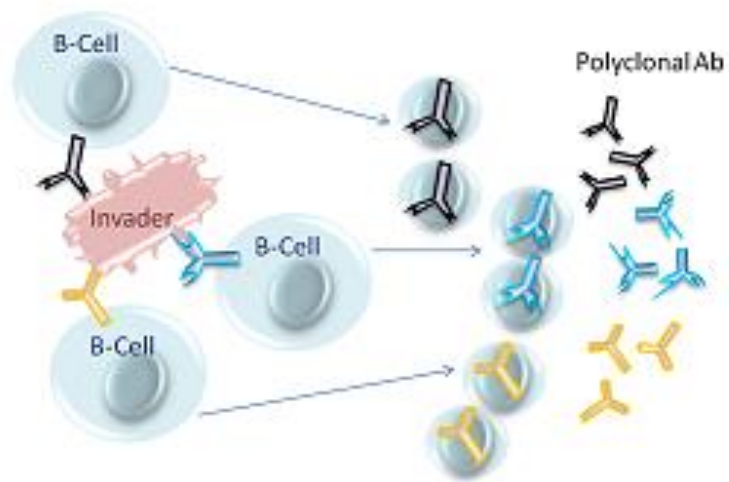
Vengono eseguiti prelievi di siero ad intervalli regolari per controllare la quantità di anticorpi nel sangue; questi campioni vengono sottoposti al test ELISA, saggio mirato ad accertare la presenza delle immunoglobuline, utilizzando come controllo negativo i prelievi di siero precedenti l'inizio della produzione di anticorpi.

La regione di antigene che si trova a contatto diretto con l'anticorpo è detta epitopo o determinante antigenico e, poiché su un antigene sono presenti numerosi epitopi, una sola molecola esogena può dare origine alla produzione di una miscela di anticorpi, ognuno dei quali viene prodotto da un certo clone di linfociti B: si parla di risposta immunitaria policlonale. Quindi, mediante l'immunizzazione di un animale da laboratorio, si ottiene un antisiero contenente anticorpi "eterogenei", detti policlonali.

Una volta raggiunta la quantità appropriata di immunoglobuline, si estrae il siero.



La seguente immagine offre un'illustrazione schematica del processo di produzione degli anticorpi policlonali:



*Figura 3.6: Produzione di anticorpi policlonali [76].*

L'antigene ("invader") è in grado di attivare i linfociti B ("B-Cell"), i quali iniziano a produrre gli anticorpi policlonali ("Polyclonal Ab"), che in figura sono rappresentati in giallo, nero e azzurro.

Molti animali possono essere usati per generare anticorpi, fra questi le pecore, le capre e i cavalli, ma nei lavori sperimentali di laboratorio viene spesso usato il coniglio, in quanto è un animale relativamente grande e facile da allevare. Talvolta è possibile usare animali più piccoli, come i topi, ma la quantità di anticorpi che è si riesce a produrre è esigua. Per generare pAb a scopi medici in grandi quantità devono essere scelti animali di grandi dimensioni [77]. La selezione dell'animale dovrebbe prendere in considerazione, oltre alla quantità di immunoglobuline richiesta, anche altri fattori, quali la facilità di ottenimento dei campioni di sangue e la relazione filogenetica fra l'animale dal quale deriva l'antigene e l'animale sottoposto ad immunizzazione [77].

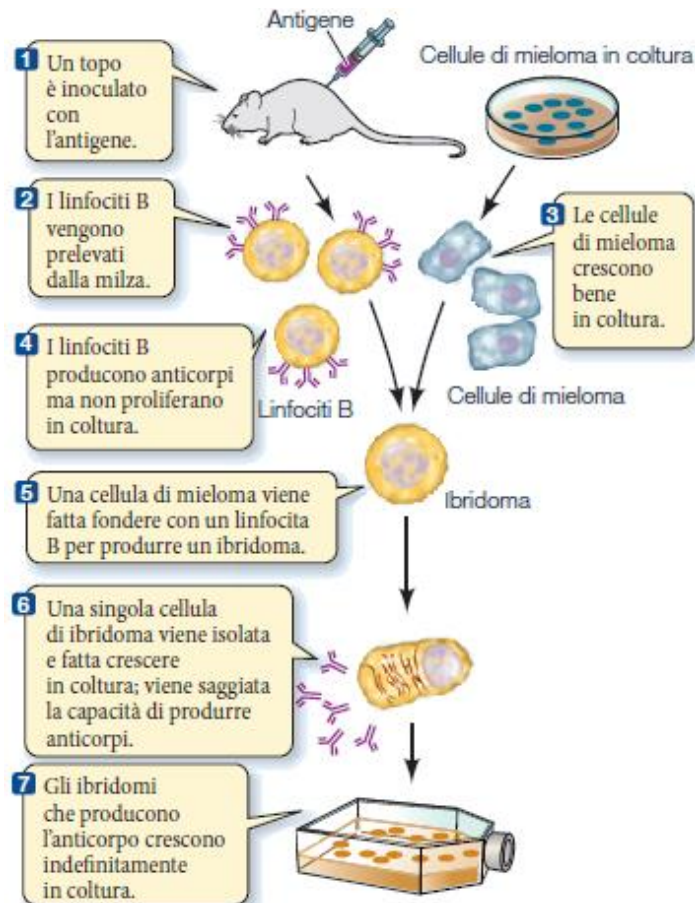
Uno degli svantaggi principali degli anticorpi policlonali è che, una volta iniettati nel paziente, possono essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario. Per evitare questo problema, si può manipolare il DNA dell'animale produttore di anticorpi, introducendo geni umani che permettano la sintesi di immunoglobuline simili a quelle umane, ma questo significa che il processo di produzione sarà più complesso e costoso.

### 3.3.2 Produzione di anticorpi monoclonali

Da quando gli anticorpi monoclonali sono stati descritti per la prima volta da Köhler e Milstein nel 1975 [75], il progresso ottenuto in campo medico attraverso il loro impiego è stato molto rapido e ha permesso di ottenere sostanze utili per applicazioni diagnostiche e terapeutiche. In particolare, nell'ambito dell'industria biotecnologica, la ricerca è indirizzata allo studio degli anticorpi monoclonali in campo oncologico.

La produzione di mAb avviene attraverso una serie di tappe sequenziali che portano alla generazione di cellule secernenti anticorpi con specificità predeterminata (cellule immortali o ibridomi). Il clone di cellule che produce un solo anticorpo può essere generato artificialmente mediante la fusione di un linfocita B con una cellula tumorale. I linfociti B in una coltura in vitro muoiono rapidamente e non possono essere utilizzati per la produzione di anticorpi, si ricorre quindi alla tecnica dell'ibridoma: le cellule B vengono fuse con le cellule di mieloma (tumore del midollo osseo) in modo da ottenere cellule ibride dotate della capacità di riprodursi indefinitamente, tipica delle cellule tumorali, e della capacità di produrre anticorpi, tipica dei linfociti B. Questa cellula ibrida produce uno specifico anticorpo monoclonale e cresce in coltura [78].

L'ibridoma è quindi ottenuto iniettando l'antigene di interesse in un organismo, solitamente il topo, dal quale verranno prelevati i linfociti da fondere con le cellule tumorali, secondo lo schema illustrato nella seguente immagine:



**Figura 3.7:** La generazione di ibridomi per produrre anticorpi monoclonali [78].

Rispetto alla produzione di anticorpi policlonali, la produzione di anticorpi monoclonali richiede più tempo e la tecnologia di produzione è più costosa; tuttavia, una volta ottenuto, l'ibridoma può essere usato come sorgente di anticorpi monoclonali identici per lungo tempo.

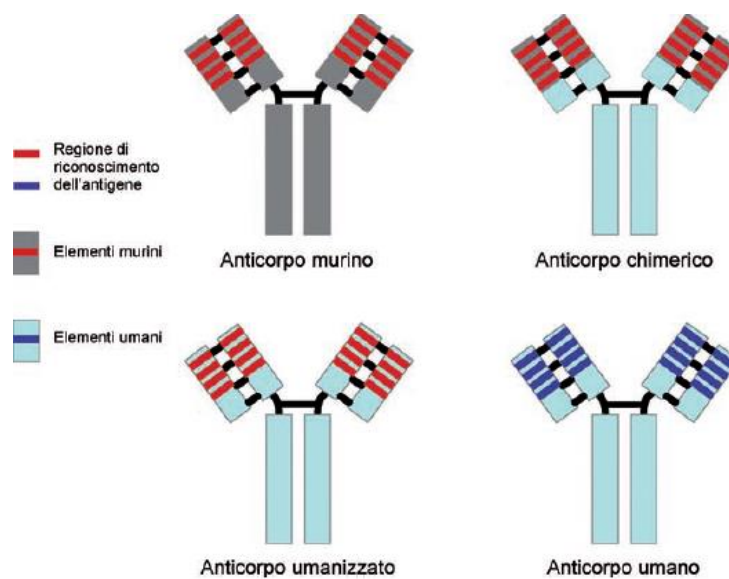
L'impiego clinico dei monoclonali murini presenta delle limitazioni, in quanto il sistema immunitario umano riconosce gli anticorpi prodotti come estranei e scatena una risposta immune specifica che limita somministrazioni ripetute dell'anticorpo [79].

Per questo motivo, sono state sviluppate tecniche di ingegneria genetica e le fonti dei linfociti B possono essere diverse. E' possibile utilizzare il metodo del DNA ricombinante per generare molecole costituite dalla regione variabile degli anticorpi murini (quella che riconosce l'antigene) e dalla regione costante di un anticorpo umano, ottenendo gli anticorpi monoclonali chimerici. La tecnologia si è ulteriormente evoluta fino ad ottenere mAb in cui la proteina murina è rappresentata solo in quelle parti dell'anticorpo che interagiscono con l'antigene, ovvero nella regione ipervariabile, mentre il resto dell'immunoglobulina è umano: le regioni di legame con l'antigene sono impiantate su una struttura interamente umana attraverso

l'ingegnerizzazione dei geni codificanti per le catene leggere e per le catene pesanti delle IgG: si ottengono gli anticorpi monoclonali umanizzati [79].

Infine, è possibile produrre anticorpi monoclonali umani che siano specifici per un certo antigene utilizzando topi transgenici: l'informazione genetica per la sintesi delle immunoglobuline umane viene trasferita in un topo, creando un animale che produce anticorpi identici a quelli umani, dopo esposizione all'antigene. Questi anticorpi umani possono essere prodotti anche mediante la tecnica del "phage display". Si tratta di un metodo alternativo per la produzione di immunoglobuline: una tecnologia in vitro che utilizza i fagi, cioè i virus che infettano i batteri; mediante tecniche di biologia molecolare, nel genoma viene inserita la sequenza di un anticorpo fondendola al gene che codifica per la proteina di rivestimento del virus. Di conseguenza, il virus produrrà una proteina "ibrida" che verrà indirizzata sulla superficie: lì sarà esposta alla molecola di interesse, l'antigene, e selezionata per la sua capacità di riconoscerla [80]. La produzione di anticorpi monoclonali utilizzati nell'industria biotecnologica prevede l'utilizzo di fagi o di cellule fungine come vettori: la sequenza del DNA che codifica per le IgG viene isolata dal genoma di questi vettori ed inserita all'interno di cellule mammifere; si utilizzano principalmente colture cellulari di CHO, cellule ovariche di criceto cinese, ma possono essere utilizzate anche altre cellule mammifere.

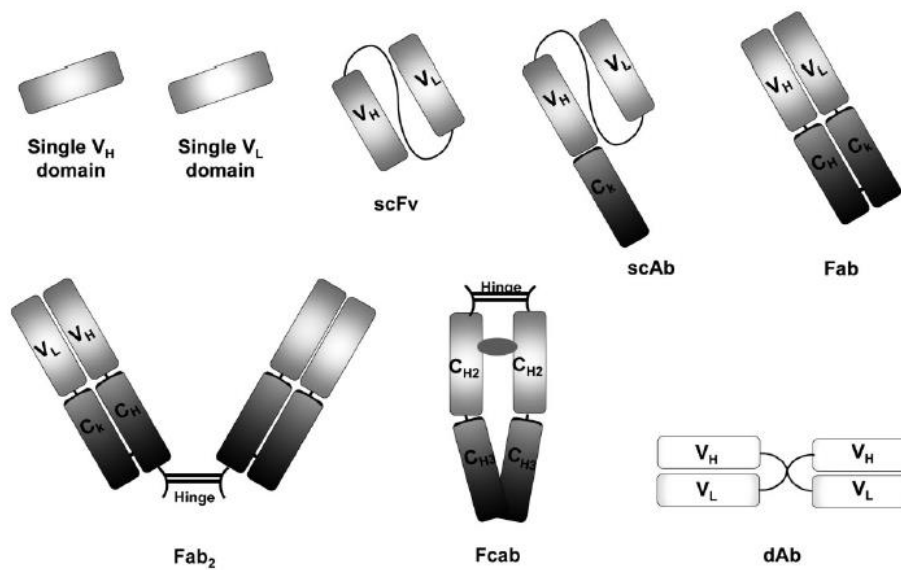
Le strutture degli anticorpi monoclonali che si possono ottenere mediante le tecniche di produzione descritte sono illustrate nella seguente figura:



**Figura 3.8:** La struttura degli anticorpi monoclonali: anticorpi murini, chimerici, umanizzati e umani [68].

### 3.3.3 Produzione di frammenti di anticorpi

Oltre alla produzione di immunoglobuline, è possibile produrre anche solo frammenti di anticorpi, i quali possono essere combinati per creare nuove molecole con determinate proprietà. Questa strategia è alla base degli attuali metodi utilizzati nell' "ingegneria degli anticorpi". Ad oggi, diversi approcci ingegneristici sono stati sviluppati per produrre numerosi frammenti di immunoglobuline, come i frammenti Fc, i frammenti che legano l'antigene (Fab e Fab<sub>2</sub>), i domini variabili delle catene pesanti e delle catene leggere (V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>), gli anticorpi a catena singola (scAb) e numerosi altri frammenti (riportati in figura 3.9).



**Figura 3.9:** Alcuni esempi dei frammenti di anticorpi che è possibile ottenere tramite l' "ingegneria degli anticorpi" [81].

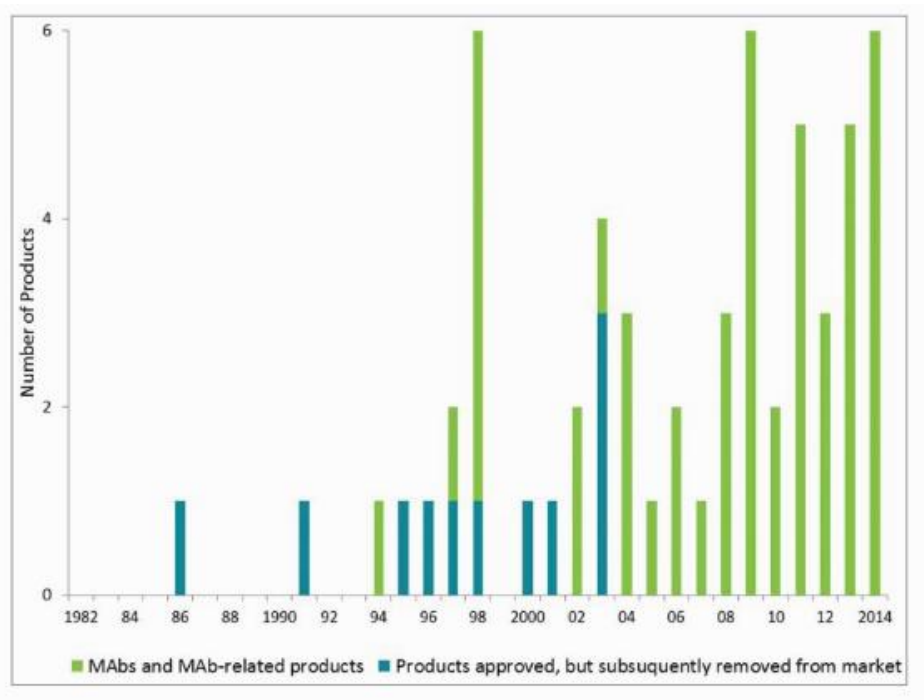
Un vantaggio di questa strategia consiste nel fatto che semplici organismi, come batteri o lieviti, sono siti ideali per la produzione di frammenti di anticorpi. Attualmente la ricerca è focalizzata sullo studio di possibili alternative alla sintesi di immunoglobuline con cellule mammifere, le quali sono fragili e sensibili alle condizioni operative, mentre le cellule dei batteri sono maggiormente resistenti e potrebbero essere impiegate in processi produttivi più vantaggiosi dal punto di vista economico [24].

### 3.4 IL MERCATO DEGLI ANTICORPI

Il mercato dei farmaci a base di anticorpi monoclonali è nato nei primi anni '80 e, nel 1986, è stato approvato il primo prodotto: si tratta dell'Orthoclone (OKT3), utilizzato per la prevenzione del rigetto nei trapianti [5].

Attualmente, gli anticorpi monoclonali vengono sfruttati per il trattamento di un gran numero di malattie neurologiche, ematologiche, immunologiche, nefrologiche, reumatologiche e dermatologiche. In particolare, le immunoglobuline sono impiegate per il trattamento di disturbi neurologici compresi la dermatomiosite, la sindrome di Guillain-Barre (GBS), la polineuropatia infiammatoria cronica demielinizzante (CIDP), la neuropatia motoria multifocale (MMN) e la sindrome dell'uomo rigido, "stiff man", (SMS). In ematologia sono utilizzate per il trattamento di citopenie autoimmuni, parvovirus B19, aplasia eritroide, ipogammaglobulinemia secondaria, leucemia linfatica cronica e in caso di post-trapianto di midollo osseo. In immunologia le immunoglobuline sono usate nel trattamento del deficit primario di anticorpi (PAD); in nefrologia, reumatologia e oculistica sono state usate per trattare vasculite, lupus eritematoso sistemico (LES), pemfigoide delle mucose e uveite, mentre in dermatologia vengono più comunemente utilizzate per il trattamento della sindrome di Kawasaki, della dermatomiosite, della necrolisi epidermica tossica e per le malattie bollose [82].

Dal 1986 alla fine degli anni '90, la crescita del mercato degli anticorpi monoclonali è stata lenta, fino all'approvazione del primo anticorpo monoclonale chimerico, seguita dall'approvazione di anticorpi monoclonali umanizzati: a partire da questo momento, il mercato relativo alla classe di prodotti basati sulle immunoglobuline a scopo terapeutico ha subito un'incessante crescita, fino a diventare dominante nell'ambito del commercio biofarmaceutico. Infatti, il numero dei prodotti a base di anticorpi monoclonali approvato a livello commerciale negli Stati Uniti ed in Europa è cresciuto costantemente negli ultimi 30 anni, con una media di 4 prodotti approvati all'anno. Nella seguente figura viene mostrato il numero di approvazioni annue di prodotti farmaceutici a base di anticorpi monoclonali, a partire dal 1986:



**Figura 3.10:** Numero di prodotti a base di anticorpi monoclonali approvati annualmente, dal 1986 al 2014. I farmaci approvati ma successivamente rimossi dal mercato sono evidenziati in blu, mentre quelli attualmente in commercio sono evidenziati in verde [5].

Considerando quindi una media di 4 nuovi prodotti approvati all'anno, è stato stimato che per il 2020 saranno presenti sul mercato almeno 70 farmaci a base di anticorpi monoclonali [5].

Di pari passo con l'aumento del mercato di tali prodotti si è assistito ovviamente ad un incremento della loro produzione e ad un'ottimizzazione dei processi produttivi.

# CAPITOLO 4

## MATERIALI E METODI

### 4.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo verranno illustrati tutti i materiali utilizzati durante il lavoro di tesi, gli apparati sperimentali ed i metodi analitici che hanno permesso di eseguire le prove ed analizzarne i risultati; seguirà infine una trattazione inerente l'elaborazione dei dati ottenuti.

### 4.2 MATERIALI

#### 4.2.1 Le membrane di affinità

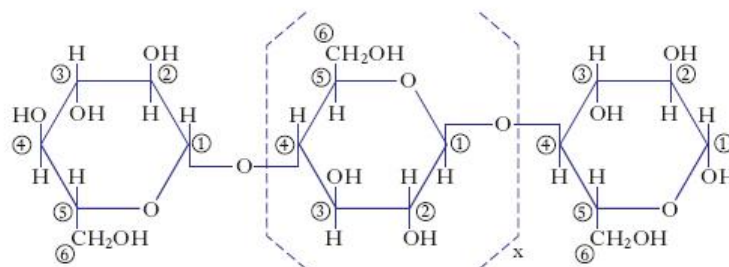
Principale scopo della tesi di laurea è la caratterizzazione di membrane per separazioni cromatografiche, ed in particolare per la purificazione delle immunoglobuline di classe G; tale scopo può essere raggiunto grazie alla formazione di un legame specifico e reversibile tra la proteina di interesse ed il ligando immobilizzato sulla matrice: si parla di membrane di affinità, elementi in grado di separare in modo selettivo una proteina (per esempio le IgG) dalla miscela complessa da cui proviene (per esempio siero umano). Le membrane devono possedere determinate caratteristiche per poter essere considerate idonee al loro scopo: devono essere stabili chimicamente e meccanicamente, presentare limitato adsorbimento non specifico, essere caratterizzate da elevata porosità ed area superficiale, in modo da avere a disposizione molti siti per l'immobilizzazione del ligando; devono infine essere disponibili a basso costo ed essere di facile reperibilità.

##### 4.2.1.1 Le Membrane SartoBind Epoxy

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate membrane in cellulosa rigenerata attivate con gruppi epossidici. La cellulosa (figura 4.1) è un polisaccaride costituito da monomeri di glucosio legati fra loro con legami  $\beta$  1-4 glicosidici; sono possibili inoltre reticolazioni fra le catene adiacenti



tramite la formazione di legami  $\beta$  1-6 glicosidici: il numero di ramificazioni intercatena permette di controllare il grado di vuoto della membrana.



**Figura 4.1:** Struttura della cellulosa.

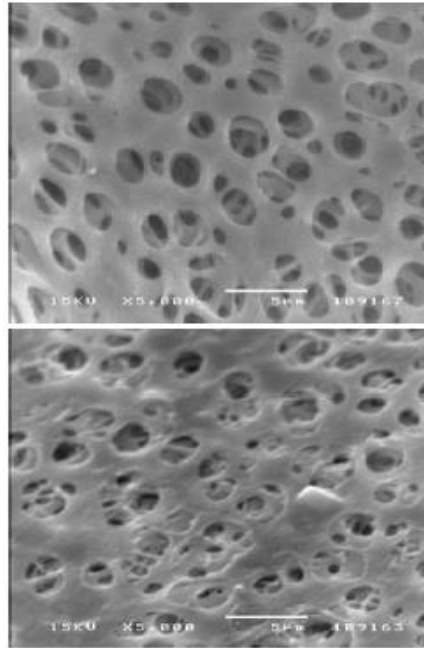
Ai carboni in posizioni 2, 3 e 5 sono legati gruppi ossidrilici che possono essere attivati con gruppi funzionali (per esempio gruppi epossidici o aldeidici) che si andranno ad unire al ligando durante la fase di immobilizzazione. Le membrane studiate sono prodotte e gentilmente fornite da Sartorius Stedim Biotech GmbH, possiedono una matrice in cellulosa rigenerata e sono state preattivate con gruppi epossidici: si tratta delle membrane commerciali SartoBind Epoxy. Di seguito si riporta una tabella in cui vengono riassunte le caratteristiche principali di questi supporti e un'immagine che mostra le scansioni eseguite al microscopio elettronico:

**Tabella 4.1:** Principali caratteristiche delle membrane SartoBind Epoxy.

Diametro dei pori $d_p$ ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	0,45
Spessore unitario $L_m$ ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	275
Grado di vuoto $\varepsilon$ (%) <sup>b</sup>	72,7
Area superficiale ( $\text{m}^2/\text{mL}$ ) <sup>b</sup>	0,93
Densità gruppi epossidici $P_{\text{epoxy}}$ ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) <sup>a</sup>	2,0-2,2

<sup>a</sup> Dati forniti dal produttore, Sartorius Stedim Biotech GmbH [83]

<sup>b</sup> Dati ottenuti dal Membrane Technology Group dell'Università di Twente

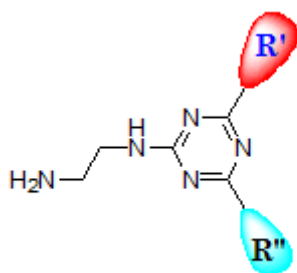


**Figura 4.2:** Scansioni al microscopio elettronico eseguite dal Membrane Technology Group dell'Università di Twente delle membrane SartoBind Epoxy, lato superiore (in alto) e lato inferiore (in basso) [7].

#### 4.2.1.2 Il complesso ligando-spaziatore

Una volta scelto il supporto cromatografico di affinità, è fondamentale la scelta del ligando, il quale deve essere immobilizzato sulla membrana e deve essere chimicamente affine alla biomolecola che si vuole purificare. Il legame fra il ligando e la proteina di interesse deve essere estremamente selettivo e reversibile, in modo da garantire il recupero della molecola durante la fase di eluizione; solitamente questa interazione, proprio per la sua natura reversibile, è un legame di tipo debole. La scelta del ligando dipende fortemente dalla biomolecola che si vuole purificare: la proteina A e la proteina G rappresentano i ligandi naturali biospecifici per le IgG, vanno a legarsi alla parte costante degli anticorpi e sono ottenuti da microrganismi o batteri geneticamente modificati mediante procedure complesse e costose, per cui negli ultimi anni sono stati molti gli studi volti alla ricerca di ligandi sintetici alternativi alla proteina A, che siano caratterizzati da una buona affinità nei confronti delle immunoglobuline G, che diano buone rese in fase di eluizione e che non siano molto costosi. Nel lavoro di tesi è stato utilizzato il ligando HPTA, fornito come complesso ligando-spaziatore; lo spaziatore in esame è l'1,2-diamminoetano, comunemente indicato come 2LP. Poiché negli studi precedenti condotti dal gruppo di ricerca è emerso che lo spaziatore potrebbe essere responsabile, almeno in parte, del fenomeno indesiderato dell'adsorbimento non specifico che si verifica durante le fasi di

purificazione delle IgG [24], le prime prove svolte durante il lavoro di tesi sono state eseguite utilizzando unicamente il braccio spaziatore e non l'intero complesso ligando-spaziatore. Il ligando HPTA è stato sviluppato da una collaborazione tra il nostro gruppo di ricerca e quelli del Prof. Cavallotti, Politecnico di Milano, e dal Prof. Giovenzana, UPO, con lo scopo di ottenere prestazioni superiori rispetto alla molecola A2P. Nella immagine seguente viene mostrata la configurazione del complesso ligando-spaziatore:



**Figura 4.3:** Configurazione del complesso HPTA-2LP [84].

#### 4.2.1.3 Protocolli di modifica delle membrane

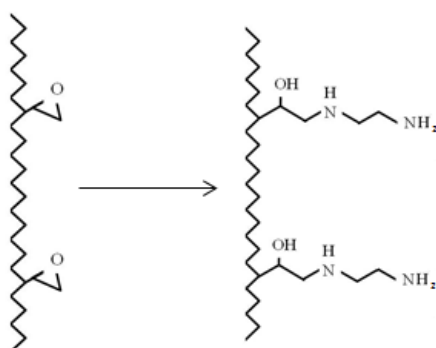
Per determinare le cause dell'adsorbimento non specifico riscontrato nelle prove con le membrane Sartobind Epoxy modificate con HPTA [24], ed in particolare volendo indagare il ruolo dello spaziatore, le prime prove sono state eseguite legando alle membrane solo lo spaziatore (2LP) e valutando varie strategie di endcapping dei gruppi epossidici ed amminici. L'endcapping dei gruppi  $-NH_2$  ha lo scopo di evitare che i contaminanti possano formare legami idrogeno stabili con tali gruppi ed ostacolare l'adsorbimento di IgG.

##### 4.2.1.3.1 Protocollo di immobilizzazione dello spaziatore 2LP

Le membrane Sartobind Epoxy descritte in precedenza, vengono inizialmente sospese in etanolo, per poi essere lasciate, per un tempo pari a 15 ore e 40 minuti, in una soluzione così composta: ogni due membrane sono necessari 2 mL di etanolo ed un numero di moli di spaziatore  $n_{2LP} = 10 n_{epoxy}$ ; durante questo intervallo di tempo in cui avviene la reazione di immobilizzazione dello spaziatore al supporto, le membrane sono poste in piccoli becher collocati all'interno di un bagno termostatico alla temperatura di  $50^{\circ}C$  e sottoposti a leggera agitazione. Al termine della reazione di immobilizzazione, le membrane vengono lavate per

rimuovere l'eccesso di spaziatore non legato: si alternano lavaggi di trenta minuti ciascuno in etanolo e in acqua demineralizzata, per un totale di due ore (4 fasi di lavaggio), con l'ausilio di un agitatore basculante. Le modalità da seguire per svolgere questa parte della procedura relativa alla modifica delle membrane sono state definite attraverso una ricerca precedente a questo lavoro di tesi: sono state studiate diverse strategie di lavaggio ed è stato identificato il protocollo migliore in termini di capacità di adsorbimento delle proteine di interesse da parte del supporto cromatografico [24].

Mediante la reazione di immobilizzazione dello spaziatore, il supporto in cellulosa rigenerata, attivato con gruppi epossidici, viene modificato secondo lo schema illustrato di seguito:



**Figura 4.4:** Rappresentazione schematica del protocollo di immobilizzazione dello spaziatore al supporto.

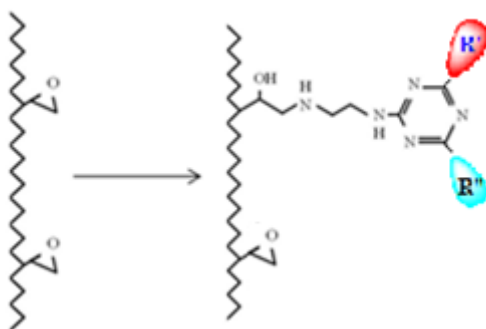
#### 4.2.1.3.2 Protocollo di immobilizzazione del complesso ligando-spaziatore

Il protocollo appena esposto, è stato applicato per lo studio del fenomeno dell'adsorbimento non specifico legato allo spaziatore, ma i cicli cromatografici di affinità prevedono l'utilizzo di membrane attivate con l'intero complesso ligando-spaziatore (e successivo endcapping). Lo scopo è la caratterizzazione del supporto in termini di capacità di adsorbimento della proteina di interesse e di efficienza nella fase di eluizione.

Il protocollo di immobilizzazione del complesso HPTA-2LP prevede il calcolo della quantità di complesso da sciogliere in 4 mL di etanolo per ogni membrana in modo che il numero di moli di ligando-spaziatore  $n_{\text{HPTA-2LP}}$  risulti pari a  $10 n_{\text{epoxy}}$ , ma, a causa della limitata disponibilità in termini di quantità di ligando, il rapporto  $n_{\text{HPTA-2LP}}/n_{\text{epoxy}}$  è risultato pari a 9. La reazione viene fatta avvenire a 50 °C per 16 ore e 50 minuti.

Terminata la fase di immobilizzazione del complesso alle membrane, si effettuano i lavaggi, come descritto nel paragrafo precedente per il caso di immobilizzazione del solo spaziatore, e si procede con il protocollo di endcapping.

Tramite la reazione di immobilizzazione del complesso HPTA-2LP, il supporto viene modificato secondo lo schema illustrato di seguito:

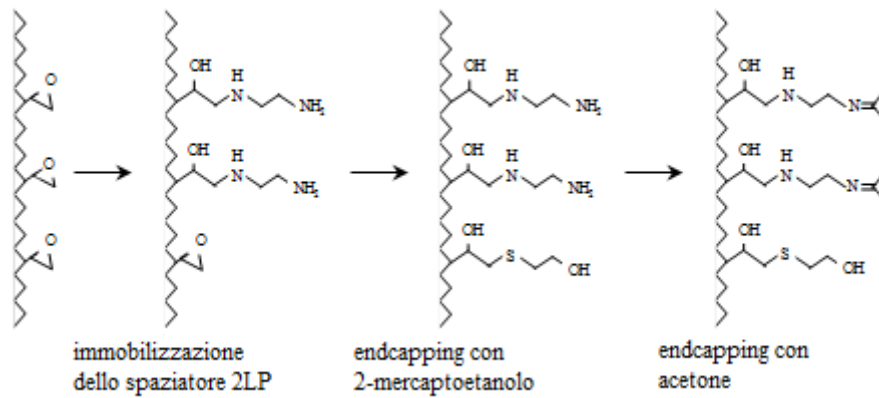


**Figura 4.5:** Rappresentazione schematica del protocollo di immobilizzazione del complesso HPTA-2LP al supporto.

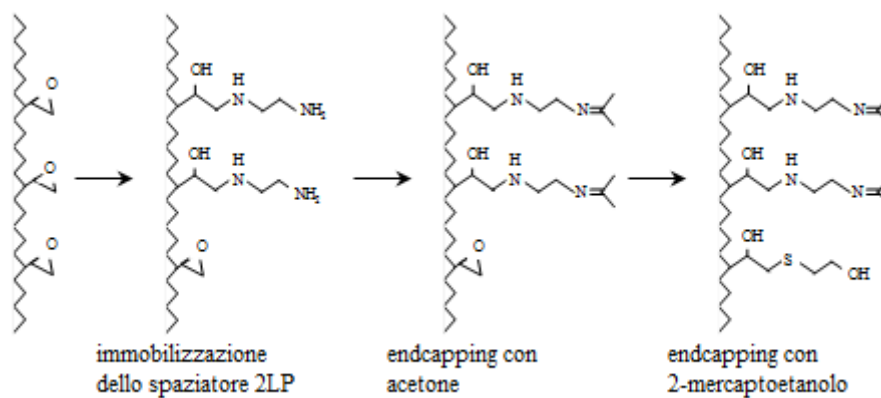
#### 4.2.1.3.3 Protocollo di reticolazione dei gruppi epossidici e dei gruppi amminici

Al termine dei lavaggi eseguiti alla fine del protocollo di immobilizzazione dello spaziatore o del complesso ligando-spaziatore alle membrane, è possibile proseguire con la fase di reticolazione. Nelle prove con il ligando, è stato effettuato solo l'endcapping dei gruppi epossidici, eseguito con  $\beta$ -mercaptoetanolo, la cui quantità è stata calcolata in modo che  $n_{\beta\text{-ME}} = 5 n_{\text{epoxy}}$ , facendo avvenire la reazione a 50°C per 15 ore. Nelle prove con il solo spaziatore sono state valutate diverse strategie di endcapping: è possibile effettuare prima l'endcapping dei gruppi amminici e poi quello dei gruppi epossidici o viceversa; in alcuni casi gli endcapping dei due gruppi sono stati eseguiti contemporaneamente. Poiché sono stati valutati vari metodi per l'esecuzione di questo protocollo, per una descrizione più dettagliata si rimanda al capitolo 5.

In linea generale, è stato sempre utilizzato  $\beta$ -mercaptoetanolo per la copertura dei gruppi epossidici, mentre per i gruppi amminici sono state utilizzate sia acetaldeide che acetone; nelle seguenti figure vengono illustrati gli schemi delle reazioni di reticolazione in due dei casi studiati, scegliendo acetone come agente di endcapping per i gruppi amminici:



**Figura 4.6:** Rappresentazione schematica del protocollo di reticolazione: endcapping dei gruppi epossidici e successivo endcapping dei gruppi amminici.



**Figura 4.7:** Rappresentazione schematica del protocollo di reticolazione: endcapping dei gruppi amminici e successivo endcapping dei gruppi epossidici.

Alla fine di entrambi i protocolli di endcapping sono stati effettuati i lavaggi, alternando lavaggi in etanolo e lavaggi in acqua demineralizzata della durata di mezz'ora l'uno, questa volta utilizzando un sonicatore; nelle precedenti ricerche sono emersi i vantaggi che si ottengono eseguendo un ultimo lavaggio finale in glicina: in questo modo, le molecole utilizzate per effettuare l'endcapping, che non hanno reagito, vengono rimosse più facilmente dal supporto [24].

A questo punto le membrane sono pronte per essere utilizzate.

## 4.2.2 Le membrane a scambio ionico

Oltre alla caratterizzazione di membrane di affinità, un'ultima parte del lavoro di tesi è stata dedicata alle membrane a scambio ionico; in particolare, sono state eseguite prove dinamiche di adsorbimento utilizzando membrane a scambio cationico, tecnica comunemente utilizzata per i processi di purificazione degli anticorpi monoclonali [3, 27, 29].

### 4.2.2.1 Le membrane a scambio cationico PTA-OH

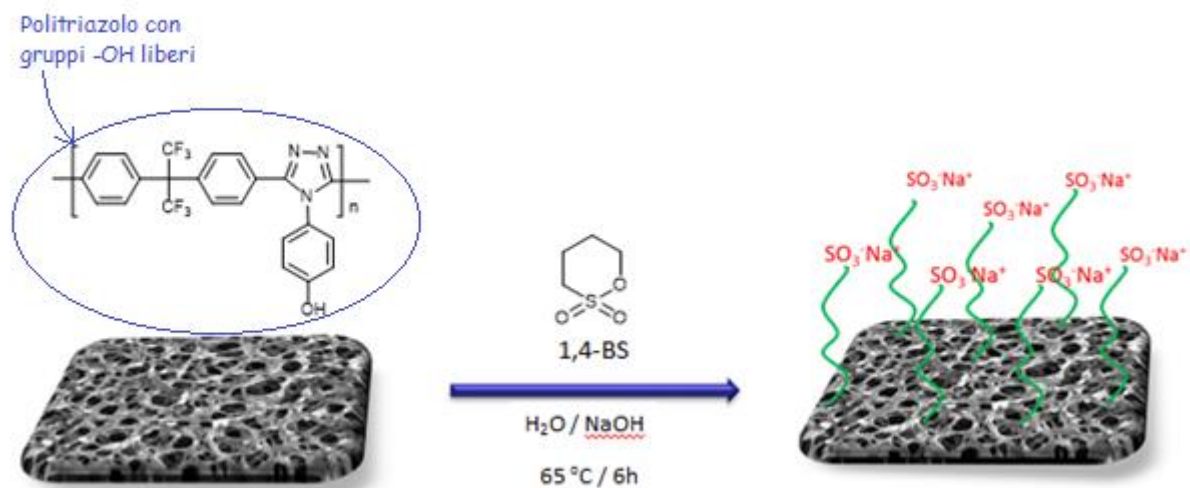
Si tratta di membrane non commerciali, che sono state preparate e caratterizzate da una studentessa che sta svolgendo la sua tesi di laurea nei laboratori della professoressa Suzana P. Nunes, presso la King Abdullah University of Science and Technology in Arabia Saudita. Sono a base di politriazolo, che viene sciolto in solventi non tossici (un liquido ionico, l'1-etil 3-metilimidazolio acetato, IL, e il dimetilcarbonato, DMC); il politriazolo non è solubile in uno di questi due liquidi puri, ma solo in una miscela dei due [85].

Nelle seguenti figure si mostrano le formule di struttura del liquido ionico e del dimetilcarbonato:



**Figura 4.8:** Struttura dell'1-etil 3-metilimidazolio acetato, IL, (a sinistra) e del dimetilcarbonato, DMC (a destra).

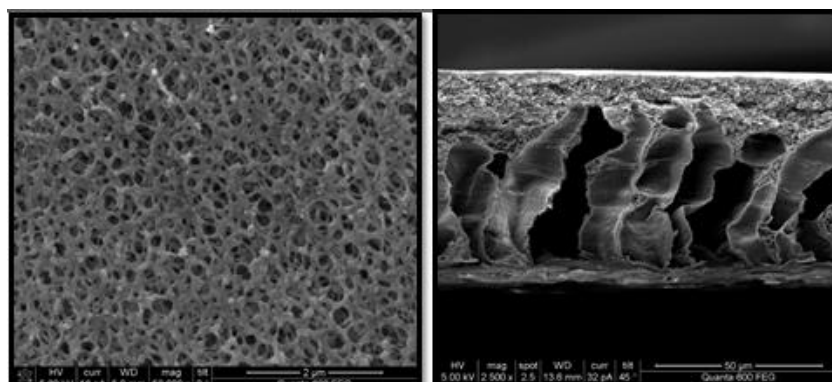
Le membrane vengono ottenute tramite inversione di fase, utilizzando acqua come non-solvente. L'inversione di fase consiste nell'aggiungere un non-solvente ad una soluzione polimerica omogenea, il quale dà luogo ad un sistema bifasico: si ottiene una fase solida ricca in polimero, che costituisce la matrice della membrana, ed una fase liquida ricca del non-solvente, che forma i pori del supporto. Le membrane così ottenute, aventi gruppi -OH liberi, sono state funzionalizzate utilizzando l'1,4-butano sultone mediante immersione in una soluzione sultone-acqua al 5% v/v con idrossido di sodio, impostando una temperatura di 65°C per 6 ore. Dopo questa modifica (figura 4.9), le membrane sono state lavate con acqua. Si ottiene uno scambiatore di tipo cationico con gruppi solfonici [85].



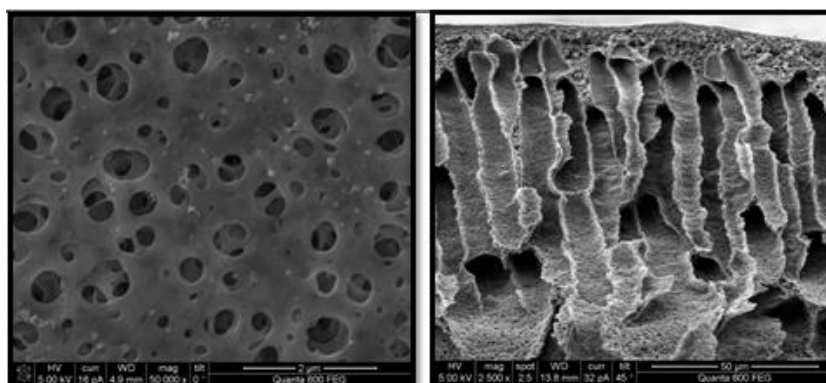
*Figura 4.9: Funzionalizzazione delle membrane con l'1,4-butano sultone [86].*

Durante il lavoro di tesi sono stati caratterizzati due tipi di membrane a base di politriazolo: le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35 e le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30, ottenute a partire da una soluzione contenente il 9% in peso di politriazolo, in cui il rapporto fra i solventi 1-etil 3-metilimidazolio acetato e dimetilcarbonato sia 65:35 e 70:30 rispettivamente.

Di seguito si riportano le immagini che mostrano le scansioni delle membrane PTA-OH 70:30 e PTA-OH 65:35, eseguite al microscopio elettronico dalla studentessa che sta svolgendo la sua tesi di laurea presso la King Abdullah University of Science and Technology in Arabia Saudita:







**Figura 4.10:** Scansioni al microscopio elettronico delle membrane PTA-OH 70:30 (in alto) e PTA-OH 65:35 (in basso): sezione frontale (a sinistra) e sezione longitudinale (a destra) [85].

Sono state eseguite prove ad impulso con il fine di determinare il grado di vuoto delle membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35 e delle membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30; sono stati eseguiti inoltre cicli cromatografici in condizioni dinamiche utilizzando soluzioni pure di lisozima, con lo scopo di valutare la capacità dinamica di adsorbimento del supporto ed il rendimento in fase di eluizione.

#### 4.2.2.2 Le membrane a scambio cationico SartoBind S

Le membrane SartoBind S sono supporti commerciali a base di cellulosa, gentile omaggio di Sartorius Stedim Biotech GmbH, che vengono utilizzate per processi di cromatografia a scambio cationico: contengono infatti gruppi solfonici ( $R-CH_2-SO_3^-$ ) come ligando.

Alcune caratteristiche delle membrane SartoBind S sono elencate nella seguente tabella:

**Tabella 4.2:** Principali caratteristiche delle membrane SartoBind S, dati forniti dal produttore (Sartorius Stedim Biotech GmbH) [87].

Diametro dei pori $d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	3-5
Spessore unitario $L_m$ ( $\mu\text{m}$ )	275
Intervallo di stabilità di pH	3-14
Capacità statica di adsorbimento <sup>a</sup> ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )	>0,8
Densità gruppi solfonici ( $\mu\text{eg}/\text{cm}^2$ )	4-6

<sup>a</sup> proteina di riferimento: lisozima

Come si può osservare dai dati della tabella, l'intervallo di stabilità in termini di pH è molto ampio, si tratta quindi di scambiatori cationici di tipo forte.

Non è specificato il grado di vuoto, che verrà determinato durante il lavoro di tesi mediante prove ad impulso.

### 4.2.3 Proteine e siero umano

Per la caratterizzazione delle membrane di affinità sono state svolte prove con soluzioni pure di IgG, prove con soluzioni pure di contaminanti e prove con miscele.

#### 4.2.3.1 Le immunoglobuline di classe G

Le immunoglobuline utilizzate sono state acquistate da Octapharma, come prodotto farmaceutico Gammanorm: si tratta di una miscela policlonale di IgG umana, fornita in ampolle da 10 mL ognuna, con concentrazione totale di proteina pari a 165 mg/mL e contenuto minimo di IgG garantito pari a circa il 95%. La composizione del prodotto acquistato è riportata nella seguente tabella:

**Tabella 4.3:** *Composizione media del prodotto utilizzato come fonte di IgG [88].*

Sottoclasse	Quantità (%)
IgG <sub>1</sub>	59
IgG <sub>2</sub>	36
IgG <sub>3</sub>	4,9
IgG <sub>4</sub>	0,5

Prima di essere utilizzata, la miscela è stata diluita e frazionata in volumi da 1 mL, con una concentrazione finale pari a 16,5 mg/mL; la conservazione avviene in freezer alla temperatura di circa -18°C. In base alle concentrazioni scelte per effettuare le prove, i campioni congelati verranno opportunamente diluiti con il tampone di alimentazione utilizzato nelle prove sperimentali: 100 mM PBS pH 7,4.

#### 4.2.3.2 Altre proteine: i contaminanti

Oltre alle prove con soluzioni di IgG pure, sono state effettuate prove con miscele binarie di IgG e contaminanti (per valutare la selettività del supporto cromatografico) e con soluzioni di contaminante puro (per lo studio del fenomeno dell'adsorbimento non specifico). I contaminanti utilizzati nel lavoro di tesi sono l'albumina di origine bovina (BSA: bovine serum albumin) ed il lisozima.

L'albumina rappresenta uno dei principali ostacoli alla purificazione delle immunoglobuline di classe G, è infatti la proteina più abbondante nel plasma sanguigno (la concentrazione di albumina nel sangue varia fra 35 e 50 mg/mL) e viene prodotta dalle cellule epatiche [89]. E' contenuta anche nel latte e nell'albume d'uovo, da cui prende il nome; la sua funzione è quella di regolazione della pressione osmotica necessaria per la corretta distribuzione dei liquidi corporei nei tessuti e nei vasi sanguigni, oltre ad essere implicata nel trasporto degli ormoni, degli acidi grassi, della bilirubina e di alcuni farmaci nel flusso sanguigno. Nell'ambito della ricerca viene utilizzata l'albumina di siero bovino, acquistata dall'azienda Sigma Aldrich: il prodotto si presenta in forma liofilizzata, con una purezza superiore al 98%; secondo le indicazioni del produttore, la conservazione avviene in frigorifero ad una temperatura pari a 4°C. Prima dell'uso nelle prove sperimentali, una quantità adeguata di tale contaminante deve essere diluita in 100 mM PBS pH 7,4 in base alla concentrazione desiderata.

Il lisozima è un enzima abbondantemente presente in numerose secrezioni animali ed umane, come le lacrime e la saliva, ma si trova in concentrazioni elevate anche nell'albume d'uovo. La sua funzione è principalmente battericida: idrolizza infatti i peptidoglicani che costituiscono la parete batterica. In minima parte, il lisozima è contenuto anche nel siero (in concentrazioni inferiori a 10 µg/mL). Nelle prove effettuate è stato utilizzato lisozima proveniente dal bianco dell'uovo, acquistato dall'azienda Sigma Aldrich come prodotto liofilizzato e caratterizzato da una purezza superiore al 95%; la conservazione avviene in freezer ad una temperatura di -18°C. Come per la BSA, il lisozima deve essere diluito nel tampone di interesse in quantità tali da soddisfare la concentrazione scelta per effettuare le prove sperimentali.

La seguente tabella riassume le caratteristiche di IgG, BSA e lisozima utilizzati, in termini di peso molecolare e punto isoelettrico:

**Tabella 4.4:** *Peso molecolare e punto isoelettrico di IgG, BSA e lisozima.*

Proteina	Peso Molecolare (kDa)	Punto isoelettrico
IgG <sub>1</sub>	146	8,6
IgG <sub>2</sub>	146	7,4
IgG <sub>3</sub>	170	8,3
IgG <sub>4</sub>	146	7,2
BSA	66,5	4,8
Lisozima	14,3	11

Si noti che le IgG sono caratterizzate da un punto isoelettrico che varia in base alla sottoclasse di appartenenza.

Mentre il punto isoelettrico della BSA è basso e la molecola sarà carica negativamente (forma deprotonata) in condizioni di pH neutro, il lisozima presenta un punto isoelettrico maggiore sia rispetto alla BSA che rispetto alle IgG, per cui questo enzima sarà carico positivamente (forma protonata) in condizioni di pH neutro.

#### 4.2.3.3 Siero umano

Per concludere, sono state eseguite alcune prove con siero umano. Questa sostanza è formata dal plasma (ovvero la parte liquida del sangue, di colore giallo chiaro, costituita da una soluzione acquosa di proteine, lipidi, glucosio, sali minerali e immunoglobuline), ma non contiene fibrinogeno (proteina che interviene nel processo di coagulazione del sangue). Per ottenere un plasma senza fibrinogeno, dopo aver prelevato il sangue, se ne attende la coagulazione e si procede tramite centrifugazione, in modo da separare la fase liquida del sangue dalla parte corpuscolare: si ottiene il siero.

L'azienda di fornitura è la Sigma Aldrich; il prodotto, dopo essere stato frazionato, può essere conservato in freezer alla temperatura di -18°C.

### 4.3 METODI ANALITICI PER LO STUDIO DELLE PROTEINE

I metodi che possono essere impiegati per lo studio delle proteine presenti in un campione sono molti e possono essere distinti in due grandi categorie: tecniche di tipo qualitativo, ovvero in grado di riconoscere le singole proteine presenti in una miscela, e tecniche di tipo quantitativo, principalmente utilizzate nel caso in cui i campioni di interesse siano costituiti dalla proteina pura. Una seconda categorizzazione distingue i metodi in saggi di tipo non distruttivo, se il campione in esame non può essere recuperato al termine dell'analisi, e saggi di tipo distruttivo, qualora il campione possa essere recuperato senza subire alterazioni.

Di seguito si riporta una tabella che mostra un elenco di tutti i metodi impiegati durante il lavoro di tesi per lo studio delle proteine presenti nei campioni e le relative caratteristiche:

*Tabella 4.5: Metodi utilizzati per lo studio delle proteine.*

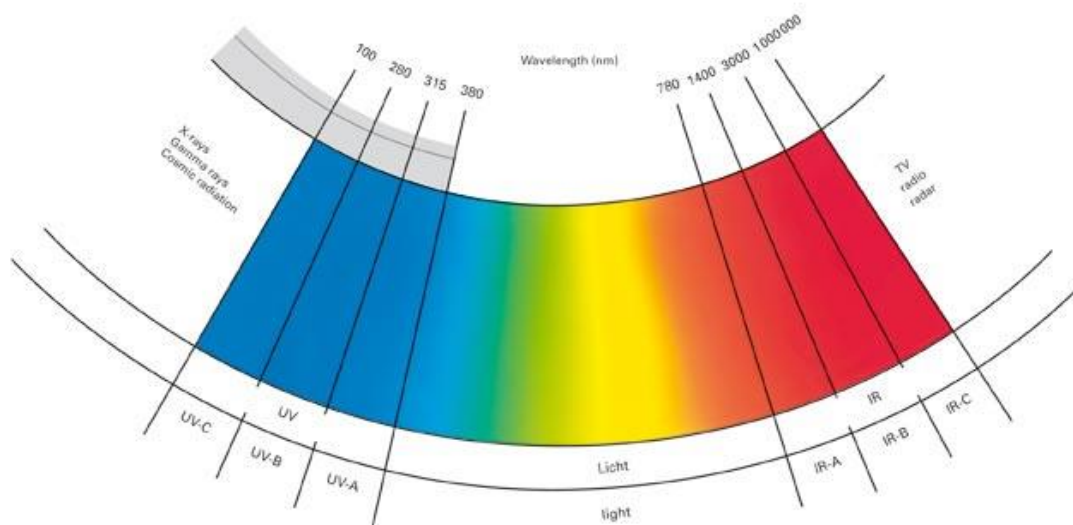
METODO	CARATTERISTICHE
Spettroscopia	quantitativo non distruttivo
Elettroforesi	qualitativo distruttivo
HPLC	quantitativo o qualitativo distruttivo
Saggio di Bradford	quantitativo distruttivo
Saggio del BCA	quantitativo distruttivo

Nei paragrafi seguenti vengono descritti tutti questi metodi.

#### 4.3.1 Spettroscopia di assorbimento nell'UV-visibile

La lettura dell'assorbanza rappresenta una delle tecniche più semplici che possono essere impiegate per lo studio qualitativo di proteine in soluzioni pure. Il principio di misura si basa sulla capacità delle molecole di assorbire le radiazioni nell'ultravioletto vicino: tale assorbimento è in grado di produrre delle transizioni energetiche degli elettroni esterni, che vengono quindi eccitati a livelli energetici superiori [90].

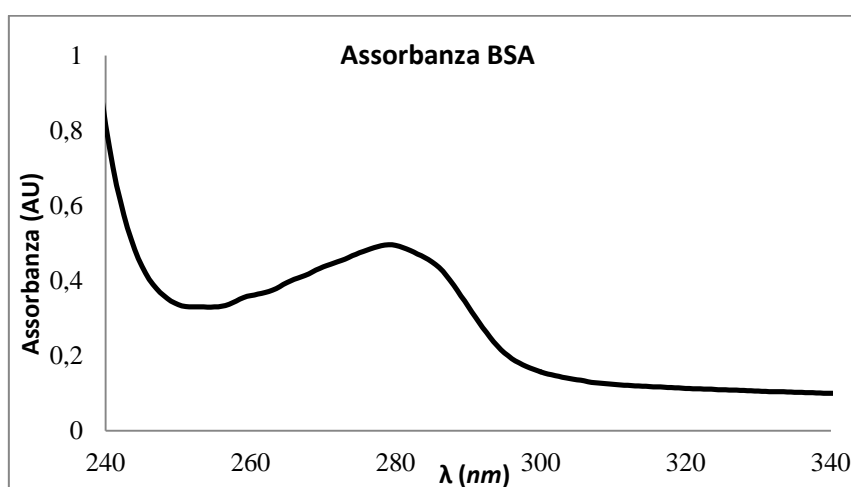
La figura seguente mostra i tipi di radiazione elettromagnetica e le relative lunghezze d'onda:



**Figura 4.11:** Spettro Elettromagnetico.

In un tipico spettro UV-visibile, in ascissa viene riportata la lunghezza d'onda e in ordinata l'assorbanza; quando l'assorbimento provoca delle transizioni tra livelli energetici elettronici, lo spettro registrato sarà caratterizzato da una serie di picchi di altezza variabile per ciascuna transizione, in relazione all'intensità dell'assorbimento stesso.

Nel caso delle proteine, si nota un picco di assorbanza in una banda di lunghezze d'onda intorno a 280 nm; come esempio, si consideri la figura seguente, in cui è mostrato un tipico spettro di assorbimento dell'albumina di siero bovino, proteina ampiamente utilizzata nell'ambito di questo lavoro di tesi:



**Figura 4.12:** Spettro di assorbimento della BSA.

Il legame tra l'assorbanza e la concentrazione di proteina nel campione, per concentrazioni non troppo elevate, può essere descritto dalla legge di Lambert-Beer:

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

dove  $Abs_{\lambda}$  è il valore di assorbanza letto dallo strumento di misura in corrispondenza della lunghezza d'onda  $\lambda$ ,  $c$  è la concentrazione della proteina nel campione,  $H$  è lo spessore della cella di misura e  $\epsilon_{\lambda}$  rappresenta il coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda  $\lambda$ .

L'assorbanza è un numero puro, ma solitamente come unità di misura si utilizza l'unità di assorbanza AU (Absorbance Unit).

Il coefficiente  $\epsilon_{\lambda}$  dipende dalla molecola ed esprime la facilità di interazione dei fotoni della radiazione incidente con la molecola stessa: le transizioni energetiche degli elettroni sono più o meno probabili a seconda dei gruppi funzionali coinvolti; inoltre, il valore di  $\epsilon_{\lambda}$  dipende anche dal tampone in cui si trova la proteina, poiché caratteristiche come il pH o la forza ionica possono modificare la configurazione proteica e, di conseguenza, l'interazione fotoni-molecola.

Lo strumento utilizzato per le analisi è uno spettrofotometro UV 1601 Shimadzu, con lunghezza della cella pari a 1 cm, connesso ad un computer dotato del software UVPC Personal Spectroscopy (versione 3.51):

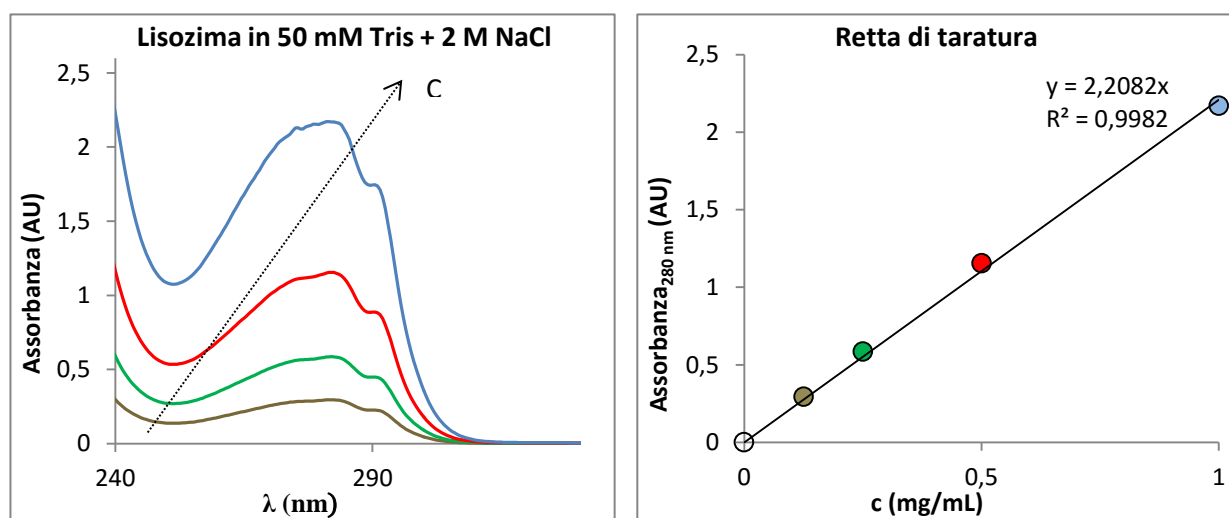


**Figura 4.13:** Immagine dello spettrofotometro UV 1601 Shimadzu.

Il metodo di misura consiste nel trasferire il campione da analizzare in una cuvetta di quarzo e porre tale cuvetta nell'apposito alloggiamento all'interno dello spettrofotometro; prima di far partire la scansione, è possibile scegliere l'intervallo di lunghezze d'onda da investigare, solitamente compreso fra 800 nm e 200 nm.

Per determinare la concentrazione dal valore di assorbanza è necessario ricavare delle curve di calibrazione relative alle proteine di interesse nel tampone utilizzato per le prove: i campioni di proteina pura devono essere diluiti in modo opportuno così da ottenere più soluzioni a diversa concentrazione (nota), cercando di coprire un intervallo di valori abbastanza ampio. Si può quindi procedere con l'analisi allo spettrofotometro ed ottenere una curva di taratura riportando in un grafico i valori di assorbanza forniti dallo strumento di misura in funzione della concentrazione delle soluzioni preparate. Si ottiene un andamento di tipo lineare, in accordo con la legge di Lambert-Beer, dal quale è possibile ricavare il valore del coefficiente angolare della retta che renderà possibile il calcolo del coefficiente di estinzione e, quindi, la conversione assorbanza-concentrazione.

A titolo di esempio si riportano i seguenti grafici:



**Figura 4.14:** Assorbanza e curva di calibrazione per lisozima in 50 mM Tris 2 M NaCl.

Per le altre curve di calibrazione si faccia riferimento all'Appendice A.



### 4.3.2 Elettroforesi

Il fenomeno dell'elettroforesi fu descritto per la prima volta nel 1807 da Ferdinand Friedrich Reuss, che osservò la migrazione di particelle di argilla immerse in acqua in presenza di un campo elettrico esterno [91], mentre il primo dispositivo per svolgere l'elettroforesi fu realizzato nel 1937 da Arne Tiselius, biochimico svedese che, grazie alle sue ricerche sull'elettroforesi delle proteine, vinse il premio Nobel per la chimica nel 1948 [92].

L'elettroforesi è una tecnica qualitativa di tipo distruttivo utilizzata per l'analisi delle proteine contenute in un campione e viene impiegata per studiare miscele di proteine.

Si tratta di un metodo analitico e separativo basato sulla diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi.

La separazione elettroforetica è solitamente condotta utilizzando un gel polimerico, in particolare gel di poliacrilammide, che funge da setaccio molecolare attraverso il quale devono passare le varie molecole. Il gel di poliacrilammide è composto da due parti: lo stacking gel ed il running gel; la prima parte rappresenta l'estremità superiore del gel, contenente i pozzetti di caricamento in cui verranno posti i campioni da analizzare, oltre ai marker molecolari, mentre la seconda parte è la porzione di gel in cui avviene la corsa elettroforetica. La percentuale di poliacrilammide aumenta spostandosi dalla zona di caricamento dei pozzetti verso il fondo: la diversa distribuzione dei pori favorisce la separazione delle proteine e permette solo a quelle più piccole di raggiungere il fondo del gel, per cui le biomolecole vengono separate sulla base del loro peso molecolare.

L'SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) è la tecnica più comune fra le tecniche elettroforetiche condotte su gel a base di poliacrilammide. L'SDS è un detergente anionico in grado di rompere le interazioni non covalenti nelle proteine, le quali perdono la loro struttura tridimensionale e si denaturano: si formano così dei complessi SDS-proteine, in un rapporto di circa una molecola di SDS per ogni due residui amminoacidici, caratterizzati da una carica netta negativa che può essere considerata proporzionale alla massa della proteina stessa; la carica negativa acquisita con la formazione del legame con il sodio dodecil solfato è più grande rispetto alla carica della proteina nativa, che risulta trascurabile.

Di seguito si illustra la modalità di svolgimento dell'analisi eseguita:

1. Si prepara la soluzione elettrolitica, costituita da 14,4 g di glicina, 3 g di Tris base e 1 g di SDS per 1 L di acqua demineralizzata.
2. Si preparano i campioni miscelando 80  $\mu$ L di soluzione proteica con 20  $\mu$ L di miscela contenente  $\beta$ -mercaptoetanol e CPB (una miscela di glicerolo, SDS e blu di bromofenolo in Tris HCl pH 6,8).
3. Tali campioni, posti all'interno di provette tipo eppendorf con tappo forato, vengono lasciati in stufa per 10 minuti alla temperatura di 100 °C, in modo da completare la denaturazione della proteina.
4. Si inserisce il gel, con l'apposito supporto, verticalmente all'interno della cella.
5. Si riempie la cella con la soluzione elettrolitica fino al riferimento "fill" e la vaschetta contenente i pozzetti quanto basta per coprirli.
6. Si caricano i campioni iniettandoli delicatamente nei pozzetti numerati (in tutto si hanno 18 pozzetti): nel primo e nell'ultimo pozzetto vengono posti i marker molecolari (25  $\mu$ L), mentre nei pozzetti da 2 a 17 vengono caricati i campioni da analizzare (20  $\mu$ L).
7. Si chiude la cella elettrolitica con l'apposito coperchio e si collegano gli elettrodi ad un alimentatore, impostando un voltaggio costante pari a 200 V: l'analisi ha inizio.

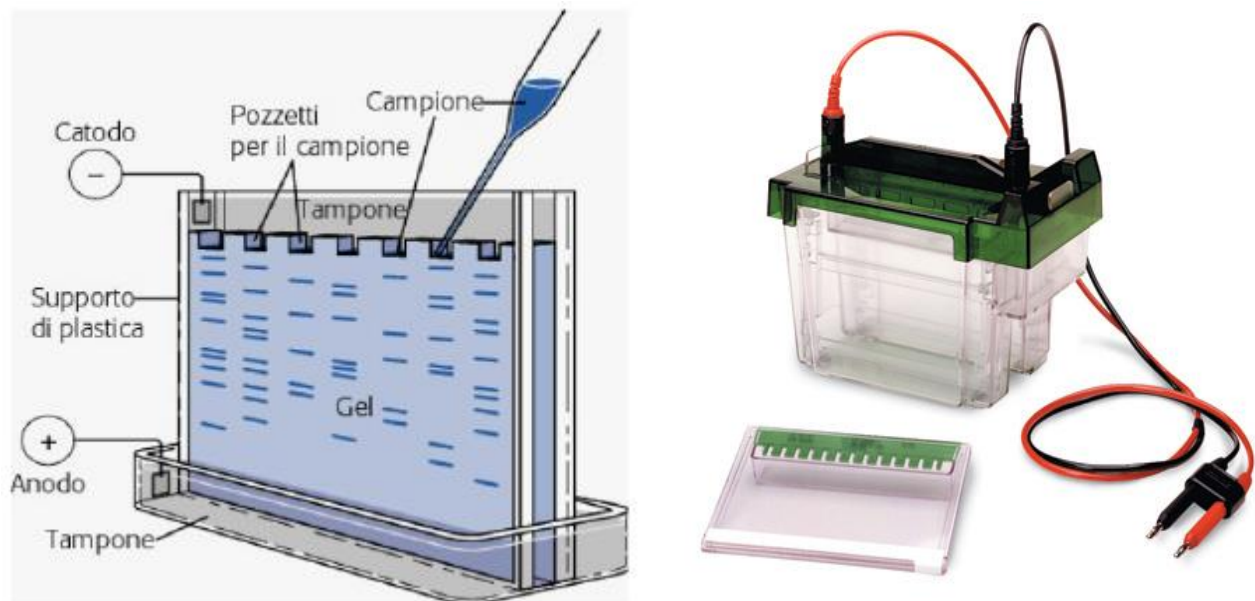
A causa dell'applicazione della corrente, i complessi SDS-proteine carichi negativamente si muovono lentamente verso il fondo della cella: dapprima si assiste alla formazione di una linea blu continua che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica, poi iniziano a delinarsi le bande relative ai marker molecolari.

8. Quando la linea blu arriva sul fondo, si interrompe l'applicazione della corrente, si estrae il gel dalla cella e lo si separa dal supporto in plastica in cui è contenuto.
9. Si immerge il gel in acqua demineralizzata e lo si lascia in agitazione per alcuni minuti.
10. Si sposta il gel all'interno di una vaschetta contenente blu di Comassie, un colorante blu a base di trifenilmetano impiegato per colorare le proteine nelle analisi biochimiche: questo trattamento consente di visualizzare le bande corrispondenti alle proteine che hanno compiuto la loro corsa elettroforetica; si lascia il gel in agitazione nel colorante per un'ora, al termine della quale saranno ben visibili le bande corrispondenti ai campioni analizzati.

11. Si sposta infine il gel in acqua demineralizzata per una fase di lavaggio che renderà meglio evidenti le bande; è possibile far durare questo stadio anche tutta la notte.

A questo punto l'analisi è terminata e si può procedere alla "lettura" delle bande, ottenendo un'indicazione di tipo qualitativo sui campioni iniettati: ad ogni banda formatasi corrisponde un certo peso molecolare, identificabile attraverso i marker, e, quindi, è possibile risalire alle proteine presenti nel campione di partenza. Per esempio, se si esamina una soluzione contenente BSA ed IgG, si distingueranno tre bande: una relativa alla BSA (in corrispondenza di un peso molecolare compreso fra 65 e 70 kDa) e due relative alle IgG (in corrispondenza delle bande relative a 25 e 50 kDa). Si noti che le immunoglobuline sono caratterizzate da due bande di peso molecolare diverso, questo perché l'IgG trattata con SDS si denatura nelle quattro catene che la compongono, due leggere e due pesanti; eventuali altre bande possono corrispondere ad inquinanti presenti nel campione.

Di seguito viene illustrata un'immagine schematica della cella da elettroforesi e la foto dell'apparato sperimentale utilizzato per eseguire le analisi:



**Figura 4.15:** Illustrazione cella da elettroforesi (a sinistra) e immagine dell'apparato utilizzato in laboratorio (a destra).

### 4.3.3 Metodi colorimetrici

I metodi colorimetrici prevedono l'utilizzo di un reagente che vada ad interagire con la proteina in maniera proporzionale alla quantità di quest'ultima e possono quindi essere considerati metodi di tipo quantitativo. L'interazione fra reagente e proteina conferisce alla soluzione una colorazione caratteristica, per cui il campione così ottenuto potrà essere sottoposto a lettura da parte dello spettrofotometro ad una lunghezza d'onda opportuna. Si tratta comunque di metodi di tipo distruttivo.

Durante il lavoro di tesi sono stati utilizzati il saggio di Bradford ed il metodo del BCA, con lo scopo di ottenere una valutazione indicativa sul quantitativo di proteina totale presente nei campioni ottenuti dalle diverse fasi di cicli cromatografici condotti in batch.

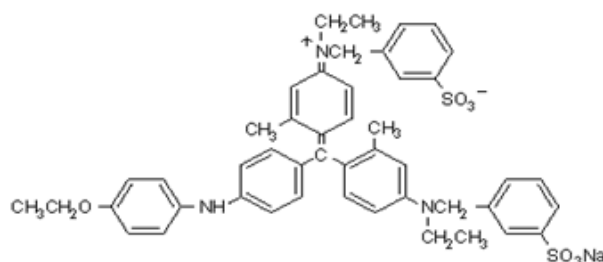
#### 4.3.3.1 Saggio di Bradford

Tale saggio prende nome da Marion M. Bradford, scienziato americano che nel 1976 sviluppò questo metodo di analisi per determinare la concentrazione di proteine presenti in una soluzione [93].

Si tratta di una procedura semplice e rapida, che consiste nell'aggiunta di un colorante alla soluzione da analizzare e nella successiva lettura con uno spettrofotometro UV-visibile a 595 nm; è ovviamente necessaria una retta di taratura ottenuta analizzando uno standard per poter risalire alla concentrazione dei campioni che si sottopongono all'analisi.

Il colorante utilizzato è il Brilliant Blue G-250, sostanza in grado di legarsi alle proteine tramite interazioni elettrostatiche e forze di van der Waals: tale legame provoca uno spostamento del massimo di capacità di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu).

La struttura del colorante è mostrata nella seguente figura:



**Figura 4.16:** Struttura del colorante Comassie Brilliant Blue G.

L'aumento in assorbanza a 595 nm è proporzionale alla quantità di colorante legato, e quindi alla concentrazione di proteina presente nel campione.

Secondo il protocollo standard, il cui intervallo di validità è compreso fra 0,1 e 1,4 mg/mL, bisogna procedere miscelando 50 µL di campione da analizzare e 1,5 mL di reagente all'interno di provette tipo eppendorf che vanno quindi chiuse e lasciate a temperatura ambiente per circa 10 minuti; trascorso il tempo di reazione, si utilizzano cuvette usa e getta per eseguire le letture allo spettrofotometro: la misura di assorbanza si può effettuare facendo funzionare lo spettrofotometro con modalità a doppio raggio, ovvero misurando la differenza di assorbanza dei campioni rispetto ad un riferimento fisso.

La costruzione della retta di taratura da utilizzare per correlare il valore di assorbanza letto allo spettrofotometro ad un valore di concentrazione di proteina in soluzione, solitamente prevede l'utilizzo di albumina di siero bovino (BSA), anche se sarebbe più opportuno costruire le rette di taratura con le stesse proteine di interesse, se disponibili.

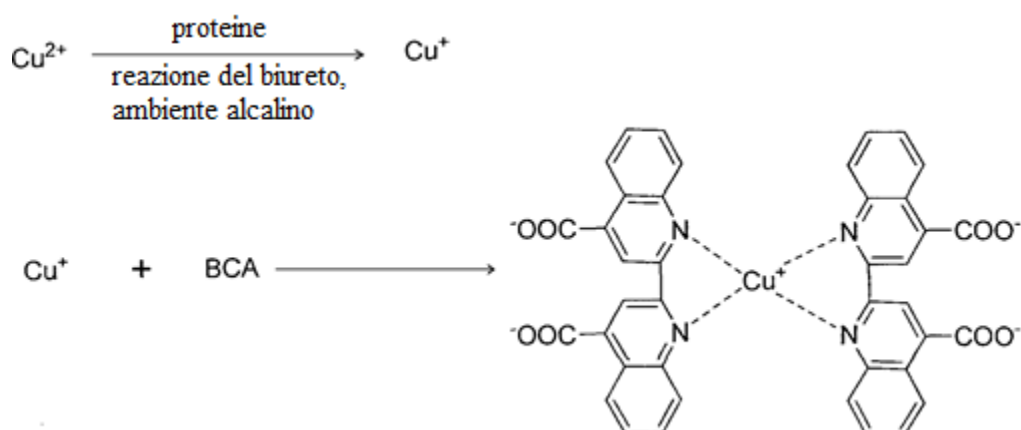
Sebbene si tratti di un saggio molto rapido e semplice, il metodo di Bradford può risultare poco preciso, in quanto molto sensibile alla temperatura, alla presenza di eventuali impurezze o microbolle presenti all'interno della soluzione, oltre che al non perfetto dosaggio di reagente e di soluzione da analizzare, date le basse quantità che entrano in gioco.

#### 4.3.3.2 Saggio del BCA

Così come il saggio di Bradford, anche il saggio del BCA è un metodo colorimetrico, e consiste quindi nell'utilizzo di un reagente che, andando ad interagire con le proteine, permette di determinarne il quantitativo totale presente nel campione in esame: tale reagente è l'acido bicinconinico.

Questo metodo sfrutta la capacità delle proteine, in ambiente alcalino, di ridurre gli ioni rameici  $Cu^{2+}$  in ioni rameosi  $Cu^{1+}$  (reazione detta del biureto); questi ultimi reagiscono con l'acido bicinconinico per formare un complesso viola-porpora (uno ione rameoso è chelato da due molecole di BCA) [94].

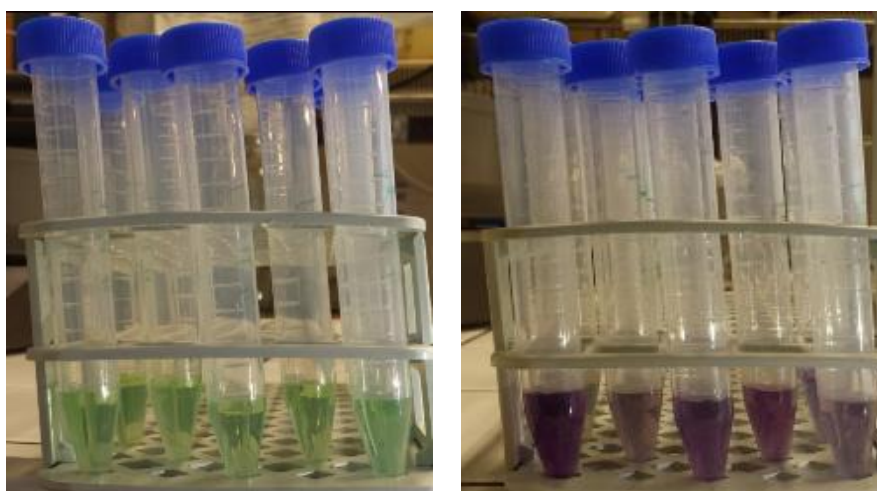
Nella figura seguente è mostrato lo schema di reazione che avviene durante il saggio del BCA:



**Figura 4.17:** Schema della reazione nel saggio del BCA.

Il complesso formatosi mostra un massimo di assorbanza a 562 nm e l'intensità della colorazione può essere considerata pressoché proporzionale alla quantità di proteina presente, ammesso che la concentrazione in esame non superi la soglia di 2 mg/mL; il valore della concentrazione dei campioni che si analizzano può essere determinato sulla base di una curva di taratura costruita utilizzando campioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota (si veda l'Appendice A).

Nella seguente immagine vengono messe a confronto le colorazioni delle soluzioni contenenti i campioni da analizzare ed il reagente utilizzato nel saggio, prima e dopo la reazione:



**Figura 4.18:** Colorazioni delle soluzioni nel saggio del BCA: prima della reazione (sinistra) e dopo la reazione (destra) con l'acido bicinconico.

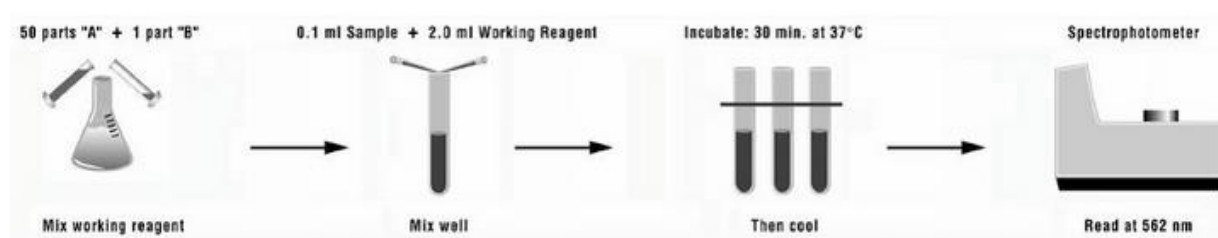
Il saggio del BCA prevede tre protocolli, ma di seguito viene descritto solo il protocollo standard (utilizzato durante il lavoro di tesi):

1. Si preparano gli standard di BSA (nove standard a concentrazione nota, come descritto nel foglio di istruzioni contenuto nel kit Pierce BCA Protein Assay [95] ).
2. Si calcola il volume di working reagent (WR) necessario per svolgere il saggio, in base al numero di standard scelti per la taratura, al numero di campioni da analizzare, al numero delle ripetizioni che si intendono effettuare per ogni misura e al volume di reagente richiesto per ogni campione (2 mL):

$$(\#standards + \#unknowns) * (\#replicates) * (vol\ WR\ per\ sample) = total\ vol\ WR\ required$$

3. Si prepara il working reagent miscelando 50 parti di reagente A e 1 parte di reagente B.  
Il reagente A è costituito da una soluzione incolore contenente carbonato di sodio, tartrato di sodio, BCA, idrossido di sodio e bicarbonato di sodio; il reagente B è una soluzione di solfato rameico pentaidrato di colore azzurro.
4. Si miscelano 0,1 mL di campione e 2 mL di WR.
5. Segue un periodo di incubazione della durata di 30 minuti a 37°C, utilizzando un bagno termostatico.
6. Si procede con la lettura allo spettrofotometro di tutti i campioni a 562 nm, utilizzando come riferimento l'acqua.

Nella figura seguente è illustrato uno schema rappresentativo della procedura:



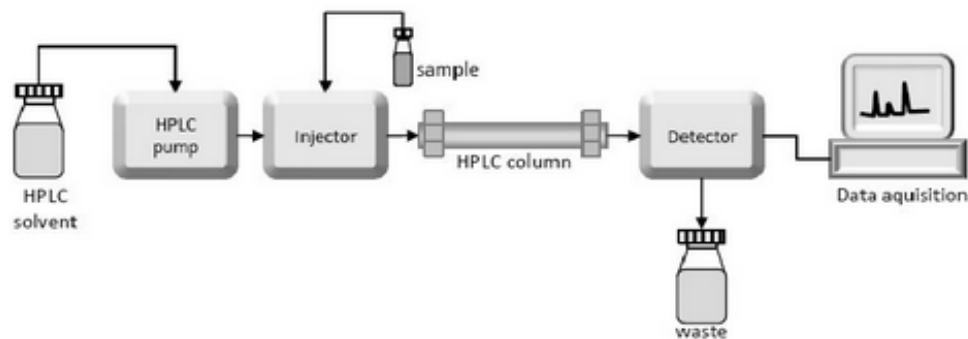
**Figura 4.19:** Schema di esecuzione del saggio del BCA [95].

Ottenute le misure di assorbanza allo spettrofotometro, grazie alla curva di taratura (si veda l'Appendice A), sarà possibile risalire alla concentrazione dei campioni in esame.

#### 4.3.4 Analisi cromatografiche: HPLC

La cromatografia rappresenta una delle tecniche più utilizzate per la separazione di proteine ed è uno dei metodi più diffusi per svolgere analisi di tipo quantitativo e/o qualitativo di miscele di proteine. In particolare, nell'ambito di questo lavoro di tesi, è stata utilizzata la tecnica della cromatografia liquida ad alta risoluzione per la quantificazione delle IgG e di altri componenti presenti in miscela.

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) è una moderna tecnica cromatografica in cui la fase mobile avanza lungo una colonna riempita con una fase stazionaria, sotto l'applicazione di una forte pressione. Uno schema rappresentativo è riportato di seguito:



*Figura 4.20: Schematizzazione semplificata di un HPLC [96].*

Come si può osservare dalla figura, è presente un sistema di pompe per la movimentazione della fase mobile ed un iniettore del campione da analizzare; la colonna è il luogo in cui avviene la separazione e, subito dopo, è collocato un detector UV che rileva lo spettro di assorbanza della soluzione uscente dalla colonna, mentre il segnale viene registrato da un computer sul quale è possibile visualizzare i grafici relativi alle prove in esecuzione.

Poiché la quantità di proteina presente in un campione è proporzionale all'area sottesa al relativo picco visualizzabile sul cromatogramma, saranno necessarie delle curve di calibrazione per permettere di correlare l'area alla concentrazione di biomolecola.

In base al principio con il quale si realizza l'interazione fra le proteine e la fase stazionaria si distinguono varie tecniche cromatografiche; ai fini della tesi sono state svolte analisi con una colonna contenente proteina A immobilizzata sulla fase stazionaria (cromatografia di affinità) e analisi mediante il metodo della cromatografia ad esclusione di forma, nota come SEC (Size Exclusion Chromatography), che prevede l'utilizzo di una colonna impaccata con un materiale altamente poroso.



Lo strumento, comune alle due tecniche, è un cromatografo liquido Waters 2695 S, mostrato nella seguente figura:



*Figura 4.21: HPLC Waters 2695 Separation Module, Waters 2487 Absorbance Detector.*

L'apparato comprende un degasatore, una pompa costituita da due pistoni in serie collegati ai recipienti contenenti i solventi, un iniettore dei campioni da analizzare, un termostato, un rivelatore UV (che può lavorare a doppia lunghezza d'onda); è inoltre presente un porta campioni costituito da cinque caroselli in cui è possibile alloggiare fino a 125 vials. Il fulcro dell'apparato è la colonna analitica, la quale viene cambiata in base al tipo di analisi che si intende effettuare: nel caso della tesi, colonna SEC e colonna proteina A. La macchina è collegata ad un computer dotato del software Empower Pro, che permette di gestire le operazioni, visualizzare i grafici relativi alle prove ed elaborare i dati ottenuti.

#### 4.3.4.1 Colonna di affinità con proteina A

La colonna con proteina A (Applied Biosystems Cat. PA 2-1001-00) è utilizzata per la quantificazione delle immunoglobuline di classe G. La fase stazionaria è costituita da un materiale poroso, sulla superficie del quale si trova il ligando naturale biospecifico per le immunoglobuline G: la proteina A, capace di legare le IgG in modo reversibile ed altamente selettivo.

Le analisi vengono eseguite in flusso, collegando la colonna all'apparato cromatografico: i campioni da analizzare vengono caricati nel porta campioni, veicolati alla colonna ed infine eluiti mediante opportuno tampone. Sono necessari tre tamponi per eseguire le prove con la colonna proteina A: tampone A (di adsorbimento), tampone B (di desorbimento) e tampone C (di stoccaggio per la colonna). Inoltre, i campioni a concentrazione troppo elevata, maggiore di 0,4 mg/mL, dovranno essere diluiti utilizzando il tampone D.

(Le ricette per la preparazione di questi tamponi si trovano in Appendice B).

Per poter quantificare le immunoglobuline G presenti nei campioni, è necessario avere a disposizione una retta di taratura (si veda l'Appendice A), ottenuta analizzando campioni standard di IgG a concentrazione nota in 0,1 M PBS pH 7,4 (ovvero nel tampone usato per la fase di adsorbimento nelle membrane); sarebbe utile ottenere anche la curva di taratura per le IgG nel tampone di eluizione (0,1 M glicina pH 2,8), ma la proteina A non è in grado di legarsi agli anticorpi in queste condizioni. Per analizzare con la colonna proteina A i campioni ottenuti nelle varie fasi di eluizione dei cicli cromatografici, è necessario avere le IgG non in glicina ma in PBS: si procede attraverso un processo di diafiltrazione con filtri Microcon utilizzando una centrifuga.

#### 4.3.4.2 Colonna SEC (Size Exclusion Liquid Chromatography)

La colonna utilizzata è fornita da Waters: Biosuite 250,4  $\mu\text{m}$  UHR SEC.

Il principio di separazione sfrutta le caratteristiche del riempimento, il quale è costituito da un materiale i cui pori sono di dimensioni tali da impedire il passaggio alle macromolecole più grandi, le quali potranno fluire solo attraverso gli spazi interstiziali; le molecole più piccole riescono invece a passare attraverso i pori, distribuendosi quindi anche all'interno del riempimento. Questo significa che le molecole di dimensioni minori saranno caratterizzate da tempi di ritenzione maggiori, dovendo percorrere una strada più lunga, rispetto alle molecole più grandi, prima di uscire dalla colonna [34].

La colonna SEC può essere utilizzata per determinare le quantità dei diversi componenti presenti in una miscela, qualora i picchi relativi alle varie sostanze non siano sovrapposti ed utilizzando opportune curve di calibrazione; altrimenti l'analisi condotta sarà di tipo qualitativo.

Per effettuare le prove è necessario un solo tampone (si veda l'Appendice B), mentre la soluzione di stoccaggio della colonna è costituita da una miscela metanolo-acqua (20 % v/v).

#### 4.4 L'APPARATO SPERIMENTALE: FPLC ÄKTA purifier 100

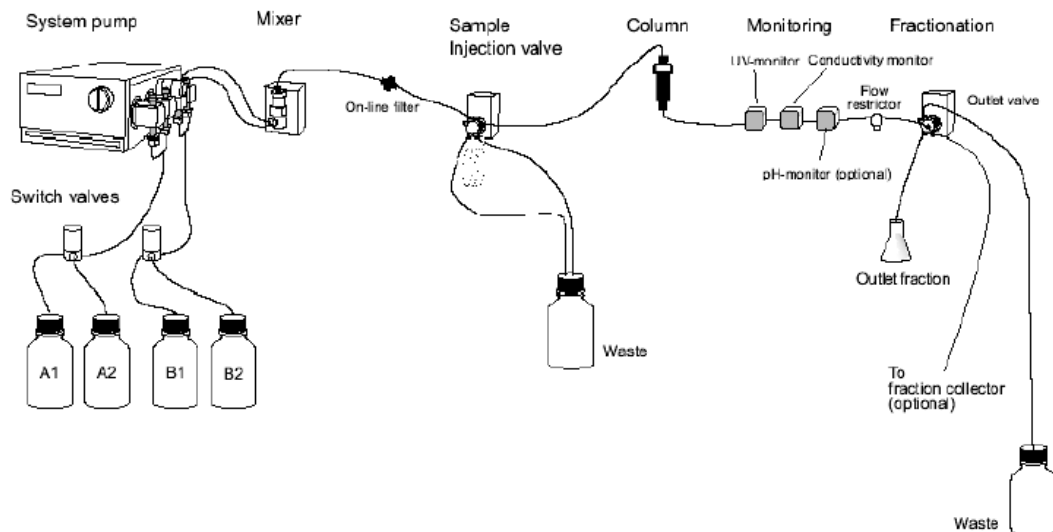
L'FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) è un apparato utilizzato per la cromatografia liquida, in particolare è stato utilizzato per eseguire la caratterizzazione delle membrane oggetto di studio, sottoponendole a cicli cromatografici dinamici.

L'unità cromatografica è composta da tre moduli sovrapposti:

- Un sistema di pompe (P-900), costituito da due coppie di pompe in grado di raggiungere una portata massima pari a 100 mL/min e una pressione di 100 bar (modulo inferiore);
- Un monitor UV-900, che rileva i valori di assorbanza a diverse lunghezze d'onda fino ad un massimo di tre lunghezze d'onda monitorate contemporaneamente nell'intervallo 190-700 nm (modulo mediano);
- Un monitor pH/C-900, in grado di misurare il pH e la conducibilità della soluzione (modulo superiore).

Sulla sommità dell'apparato è possibile porre le soluzioni ed i tamponi da alimentare durante le prove.

Una rappresentazione schematica delle connessioni e dei componenti di un apparato FPLC è mostrata nella seguente figura, in cui si distinguono anche le valvole, un miscelatore e la colonna cromatografica:

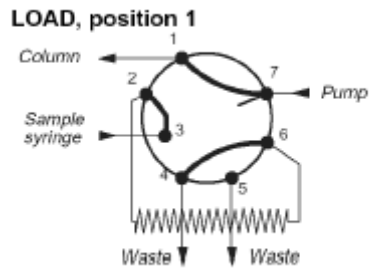


**Figura 4.22:** Rappresentazione di connessioni e componenti che caratterizzano la configurazione base dell'apparato FPLC [7].

Il sistema di pompe è formato da quattro testate, due per la coppia di pompe A e due per la coppia di pompe B: ogni coppia di pompe lavora in parallelo e garantisce una portata costante. Le due pompe A processano le linee A1 e A2, le due pompe B processano le linee B1 e B2: il sistema è quindi in grado di processare fino ad un massimo di quattro tamponi, di cui due contemporaneamente (uno dalla pompa A e uno dalla pompa B). Quando si utilizzano due tamponi, le soluzioni provenienti dalle due linee vengono condotte ad un miscelatore.

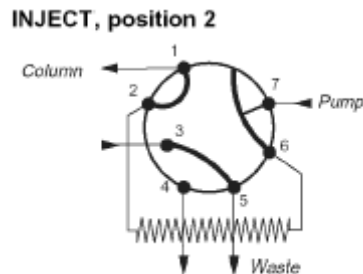
La valvola di iniezione riceve le soluzioni messe in movimento dalle pompe e può assumere tre posizioni differenti:

1. Posizione di load (figura 4.23): la soluzione proveniente dalle pompe entra nella porta 7 e viene alimentata alla colonna cromatografica, per poi passare attraverso il detector UV e quindi finire nello scarico; in questa posizione è possibile caricare il campione dalla porta 3. Tra le porte 2 e 6 viene posto il contenitore del campione che verrà successivamente alimentato alla colonna: si tratta di un tubo di volume noto (per esempio un loop da 10 o da 100  $\mu\text{L}$ ) oppure di un superloop, elemento che verrà descritto in seguito.



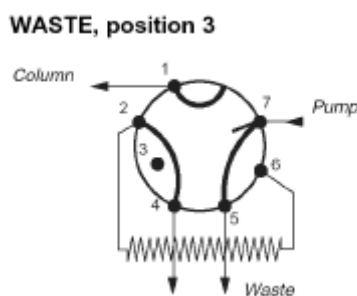
**Figura 4.23:** Posizione di load della valvola di iniezione [7].

2. Posizione di inject (figura 4.24): il flusso proveniente dalle pompe spinge il campione, precedentemente caricato fra le porte 2 e 6, all'interno della colonna cromatografica.



**Figura 4.24:** Posizione di inject della valvola di iniezione [7].

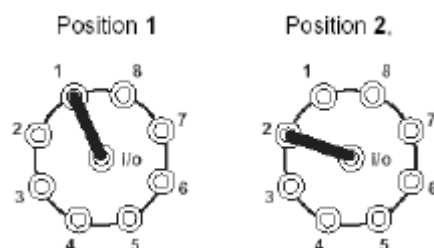
3. Posizione di waste (figura 4.25): la colonna è ora esclusa dal circuito e la soluzione proveniente dalle pompe arriva nello scarico.



**Figura 4.25:** Posizione di waste della valvola di iniezione [7].

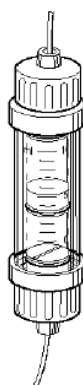
Il flusso, dopo la valvola di iniezione, arriva alla colonna ed attraversa gli strumenti di misura di assorbanza, conducibilità e pH; alla fine del circuito è posizionata una valvola ad otto porte: cambiando la posizione di questa valvola, è possibile dirigere il flusso allo scarico o ad un raccoglitore di frazioni.

Nell'immagine seguente è rappresentata la valvola di uscita:



**Figura 4.26:** Posizioni che può assumere la valvola di uscita [7].

Il superloop, citato in precedenza, rappresenta un accessorio che permette di iniettare nel sistema un volume di campione abbastanza elevato, fino ad un massimo di 150 mL; si tratta di un tubo in pirex dotato di un pistone interno che suddivide l'elemento in due regioni distinte: nella parte inferiore viene caricato il campione, per esempio utilizzando una siringa collegata alla porta 3 della valvola di iniezione (operazione possibile esclusivamente con la valvola di iniezione in posizione di load), mentre nella parte superiore fa ingresso il tampone alimentato dalle pompe, nel momento in cui la valvola di iniezione assume la posizione di inject e l'avanzamento del pistone spinge il campione ad entrare nella colonna. Il superloop è mostrato nella seguente immagine:



**Figura 4.27:** Immagine del superloop [7].

La macchina è collegata ad un computer dotato del software Unicorn<sup>TM</sup>, che permette di gestire le operazioni da eseguire, visualizzare i grafici relativi alle prove ed elaborare i risultati ottenuti. Il programma presenta una struttura costituita da quattro finestre:

- Manager: finestra per la gestione dei documenti;
- Method editor: finestra per creare e modificare i metodi di lavoro;

- System Control: finestra che permette di seguire i risultati delle prove in esecuzione e di modificare i parametri operativi in modo manuale;
- Evaluation: finestra in cui si possono visualizzare i risultati di una prova ed eseguire diverse operazioni per l'elaborazione dei dati.

La seguente immagine mostra l'intero complesso FPLC-collettore di frazioni nel caso in cui la macchina sia predisposta per l'esecuzione di un ciclo cromatografico:



*Figura 4.28: Immagine del complesso FPLC ÄKTA purifier 100 con collettore di frazioni: configurazione relativa all'esecuzione di un ciclo cromatografico in condizione dinamiche.*

## 4.5 PROVE BATCH

### 4.5.1 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali

I cicli cromatografici in batch sono stati eseguiti per determinare la capacità di adsorbimento del supporto cromatografico, in modo da ottenere informazioni riguardo la capacità della membrana di adsorbire le proteine e la selettività della stessa; è molto importante anche il calcolo della quantità di proteina che si riesce a recuperare nella fase di eluizione. La procedura adottata per l'esecuzione dei cicli cromatografici in batch è stata ottimizzata nei precedenti lavori svolti dal gruppo di ricerca [24, 7]: dopo aver eseguito i protocolli di immobilizzazione dello spaziatore o del complesso ligando-spaziatore alle membrane ed il protocollo di endcapping, le membrane sono pronte per essere sottoposte ai cicli cromatografici. Solitamente questo tipo di prova viene

condotto utilizzando set composti da 2 membrane ciascuno, le cui caratteristiche sono riassunte nella seguente tabella:

**Tabella 4.6:** *Principali caratteristiche per un set costituito da 2 membrane SartoBind Epoxy impiegate per le prove batch.*

$n_{\text{epoxy}}$ (mol)	1,06E-05
Diametro (cm)	1,5
Spessore unitario (cm)	0,025
Area superficiale (cm <sup>2</sup> )	3,534
Volume (cm <sup>3</sup> )	0,085

Le fasi che compongono il ciclo cromatografico eseguito sono:

1. Equilibratura: avviene sospendendo il set di membrane in 5-10 mL di PBS (il tampone usato per le fasi di adsorbimento e lavaggio) per circa 20 minuti.
2. Adsorbimento: le membrane vengono immerse nella soluzione contenente la proteina pura o una miscela di proteine in 100 mM PBS pH 7,4; questa fase dura 2 ore.
3. Lavaggio: avviene ponendo le membrane in PBS e dura un'ora.
4. Eluizione: è la fase in cui le proteine che si sono legate al supporto vengono rimosse sospendendo le membrane in 0,1 M glicina pH 2,8; anche in questo caso la durata è pari ad un'ora.

Ogni fase avviene all'interno di un becher, e le membrane vengono spostate da un becher al successivo facendo attenzione ad asciugarle delicatamente prima dello spostamento; ogni contenitore viene coperto con del Parafilm e lasciato in agitazione a circa 80 rpm. I campioni da analizzare devono essere prelevati dalle soluzioni alla fine di ogni fase del ciclo; il campione dell'alimentazione deve invece essere prelevato all'inizio della prova. Ogni set di membrane è stato sottoposto a più cicli cromatografici (solitamente tre) e, fra un ciclo ed il successivo, è stato fatto passare un lasso di tempo di almeno 20 minuti durante il quale le membrane hanno avuto modo di riequilibrarsi.



Il PBS e la glicina, dopo essere stati preparati, devono essere filtrati utilizzando filtri in nitrocellulosa, con diametro dei pori pari a 0,45  $\mu\text{m}$ , ed un sistema da vuoto, per poi essere conservati a 4°C.

Nel caso di prove con soluzioni di proteina pura, è possibile analizzare i campioni prelevati utilizzando uno spettrofotometro UV-visibile, mentre nel caso di prove con miscele si procede con un'analisi all'HPLC. Quando si percorre questa seconda strada, e si utilizza la colonna di affinità con proteina A, i campioni relativi alle fasi di eluizione non possono essere analizzati tal quali, in quanto la proteina A non è in grado di legare le immunoglobuline in condizioni acide: è necessario che gli anticorpi siano nel tampone di adsorbimento e non in 0,1 M glicina pH 2,8. Per questo motivo si procede centrifugando i campioni ed utilizzando filtri Millipore Microcon, realizzando un processo di diafiltrazione in modo da ottenere soluzioni di proteine in 0,1 M PBS pH 7,4 che potranno quindi essere analizzate senza problemi all'HPLC. Si osserva comunque che questo metodo, seppure abbastanza efficace, potrebbe causare la perdita di un certo quantitativo di biomolecole rimaste intrappolate nel filtro.

#### 4.5.2 Elaborazione dei dati

L'elaborazione dei dati ottenuti mediante le prove batch ha lo scopo di calcolare le quantità di proteine adsorbite, lavate ed eluite e di ottenere quindi la capacità di adsorbimento del supporto cromatografico in esame ed il valore del recupero, numero adimensionale che fornisce un'indicazione sulla percentuale di proteina recuperata nella fase di eluizione.

Per quanto riguarda le prove con soluzioni pure, si procede analizzando i campioni allo spettrofotometro UV-visibile: si ottengono dei valori di assorbanza che possono essere convertiti in valori di concentrazione utilizzando gli opportuni fattori di conversione ricavati dalle curve di calibrazione. Avendo la concentrazione e conoscendo i volumi relativi alle varie fasi del ciclo cromatografico eseguito, si ricava la massa di proteina.

Sia  $m_{in}$  la massa di biomolecola presente nell'alimentazione (data dal prodotto fra la concentrazione ed il volume iniziale), sia  $m_{fin}$  la massa di biomolecola presente alla fine della fase di adsorbimento, allora la massa adsorbita  $m_{ads}$  sarà:

$$m_{ads} = m_{in} - m_{fin}$$

La quantità di proteina adsorbita è definita come il rapporto fra la massa adsorbita ed il volume totale delle membrane:

$$q = \frac{m_{ads}}{V_{mem}}$$

Durante la fase del lavaggio vengono rimosse le proteine che sono legate alla matrice mediante interazioni deboli, si perde quindi una certa massa di biomolecola,  $m_{wash}$ , determinata moltiplicando il valore di concentrazione ricavato dall'analisi del campione allo spettrofotometro per il volume del tampone di lavaggio. Conoscendo  $m_{wash}$ , è possibile calcolare la quantità di proteina che resta legata al supporto cromatografico prima della fase di eluizione; ovviamente il valore che si ottiene rappresenta la massa di proteina che idealmente potrà essere eluita:

$$m_{elu}^{ideal} = m_{ads} - m_{wash}$$

In realtà la quantità di biomolecola che si riesce a recuperare in eluizione sarà minore rispetto al valore ideale e può essere determinata moltiplicando il valore della concentrazione nel campione prelevato alla fine della fase di eluizione per il volume della relativa fase: si ottiene  $m_{elu}^{actual}$  e si definisce il parametro *Recovery*:

$$Recovery = \frac{m_{elu}^{actual}}{m_{elu}^{ideal}}$$

che sarà ovviamente minore di uno e viene solitamente espresso in forma percentuale. Il suo valore è di fondamentale importanza, in quanto fornisce una preziosa indicazione sulla reversibilità del legame fra il ligando e la biomolecola.

Sebbene quella esposta sia la trattazione più rigorosa, ai fini della tesi il recupero di proteina è stato calcolato non prendendo in considerazione il valore della massa  $m_{wash}$ , in quanto la concentrazione relativa alla fase di lavaggio risulta piuttosto bassa e può essere affetta da errori sperimentali che possono comprometterne il calcolo. Si introduce quindi il parametro  $Recovery_{w/o\ washing}$ , che ha la stessa funzione del parametro *Recovery*, ovvero fornisce comunque un'indicazione sulla reversibilità del legame ligando-proteina, ma risulta così definito:

$$Recovery_{w/o\ washing} = \frac{m_{elu}^{actual}}{m_{ads}}$$

Nelle prove con le miscele, le analisi non vengono effettuate con lo spettrofotometro, bensì con l'HPLC, secondo le modalità descritte nei paragrafi precedenti: in questo caso è necessario correlare le aree dei picchi dei cromatogrammi ottenuti alle concentrazioni di biomolecole, utilizzando opportuni fattori di conversione derivanti dalle curve di calibrazione e procedere quindi al calcolo della quantità adsorbita e di altri parametri di interesse, eventualmente integrando la trattazione mediante i risultati ottenuti tramite il saggio di Bradford o il saggio del BCA.

## 4.6 PROVE DINAMICHE

### 4.6.1 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali

Gli esperimenti eseguiti in condizioni dinamiche permettono di determinare il valore della capacità dinamica (DBC), il valore di recupero della biomolecola di interesse ed il grado di vuoto del supporto in esame.

Il modulo di separazione a membrana utilizzato per eseguire le prove dinamiche è illustrato nella seguente immagine:



**Figura 4.29:** Foto del modulo di separazione, frittelle, o-rings e anello distanziale.

Tale modulo è in acciaio inox, materiale che garantisce un'elevata resistenza meccanica; è composto da una femmina, in cui vengono inserite le membrane, i frittelle (distributori di flusso) e gli o-rings (elementi necessari per evitare che il flusso scorra preferenzialmente lungo le pareti del modulo), e da un maschio dotato di una zona filettata che va ad inserirsi ed avvitarsi all'interno della femmina. Le parti interne superiore ed inferiore della cella, ovvero quelle zone che dovrebbero essere a diretto contatto con le membrane, presentano dei solchi concentrici e

radiali, realizzati con lo scopo di migliorare la distribuzione del flusso in ingresso al modulo e di facilitare la raccolta del fluido in uscita. In realtà, per migliorare ulteriormente la distribuzione del flusso ed evitare che le membrane si trovino a diretto contatto con le superfici rigide della cella, vengono utilizzati degli elementi chiamati frits, dischetti aventi lo stesso diametro della cella realizzati in Teflon. Inoltre, per evitare che il flusso scorra preferenzialmente lungo le pareti del modulo, si utilizzano due anelli in materiale plastico inerte, gli o-rings, uno posto all'ingresso del modulo e uno posto all'uscita. L'ordine con il quale gli elementi devono essere inseriti nel modulo è il seguente: frit – o-ring – membrane – frit – o-ring. Sempre con lo scopo di migliorare la distribuzione di flusso, ma anche per creare uno spessore aggiuntivo qualora necessario, vengono utilizzati due filtri in carta Whatman 43 che vanno a delimitare il blocco costituito dalle membrane. Ovviamente il modulo, gli o-rings, i frits e le membrane Whatman sono costituiti da materiali totalmente inerti, non capaci di interagire con le soluzioni impiegate nelle le prove.

La connessione del modulo con il sistema di tubazioni avviene attraverso un raccordo con ferula.

Le caratteristiche dei set di membrane impiegati nelle prove dinamiche sono riassunti nella seguente tabella:

**Tabella 4.7:** *Principali caratteristiche dei set di membrane impiegati nelle prove dinamiche.*

Diametro (cm)	2,6
Spessore unitario (cm)	0,0116 membrane PTA-OH 65:35 0,0140 membrane PTA-OH 70:30 0,0275 membrane SartoBind S
Area superficiale (cm <sup>2</sup> )	5,309

Il numero di membrane da utilizzare dipende ovviamente dallo spessore unitario di una membrana e viene solitamente calcolato in modo da ottenere uno spessore totale di circa 1,5 mm.

Dopo aver assemblato il modulo, lo si può collegare all'FPLC ed iniziare gli esperimenti in condizioni dinamiche.

#### 4.6.1.1 Curva di Breakthrough

Tutte le prove sono state eseguite impostando una portata costante, pari a 1 mL/min per le membrane PTA-OH e a 2 mL/min per le membrane SartoBind S, e seguendo lo schema di un classico ciclo cromatografico:

1. Equilibratura: la colonna cromatografica viene condizionata con una soluzione tampone (50 mM Tris pH 8 nel caso di membrane a scambio ionico); la durata dell'equilibratura non è standardizzata, ma dipende essenzialmente dal tempo impiegato per uniformare le condizioni di lavoro lungo la colonna ed è durante questa fase che vengono allontanate eventuali bolle d'aria intrappolate nel sistema, che comprometterebbero l'esito dei risultati.
2. Adsorbimento: questa è la fase in cui il campione, opportunamente diluito nel tampone di interesse e caricato all'interno del superloop, viene alimentato alla colonna; la sua durata dipende dal tempo impiegato dalla colonna per raggiungere le condizioni di saturazione, ovvero è possibile far partire la successiva fase di lavaggio quando si nota che il valore di assorbanza, registrato dallo strumento di misura e visibile in tempo reale sulla schermata del computer dotato del software Unicorn, non aumenta più. In realtà questa tecnica è impiegata solo su scala di laboratorio, poiché in questo modo vengono sfruttate completamente le capacità di adsorbimento del riempimento e si raggiunge l'equilibrio fra la fase mobile e la fase stazionaria in ogni sezione della colonna; a livello industriale la fase di adsorbimento viene conclusa quando la concentrazione di biomolecola uscente dalla colonna raggiunge quella che viene definita concentrazione di breakthrough (pari ad una determinata frazione della concentrazione di proteina presente in alimentazione).
3. Lavaggio: viene utilizzato lo stesso tampone in cui si trovava disciolto il campione nella fase di adsorbimento per rimuovere le eventuali biomolecole non legate al supporto presenti nel sistema. Osservando in tempo reale l'andamento dell'assorbanza con il tempo, si noterà che questa, partendo dal massimo valore raggiunto nella fase di adsorbimento, calerà rapidamente per assestarsi su un valore prossimo alla baseline: quando il valore sarà costante, avremo la certezza di aver concluso la fase di lavaggio e di poter quindi procedere con l'ultimo stadio del ciclo cromatografico.
4. Eluizione: diversamente dalle fasi precedenti, viene ora alimentato alla colonna un tampone differente, con caratteristiche tali da rompere il legame delle biomolecole adsorbite con il supporto cromatografico. Nel caso dello studio di membrane a scambio ionico, è stato utilizzato 50 mM Tris 2 M NaCl pH 8. Osservando il grafico assorbanza/tempo sullo schermo del computer collegato all'FPLC, si noteranno i picchi di eluizione che

corrispondono all'uscita delle proteine dalla colonna: tali frazioni possono essere raccolte ed analizzate. Nel caso di membrane a scambio ionico è possibile procedere mediante eluizione a gradiente di sale, ovvero la concentrazione di sale viene aumentata gradualmente, in modo che raggiunga un certo valore entro un determinato intervallo di tempo: questa tecnica è particolarmente utile nel caso in cui si abbia a che fare con miscele, in quanto permette di separare i picchi relativi alle varie specie proteiche l'uno dall'altro e di raccogliere le frazioni separatamente.

5. Rigenerazione: si tratta di una fase durante la quale viene alimentata al sistema una soluzione che possa ripristinare le condizioni iniziali della colonna, favorendo il distacco di eventuali aggregati proteici adsorbiti sulla colonna e non eluiti nello stadio precedente. La rigenerazione può essere condotta dopo ogni ciclo cromatografico o dopo alcuni cicli.
6. Riequilibrio: si alimenta alla colonna il tampone utilizzato per l'equilibratura in modo da preparare il sistema all'esecuzione di un nuovo ciclo cromatografico.

Tutte le prove sono quindi state eseguite alimentando sempre lo stesso tampone nelle fasi di equilibratura e lavaggio, collegato alla linea A1 dell'FPLC; il campione è stato alimentato tramite superloop caricato mediante l'ausilio di una siringa collegata alla porta 3 della valvola di iniezione, mentre il tampone di eluizione è stato collegato alla linea B1 dell'FPLC.

Tutti i tamponi utilizzati sono stati filtrati con l'ausilio di filtri in nitrocellulosa (diametro dei pori pari a 0,45  $\mu\text{m}$ ) ed un sistema da vuoto; possono essere conservati alla temperatura di 4°C.

Nelle prove con soluzioni di proteina pura, IgG o contaminante come nel caso del lisozima, è possibile monitorare in tempo reale l'andamento dell'assorbanza del fluido in uscita dalla colonna e, da tale assorbanza, risalire ai valori di concentrazione tramite opportuni fattori di conversione. La seguente tabella mostra i fattori di conversione assorbanza (a 280 nm)-concentrazione:

**Tabella 4.8:** Coefficienti di estinzione e fattore di conversione da assorbanza<sub>280 nm</sub> (mAU) a concentrazione (mg/mL) per l'FPLC ÅKTA purifier 100: IgG e lisozima.

Proteina	Soluzione	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$	H $\epsilon_{280 \text{ nm}}$
IgG	0,1 M PBS pH 7,4	1,305 <sup>a</sup>	284,2
	0,1 M Glicina pH 2,8	1,334 <sup>a</sup>	290,5
Lisozima	50 mM Tris pH 8	2,183 <sup>b</sup>	473,7
	50 mM Tris 2 M NaCl pH 8	2,208 <sup>b</sup>	479,2

<sup>a</sup> Dati ottenuti dalla tesi di Sorci [52].

<sup>b</sup> Dati ricavati durante il lavoro di tesi e confrontati con i valori forniti dall'azienda Sigma Aldrich [97].

#### 4.6.1.2 Curva di dispersione

Oltre all'esecuzione di prove dinamiche, nelle modalità descritte nel paragrafo precedente, è necessario effettuare le prove di dispersione, in quanto, per determinare la DBC, occorre tener conto dell'influenza dei volumi esterni alla colonna sul processo cromatografico [7]. Infatti, il volume del sistema è composto, oltre che dall'unità di separazione, anche dal volume di elementi esterni quali tubi, valvole e strumenti di misura: la dispersione che avviene in questi volumi causa un ampliamento della curva di breakthrough [7, 12].

A questo scopo, è necessario scegliere una sostanza, come sostituta del campione proteico, che sia economica e che non vada ad interagire con la fase stazionaria: acetone in acqua demineralizzata 0,4 % v/v, come suggerito dal lavoro svolto da Brienza [24]. E' stato quindi eseguito un ciclo cromatografico in condizioni di non adsorbimento, rimpiazzando i tamponi usati nelle varie fasi del ciclo con acqua demineralizzata.

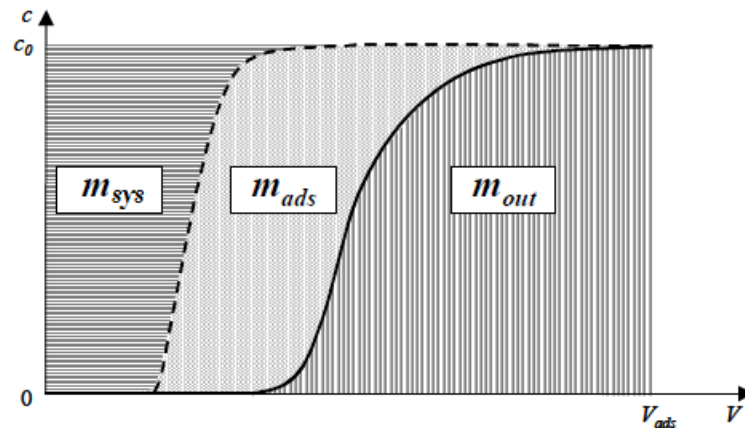
#### 4.6.2 Elaborazione dei dati

L'elaborazione dei risultati ottenuti mediante i cicli cromatografici eseguiti ha permesso di determinare le quantità di proteine adsorbite sul supporto, lavate ed eluite, dati necessari per caratterizzare le prestazioni delle membrane: grazie alla loro conoscenza, infatti, è possibile calcolare il valore della capacità dinamica di adsorbimento ed il valore del parametro che rappresenta il recupero di biomolecola in fase di eluizione.

Sia  $m_{feed}$  la massa di biomolecola alimentata alla colonna, data dal prodotto fra la concentrazione di proteina in ingresso,  $c_0$ , per il volume di soluzione alimentata durante la fase di adsorbimento,  $V_{ads}$ . In un grafico concentrazione-volume, la quantità  $m_{feed}$  rappresenta l'area del rettangolo delimitato dagli assi e dalle rette passanti per  $c_0$  e  $V_{ads}$ , e può essere scomposta nella somma di tre contributi:

1.  $m_{sys}$ : massa di proteina contenuta nella soluzione che occupa tutti i volumi del sistema cromatografico;
2.  $m_{ads}$ : massa di proteina adsorbita dal supporto cromatografico;
3.  $m_{out}$ : massa di proteina in uscita dal sistema, quindi persa.

Nel seguente grafico viene riportato l'andamento qualitativo della curva di dispersione nei volumi esterni alla colonna e della curva di breakthrough durante la fase di adsorbimento, con indicazione delle aree che corrispondono alle masse appena definite:



**Figura 4.30:** Andamento qualitativo della curva di dispersione (linea tratteggiata) e della curva di breakthrough (linea continua) durante la fase di adsorbimento. Le zone tratteggiate corrispondono alle masse  $m_{sys}$ ,  $m_{ads}$  e  $m_{out}$  [7].

Il valore di  $m_{sys}$  può essere stimato calcolando l'area delimitata dalla curva di dispersione e dall'asse delle ordinate;  $m_{out}$  si ottiene invece calcolando l'integrale dell'area sottesa alla curva di breakthrough. La quantità di proteina adsorbita dalla colonna potrà quindi essere stimata utilizzando la seguente formula:

$$m_{feed} = m_{sys} + m_{ads} + m_{out}$$

per cui  $m_{ads}$  sarà data dalla differenza fra la massa totale di proteina alimentata al sistema meno i due contributi  $m_{sys}$  e  $m_{out}$ .

Si definisce inoltre la capacità dinamica, DBC, come il rapporto tra la massa di proteina adsorbita ed il volume totale delle membrane collocate nella colonna cromatografica; si parla di capacità dinamica al 100% breakthrough, ovvero nelle condizioni in cui la membrana è completamente sfruttata. In formule:

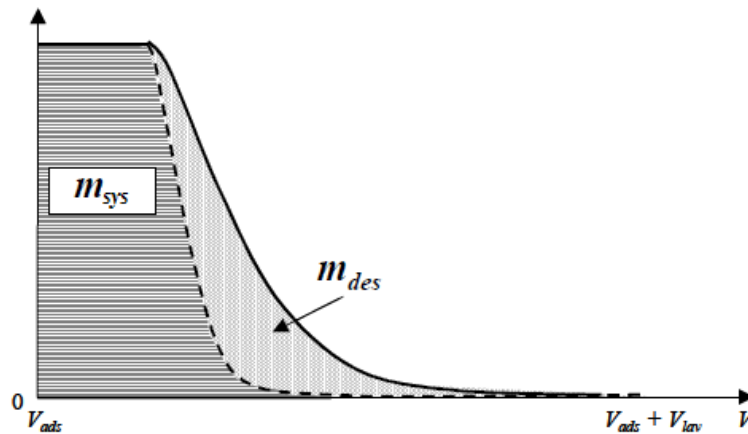
$$DBC_{100\%} = \frac{m_{ads}}{V_{mem}}$$

Durante la fase di lavaggio, il tampone rimuove la soluzione proteica dai volumi del sistema, ma non solo: parte della proteina adsorbita sul supporto può desorbire, o in quanto legata tramite interazioni deboli, o a causa della reversibilità del legame con il ligando. Si definisce quindi la



massa  $m_{wash}$  come la quantità di proteina in uscita dal sistema durante questa fase, il cui valore può essere determinato calcolando l'area sottesa alla curva di lavaggio.

Come si può osservare dalla seguente figura, la massa  $m_{wash}$  può essere scomposta nella somma di due contributi:  $m_{sys}$ , contributo relativo alla massa di proteina contenuta nei volumi del sistema, e  $m_{des}$ , contributo relativo alla massa di proteina che desorbe dal supporto cromatografico:



**Figura 4.31:** Andamento qualitativo della curva di dispersione (linea tratteggiata) e della curva di breakthrough (linea continua) durante la fase di lavaggio. Le zone tratteggiate corrispondono alle masse  $m_{sys}$  e  $m_{des}$  [7].

In formule:

$$m_{wash} = m_{sys} + m_{des}$$

La quantità di proteina che teoricamente può essere recuperata nella fase di eluizione,  $m_{elu}^{ideal}$ , si può calcolare tramite la seguente equazione:

$$m_{elu}^{ideal} = m_{ads} - m_{des}$$

In realtà la quantità di biomolecola che si riesce a recuperare di solito è minore rispetto al valore ideale e può essere determinata integrando l'area sottesa al picco di eluizione: si ottiene  $m_{elu}^{actual}$  e si definisce il parametro *Recovery*, come il rapporto fra la quantità di proteina effettivamente eluita e la quantità di proteina teoricamente eluibile:

$$Recovery = \frac{m_{elu}^{actual}}{m_{elu}^{ideal}}$$

che sarà ovviamente minore di uno e viene solitamente espresso in forma percentuale. Il suo valore è di fondamentale importanza, in quanto fornisce un'indicazione sulla reversibilità del legame fra il ligando e la biomolecola: il recupero è prossimo al 100% nel caso in cui le interazioni ligando-biomolecola sono tali da permettere una facile scissione dei legami durante l'eluizione.

### 4.6.3 Porosità del supporto cromatografico

Il grado di vuoto delle membrane è stato determinato mediante prove ad impulso all'FPLC ÄKTA purifier 100, seguendo la procedura descritta nel paragrafo seguente.

#### 4.6.3.1 Descrizione qualitativa delle prove sperimentali

Le prove vengono eseguite collegando il modulo contenente le membrane da studiare, i frits e gli o-rings all'FPLC. Come tracciante si sceglie una sostanza che non vada ad interagire con la fase stazionaria: durante la tesi è stata utilizzata una soluzione di acetone in acqua demineralizzata (5% v/v), che verrà iniettata nella colonna dopo un periodo di equilibratura. Si ricorda che le soluzioni inviate nelle linee dell'FPLC devono essere preventivamente filtrate. La portata della fase mobile è stata impostata ad un valore di 1 mL/min ed è stata mantenuta costante per tutta la durata della prova.

Si inizia quindi equilibrando il sistema con acqua demineralizzata fino al raggiungimento di un segnale stabile in uscita dal modulo e rilevato dal lettore UV; si inietta il campione nella colonna mediante un opportuno loop pre-caricato con la soluzione di acetone e acqua (il loop scelto possiede una capacità di 100 µL) e si osserva il cromatogramma sull'interfaccia System Control del software Unicorn collegato alla macchina FPLC: il segnale dell'assorbimento aumenta fino ad un massimo, per poi calare e tornare al valore base, descrivendo una curva simile ad una gaussiana.

La stessa prova deve essere ripetuta eliminando le membrane dal modulo, in modo da poter ricavare il contributo dato dai volumi esterni.

#### 4.6.3.2 Il metodo dei momenti

Il metodo dei momenti rappresenta uno strumento teorico che permette di valutare alcune grandezze caratteristiche del supporto cromatografico, come la porosità, ma anche alcuni coefficienti, come il coefficiente di dispersione ed il coefficiente di trasporto di materia. Ai fini della tesi, tale metodo è stato utilizzato per determinare la porosità delle membrane.

Introdotta negli anni '70 [7], nasce principalmente per studiare sistemi cromatografici convenzionali basati sull'utilizzo di resine porose.

E' opportuno introdurre alcune definizioni [7]:

- Il momento di un picco cromatografico (ovvero il momento n-esimo del profilo di concentrazione in uscita da una colonna cromatografica come risposta ad un disturbo ad impulso):

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t) t^n dt$$

- Il momento n-esimo assoluto:

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t) t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt}$$

Per determinare la porosità del mezzo, è sufficiente considerare il momento primo, la cui espressione è la seguente:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon_e \delta_0$$

dove  $L$  è l'altezza della fase stazionaria,  $u$  è la velocità superficiale della fase mobile,  $\varepsilon_e$  rappresenta la porosità esterna della colonna, ovvero la porosità che la colonna avrebbe se la resina non fosse porosa e  $\delta_0$  è un parametro definito dalla seguente equazione:

$$\delta_0 = 1 + \frac{(1-\varepsilon_e)}{\varepsilon_e} (\varepsilon_p + \rho_p K_a)$$

in cui  $\varepsilon_p$  è la porosità del materiale di riempimento,  $\rho_p$  è la densità del materiale di riempimento e  $K_a$  rappresenta la costante di equilibrio di adsorbimento.

Il momento primo dovrebbe rappresentare il tempo di ritenzione del componente iniettato,  $t_r$  [98]. Affinché questa affermazione possa essere considerata vera, è necessario che il picco che

si registra in uscita dalla colonna, in risposta ad un disturbo a gradino, sia il più simile possibile ad una curva gaussiana: è solo in questo caso che il tempo di ritenzione del componente iniettato corrisponde al tempo in cui si raggiunge l'altezza massima del picco.

#### 4.6.3.3 Porosità di supporti cromatografici costituiti da membrane

Il metodo dei momenti descritto nel paragrafo precedente vale per sistemi cromatografici convenzionali basati sull'utilizzo di resine porose; si vuole ora rendere la trattazione fruibile nel caso in cui si utilizzino membrane.

Una membrana porosa può essere vista come una resina priva di pori diffusivi, per cui la porosità delle particelle è nulla e la porosità esterna coincide con la porosità totale della colonna,  $\varepsilon$ . Il contributo derivante dalla diffusione nei pori è assente ed il contributo relativo al trasporto di materia è invece trascurabile, quindi si ottiene una semplificazione delle equazioni precedenti [7].

In formule:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon \left[ 1 + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \rho_m K_a \right]$$

Se si esegue una prova ad impulso con un tracciante che non interagisca con la fase stazionaria  $K_a$  è nullo e l'equazione si semplifica ulteriormente:

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \varepsilon$$

Utilizzando questa relazione, è possibile stimare il grado di vuoto delle membrane. La procedura sperimentale da seguire prevede l'esecuzione di prove ad impulso con un soluto inerte nei confronti della fase stazionaria, per esempio una soluzione di acetone e acqua; poiché lo scopo è determinare il grado di vuoto relativo alle membrane, dovranno essere eseguite prove sia con la colonna cromatografica al completo (contenente quindi le membrane, i frits e gli o-rings) sia con la colonna privata delle membrane, ma contenente comunque i frits e gli o-rings: in questo modo, per differenza, è possibile calcolare il valore del momento primo relativo alle sole membrane.

In formule:

$$\mu_1^{membrane} = \mu_1^{totale} - \mu_1^{sistema} = \frac{L}{u} \varepsilon$$

Dove  $\mu_1^{totale}$  è il valore del momento primo che si ottiene eseguendo prove ad impulso con le membrane nella colonna ed utilizzando la formula  $\mu_1 = \varepsilon L/u$ , mentre  $\mu_1^{sistema}$  è il valore del momento primo relativo al sistema, ottenuto con prove ad impulso escludendo le membrane dalla cella, ed utilizzando la medesima equazione.

Avendo quindi calcolato  $\mu_1^{membrane}$  e conoscendo  $L$  ed  $u$ , si ricava il grado di vuoto  $\varepsilon$ .

I calcoli illustrati devono essere eseguiti con grande attenzione, in quanto è molto facile che si verifichino errori nell'elaborazione dei dati che, anche se piccoli, potrebbero portare a risultati ben lontani dai valori veri. In particolare, grande attenzione deve essere posta al criterio con il quale si decide di integrare i picchi, oltre ad altre considerazioni che verranno discusse nel capitolo 6.

## CAPITOLO 5

# RISULTATI DELLE PROVE SPERIMENTALI IN BATCH

### 5.1 INTRODUZIONE

La prima parte del lavoro di tesi è stata incentrata sullo studio dell'adsorbimento non specifico riscontrato nelle prove con le membrane SartoBind Epoxy modificate con HPTA.

Le problematiche legate a tale fenomeno sono tali da limitare in modo considerevole le prestazioni del processo di purificazione delle immunoglobuline: la formazione di legami fra il supporto ed i contaminanti crea infatti un ostacolo all'adsorbimento delle IgG, che raggiungeranno più difficilmente i siti attivi del ligando. Negli studi precedenti sono state analizzate le possibili cause dell'adsorbimento non specifico, indagando il ruolo del supporto, del ligando, dello spaziatore e dell'agente utilizzato per effettuare l'endcapping dei gruppi epossidici della membrana, traendo la conclusione che la causa principale debba essere ricercata nello spaziatore 2LP [24]. Infatti quest'ultimo introduce gruppi amminici sul supporto, i quali possono dar luogo alla formazione di legami idrogeno con eventuali contaminanti presenti; l'entità del danno provocato da questo fenomeno dipende comunque anche dal tipo di contaminante: la BSA crea legami forti con lo spaziatore e, non solo va ad ostacolare il trasporto delle IgG verso i siti attivi del ligando, ma, restando in parte legata al supporto durante tutto il ciclo cromatografico, crea un impedimento anche al recupero delle immunoglobuline e riduce inevitabilmente i siti attivi disponibili sul ligando nei successivi cicli cromatografici. Discorso diverso va fatto per contaminanti quali il lisozima che, a differenza della BSA, è caratterizzato da una minore tendenza alla formazione di legami idrogeno stabili con i gruppi amminici dello spaziatore e non costituisce la causa principale dei problemi legati al fenomeno dell'adsorbimento non specifico.

Sulla base dei risultati ottenuti nei lavori di ricerca precedenti, la prima parte del lavoro di tesi è stata quindi dedicata allo studio di strategie per risolvere le problematiche evidenziate.

Un primo ciclo cromatografico in batch, è stato eseguito utilizzando le membrane SartoBind Epoxy tal quali, ovvero non modificate in alcun modo, né legando lo spaziatore 2LP né effettuando alcun tipo di endcapping, questo per verificare che non vi sia adsorbimento non specifico legato alle membrane e ai gruppi epossidici.

La prova è stata eseguita su un set costituito da due membrane sottoposte al seguente ciclo cromatografico:

**Tabella 5.1:** *Tamponi usati, volume alimentato e tempi relativi alle varie fasi cromatografiche.*

Fase cromatografica	Tampone	Volume alimentato (mL)	Tempo (h)
Equilibratura	0,1 M PBS pH 7,4	5	0,25
Adsorbimento	*	2	2
Lavaggio	0,1 M PBS pH 7,4	5	1
Eluizione	0,1 M Glicina pH 2,8	2	1

\* Nel caso in esame, le membrane sono state immerse in una soluzione di 0,5 mg/mL BSA 0,1 M PBS pH 7,4.

La tabella 5.1 contiene una descrizione dei tamponi usati per eseguire i cicli cromatografici in batch, dei volumi alimentati e dei tempi relativi a ciascuna fase, e vale per tutte le prove discusse in questo capitolo, salvo poche eccezioni; quello che cambia da prova a prova è il tampone di adsorbimento, che sarà specificato di volta in volta.

Il risultato è perfettamente in accordo con quanto ci si aspettava: la quantità di BSA adsorbita è pari a zero, a conferma del fatto che una delle cause principali dell'adsorbimento non specifico debba essere ricercata proprio nella molecola 2LP. L'analisi parte quindi da un'indagine sull'influenza dello spaziatore in merito a tale problema: si studiano sistemi costituiti da membrane attivate non con l'intero complesso ligando-spaziatore ma unicamente con il 2LP (paragrafo 5.2) e si cerca di definire una strategia per effettuare l'endcapping dei gruppi amminici di quest'ultimo, in modo che non possano formare legami con eventuali contaminanti presenti.

Nei paragrafi successivi, 5.3 e 5.4, verranno illustrati e discussi i risultati delle prove batch con membrane di affinità, attivate quindi con il complesso HPTA-2LP; queste analisi permettono di caratterizzare il supporto cromatografico in termini di capacità di adsorbimento e di recupero delle IgG tramite l'eluizione; tale trattazione permetterà di capire se i processi di cromatografia di affinità con le membrane in esame, ed i relativi protocolli di modifica, possono essere

considerati validi candidati fra le alternative alla cromatografia convenzionale con proteina A e permetterà inoltre di ottenere informazioni su eventuali miglioramenti da apportare al processo di purificazione.

## 5.2 STUDIO DELL' ADSORBIMENTO NON SPECIFICO

### 5.2.1 Acetaldeide

Per determinare le cause dell'adsorbimento non specifico dovuto allo spaziatore, sono state eseguite prove su membrane preparate legando solo lo spaziatore (2LP) e valutando varie strategie di endcapping:

- Endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo (set ME);
- Endcapping dei gruppi amminici dello spaziatore con acetaldeide e successivo endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo (set AC-ME);
- Endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo e successivo endcapping dei gruppi amminici con acetaldeide (set ME-AC).

L'endcapping dei gruppi  $-NH_2$  ha lo scopo di evitare che i contaminanti possano formare legami idrogeno stabili con tali gruppi ed ostacolare l'adsorbimento di IgG.

Le procedure relative al protocollo di immobilizzazione dello spaziatore alle membrane e ai protocolli di endcapping dei gruppi epossidici e dei gruppi amminici sono mostrate nelle seguenti tabelle:

**Tabella 5.2:** Protocollo di immobilizzazione dello spaziatore 2LP alle membrane.

Temperatura ( $^{\circ}C$ )	50
Tempo (h)	15,40
Membrane	2
Area ( $cm^2$ )	7,069
$\rho_{epoxy}$ ( $mol/cm^2$ )	1,50E-06
$n_{epoxy}$ (mol)	1,06E-05
$n_{2LP}/n_{epoxy}$	10



**Tabella 5.3:** Protocollo di endcapping dei gruppi epossidici eseguito con  $\beta$ -mercaptoetanololo.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	50
Tempo (h)	15
Membrane	2
Area ( $\text{cm}^2$ )	7,069
$\rho_{\text{epoxy}}$ ( $\text{mol}/\text{cm}^2$ )	1,50E-06
$n_{\text{epoxy}}$ (mol)	1,06E-05
$n_{\beta\text{-ME}}/n_{\text{epoxy}}$	5

**Tabella 5.4:** Protocollo di endcapping dei gruppi amminici eseguito con acetaldeide.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	4
Tempo (h)	20
Membrane	2
Area ( $\text{cm}^2$ )	7,069
$\rho_{\text{epoxy}}$ ( $\text{mol}/\text{cm}^2$ )	1,50E-06
$n_{\text{epoxy}}$ (mol)	1,06E-05
$n_{\text{C}_2\text{H}_4\text{O}}/n_{\text{epoxy}}$	10

Utilizzando le procedure mostrate, si calcolano le quantità di spaziatore, di  $\beta$ -mercaptoetanololo e di acetaldeide da mettere in 2 mL di etanolo per ogni set di membrane.

Ognuno dei tre protocolli appena illustrato, è seguito da una fase di lavaggio; le modalità da seguire per svolgere questa parte della procedura relativa alla modifica delle membrane sono state definite attraverso una ricerca precedente a questo lavoro di tesi: sono state provate diverse strategie di lavaggio ed è stato identificato il protocollo migliore in termini di capacità di adsorbimento delle proteine di interesse da parte del supporto cromatografico; in particolare, sono stati evidenziati i vantaggi che si ottengono aggiungendo un lavaggio finale in una soluzione di glicina, oltre ai lavaggi in acqua demineralizzata e in etanolo, ed i vantaggi legati all'utilizzo di un sonicatore (solo per i lavaggi che seguono le procedure di endcapping): in

questo modo, il ligando che non si è legato alle membrane e le molecole utilizzate per effettuare l'endcapping vengono rimosse più facilmente dal supporto [24].

Di seguito si riportano le tabelle contenenti le procedure seguite per effettuare i lavaggi relativi ad ogni stadio:

**Tabella 5.5:** Lavaggi effettuati dopo il protocollo di immobilizzazione dello spaziatore alle membrane, utilizzando un agitatore basculante.

Solvente	Tempo (min)
Etanolo	30
Acqua demineralizzata	30
Etanolo	30
Acqua demineralizzata	30

**Tabella 5.6:** Lavaggi effettuati dopo i protocolli di endcapping, utilizzando un sonicatore.

Solvente	Tempo (min)
Etanolo	30
Acqua demineralizzata	30
Etanolo	30
Acqua demineralizzata	30
Glicina 0,1 M pH 2,8	30

Il lavaggio con la glicina va effettuato alla fine di tutti i lavaggi e, quindi, per ogni set di membrane, verrà usata la glicina solo alla fine del secondo protocollo di endcapping, indipendentemente che si tratti dell'endcapping dei gruppi amminici o dell'endcapping dei gruppi epossidici.

A questo punto le membrane sono pronte per essere utilizzate.

In totale sono stati studiati sei set, tre con la BSA e tre con il lisozima, essendo ogni set costituito da due membrane.

I tamponi usati, il volume alimentato ed i tempi relativi ai vari stadi del ciclo cromatografico eseguito in batch sono riassunti in tabella 5.1, con la precisazione che, in questo caso, il tampone

di adsorbimento è costituito da una soluzione di 0,5 mg/mL BSA 0,1 M PBS pH 7,4 oppure da una soluzione di 0,5 mg/mL lisozima 0,1 M PBS pH 7,4.

Sono stati riscontrati dei problemi con l'utilizzo dell'acetaldeide: essendo molto volatile (punto di ebollizione pari a 20,2 °C), la reazione è stata fatta avvenire alla temperatura di 4°C e non c'è la certezza di aver effettivamente legato tutti i gruppi amminici. Infatti, come dimostrano i risultati delle prove, continua ad essere presente adsorbimento non specifico di BSA e di lisozima anche effettuando l'endcapping dei gruppi -NH<sub>2</sub>.

I risultati ottenuti con soluzione iniziale di 0,5 mg/mL BSA 0,1 M PBS pH 7,4 e con soluzione di lisozima alla stessa concentrazione sono mostrati nelle seguenti tabelle:

**Tabella 5.7:** Risultati prove batch per soluzione pura di 0,5 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	q (mg/mL)
ME	I	1,056
	II	0,944
	III	0,716
ME-AC	I	2,055
	II	0,821
	III	0,772
AC-ME	I	0,892
	II	1,335
	III	0,410

**Tabella 5.8:** Risultati prove batch per soluzione pura di 0,5 mg/mL lisozima in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	q (mg/mL)
ME	I	0,663
	II	0,732
	III	0,072
ME-AC	I	0,723
	II	0,480
	III	0,471
AC-ME	I	0,407
	II	0,507
	III	0,026

Analizzando le quantità di BSA e di lisozima adsorbite, non si osserva una riduzione significativa da attribuire alla reticolazione dei gruppi amminici; anzi, nel caso in cui l'endcapping dei gruppi epossidici è stato effettuato prima rispetto all'endcapping dei gruppi amminici (set ME-AC), sembra addirittura esserci un peggioramento in termini di adsorbimento non specifico, rispetto al set ME. Per il set AC-ME non si ottiene un miglioramento significativo.

A parità di concentrazione iniziale, si osserva come la quantità di lisozima adsorbita dal supporto sia pari a circa il 50% in meno rispetto ai valori di BSA adsorbita: il lisozima influenza in misura minore il comportamento del supporto cromatografico rispetto all'albumina e questo comportamento è una conseguenza della maggiore affinità di quest'ultima nei confronti dello spaziatore con conseguente formazione di legami idrogeno stabili [24].

In conclusione, è possibile che la strategia di endcapping dei gruppi amminici non sia quella corretta e si è deciso di provare ad utilizzare acetone al posto dell'acetaldeide, avendo il vantaggio di maneggiare una sostanza meno volatile e la possibilità di far avvenire la reazione a temperature più elevate (fino a 40°C).

## 5.2.2 Acetone

E' stato deciso di proseguire lo studio utilizzando una soluzione iniziale di 0,5 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4, e di lasciare da parte il lisozima.

Sono state quindi valutate varie strategie di endcapping delle membrane legate allo spaziatore utilizzando acetone:

- Endcapping dei gruppi amminici dello spaziatore con acetone e successivo endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo;
- Endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo e successivo endcapping dei gruppi amminici con acetone;
- Endcapping dei gruppi epossidici ed amminici fatti avvenire contemporaneamente.

Il protocollo di immobilizzazione dello spaziatore alle membrane ed il protocollo di endcapping dei gruppi epossidici sono gli stessi già descritti nel paragrafo precedente.

La procedura relativa all'endcapping dei gruppi amminici è invece illustrata nella seguente tabella:

**Tabella 5.9:** Protocollo di endcapping dei gruppi amminici eseguito con acetone.

Temperatura (°C)	40
Tempo (h)	20
Membrane	2
Area (cm <sup>2</sup> )	7,069
$\rho_{\text{epoxy}}$ (mol/cm <sup>2</sup> )	1,50E-06
$n_{\text{epoxy}}$ (mol)	1,06E-05
$n_{\text{C3H6O}}/n_{\text{epoxy}}$	10

Quando i due endcapping sono stati eseguiti contemporaneamente, la temperatura è stata impostata a 40 °C, per un tempo di 20 ore.

Terminate le procedure di modifica ed effettuati i lavaggi, i tre set sono stati sottoposti a tre cicli cromatografici successivi, come illustrato in tabella 5.1.

Anche in questo caso, purtroppo, i risultati non sono soddisfacenti: non si evidenzia alcun miglioramento in termini di adsorbimento non specifico, indipendentemente dall'ordine in cui sono stati eseguiti gli endcapping: per il set in cui le reazioni di reticolazione sono state effettuate contemporaneamente, si ottiene un valore di massa adsorbita, per il ciclo I, pari a 1,559 mg/mL, e anche per gli altri due set non si ottengono esiti soddisfacenti. Per questo motivo, la tabella relativa ai risultati non viene riportata.

Si osserva comunque che il procedimento scelto per coprire i gruppi  $-NH_2$  è stato eseguito basandosi sul protocollo di endcapping dei gruppi epossidici, ovvero mettendo in etanolo una precisa quantità di acetone (calcolata in modo che fosse in eccesso rispetto alla quantità stechiometrica, come mostrato in tabella 5.9).

Si è deciso di provare una nuova strategia, che consiste nel lasciare le membrane a bagno in solo acetone: il protocollo è quello illustrato nella tabella 5.9, con la differenza che, in questo caso, non si procede con il calcolo del numero di moli di acetone,  $n_{C_3H_6O}$ , ma si lasciano le membrane in acetone puro a 40°C per circa venti ore.

Dopo aver legato lo spaziatore alle membrane, sono state quindi valutate le seguenti procedure:

- Endcapping dei gruppi amminici dello spaziatore con acetone e successivo endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo (set A-M)
- Endcapping dei gruppi epossidici con  $\beta$ -mercaptoetanololo e successivo endcapping dei gruppi amminici con acetone (set M-A)

Le prove sono state eseguite solo con 0,5 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4 secondo lo schema riportato in tabella 5.1.

Una prima prova è stata eseguita con un solo set di membrane (A-M), ottenendo i seguenti risultati:

**Tabella 5.10:** Risultati prove batch per soluzione pura di 0,5 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	q (mg/mL)
A-M	I	0,612
	II	0

I valori di quantità adsorbita ottenuti sembrano soddisfacenti: per il primo ciclo cromatografico, si osserva una riduzione nell'adsorbimento non specifico di BSA di circa il 40% rispetto al caso in cui l'endcapping dei gruppi amminici non venga effettuato.

Per avere una conferma del risultato ottenuto, si esegue una seconda prova analoga alla precedente (set A-M), più una prova in cui si effettua prima l'endcapping dei gruppi epossidici e poi quello dei gruppi amminici (set M-A).

La tabella seguente illustra i risultati ottenuti:

**Tabella 5.11:** Risultati prove batch per soluzione pura di 0,5 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	q (mg/mL)
A-M	I	0,726
	II	0,683
M-A	I	1,345
	II	0,813

Da un confronto fra questi dati e i valori di capacità di adsorbimento ottenuti per il set ME (tabella 5.7), si ottiene quindi la conferma che questo tipo di strategia possa portare ad un calo nell'adsorbimento di BSA, ma con risultati soddisfacenti solo per il caso in cui venga eseguito prima l'endcapping dei gruppi amminici e poi l'endcapping dei gruppi epossidici: per il set M-A non si evidenzia alcun miglioramento.

Per avere un'ulteriore conferma della validità di questa procedura seguita per limitare il fenomeno dell'adsorbimento non specifico, si dovranno effettuare prove con miscele di IgG e contaminanti, e verificare che effettivamente la quantità adsorbita di questi ultimi cali rispetto al caso in cui non venga eseguito l'endcapping dei gruppi amminici.

Osservando i risultati ottenuti nel paragrafo 5.2, è possibile fare un'ultima osservazione: in ogni caso esaminato, i valori di quantità adsorbita di contaminante da parte del supporto cromatografico cala da un ciclo al successivo; questo comportamento può essere spiegato considerando la formazione di legami irreversibili fra la BSA ed i gruppi amminici dello spaziatore, che porta inevitabilmente ad una riduzione dei siti di legame disponibili da un ciclo al consecutivo.

### 5.3 PROVE BATCH CON MEMBRANE DI AFFINITA': SOLUZIONI PURE

I risultati fino ad ora esposti avevano lo scopo di studiare il fenomeno dell'adsorbimento non specifico legato allo spaziatore, quindi sono stati ottenuti svolgendo prove con membrane legate unicamente alla molecola 2LP; in questo paragrafo si discuteranno le prove batch effettuate con membrane attivate con il complesso HPTA-2LP e successivo endcapping dei gruppi epossidici, con lo scopo di caratterizzare tale supporto in termini di capacità di adsorbimento della proteina di interesse e di efficienza nella fase di eluizione.

Il protocollo di immobilizzazione del complesso HPTA-2LP è illustrato nella seguente tabella:

*Tabella 5.12: Protocollo di immobilizzazione del complesso 2LP-HPTA alle membrane.*

Temperatura (°C)	50
Tempo (h)	16,50
Membrane	1
Area (cm <sup>2</sup> )	3,534
$\rho_{\text{epoxy}}$ (mol/cm <sup>2</sup> )	1,50E-06
$n_{\text{epoxy}}$ (mol)	5,30E-06
$n_{\text{HPTA-2LP}}/n_{\text{epoxy}}$	9

In questo modo si ottiene la quantità di ligando da sciogliere in 4 mL di etanolo per ogni membrana.

Terminata la fase di immobilizzazione del complesso alle membrane, si effettuano i lavaggi e si procede con il protocollo di endcapping dei gruppi epossidici, come illustrato nei paragrafi precedenti, al termine del quale si ripetono i lavaggi.

Le membrane sono state caratterizzate con una soluzione di 0,5 mg/mL IgG in 0,1 M PBS pH 7,4; sono stati sottoposti al ciclo cromatografico in batch due set di membrane, uno dei quali però era già stato utilizzato in precedenti cicli cromatografici eseguiti in condizioni dinamiche utilizzando l'FPLC, prove non portate a termine per problemi legati al sistema sperimentale; questo significa che la capacità di adsorbimento di queste membrane sarà ovviamente ridotta rispetto a quella di supporti non ancora utilizzati.



I tamponi usati, il volume alimentato ed i tempi relativi ai vari stadi del ciclo cromatografico eseguito in batch sono riassunti in tabella 5.1, con la precisazione che, in questo caso, il tampone di adsorbimento è costituito da una soluzione di 0,5 mg/mL IgG 0,1 M PBS pH 7,4.

Con il set di membrane già usate il valore della quantità di immunoglobuline adsorbite sul supporto è risultato pari a 0,606 mg/mL, e non sono stati eseguiti ulteriori cicli cromatografici.

L'altro set è invece stato sottoposto a tre cicli cromatografici successivi, portando ai risultati mostrati nella tabella che segue:

**Tabella 5.13:** Risultati prove batch per soluzione pura di 0,5 mg/mL IgG in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	q (mg/mL)	Recupero (%)
IgG	I	2,202	62,62
	II	1,403	76,48
	III	1,091	71,63

Confrontando questi valori con il valore di 0,606 mg/mL, si evidenzia un grande calo (circa il 72%) della capacità adsorbente del supporto nei confronti delle IgG da parte del set di membrane precedentemente utilizzate all'FPLC: alcuni dei siti attivi del ligando potrebbero infatti aver perso la loro funzionalità o essersi saturati nelle prove condotte in condizioni dinamiche.

Si osserva inoltre che il valore di recupero delle IgG in fase di eluizione è pari a circa il 70%, in accordo con i risultati ottenuti su prove analoghe in un precedente lavoro di tesi [24], mentre la quantità di IgG adsorbita diminuisce da un ciclo al successivo, in parte a causa della formazione di legami irreversibili ed in parte a causa dei valori di rendimento in fase di eluizione che dovrebbero essere migliorati. Dal primo al secondo ciclo, la capacità di adsorbimento, q, mostra un calo del 36%, mentre dal secondo al terzo ciclo q diminuisce del 22%: quindi, passando dal primo al terzo ciclo, la capacità di adsorbimento si riduce della metà.

Comunque, per trarre conclusioni sulle caratteristiche del supporto cromatografico in esame, bisogna studiarne il comportamento quando si utilizzano miscele.

## 5.4 PROVE BATCH CON MEMBRANE DI AFFINITA': MISCELE

Con le miscele sono state effettuate prove utilizzando membrane SartoBind Epoxy attivate con il complesso HPTA-2LP e sottoposte al protocollo di endcapping dei gruppi epossidici, senza endcapping dei gruppi amminici. Per testare la validità della strategia, precedentemente discussa, mirata alla soluzione del problema dell'adsorbimento non specifico, si dovrebbero ripetere le prove con le miscele utilizzando le membrane attivate con il complesso HPTA-2LP e sottoposte, non solo ad endcapping dei gruppi epossidici, ma anche ad endcapping dei gruppi amminici.

Sono state preparate miscele binarie contenenti le IgG da purificare e la BSA come contaminante, oltre a cicli cromatografici in cui è stato utilizzato siero umano come soluzione iniziale. Il siero umano contiene circa 60-70 mg/mL di proteine totali, fra le quali si trovano anche le IgG, ad una concentrazione di circa 15 mg/mL; prima di essere utilizzato nelle prove, il siero è stato diluito (rapporto 1:10) utilizzando 0,1 M PBS pH 7,4.

E' bene fare alcune precisazioni sui metodi utilizzati per l'elaborazione dei dati ottenuti nelle prove, sia con le miscele binarie sia con il siero. L'analisi dei campioni è stata eseguita tramite un HPLC e, in particolare, sono state utilizzate sia la colonna proteina A che la colonna SEC, secondo le metodologie descritte nel paragrafo 4.3.4. Le aree dei picchi relativi ai cromatogrammi che si ottengono mediante le analisi con la colonna proteina A permettono di determinare il quantitativo di IgG contenuto in ogni campione, avvalendosi di un'opportuna retta di taratura per effettuare la conversione area-assorbanza (si veda l'Appendice A). Le analisi effettuate con la colonna SEC, invece, forniscono un'area totale in cui i picchi relativi alle immunoglobuline e alla BSA (o alle immunoglobuline e agli altri contaminanti presenti nel siero) risultano parzialmente sovrapposti. La procedura scelta per determinare le singole quantità di IgG e BSA (o impurezze totali nel caso del siero) prevede che si parta da un valore "noto" di massa totale di proteina presente nel tampone di alimentazione, valore che corrisponderà esattamente all'area totale sottesa alla curva nel cromatogramma SEC relativo al campione di alimentazione in esame; impostando quindi una proporzione area-massa, sarà possibile calcolare la massa totale di proteine presenti in ogni campione. Eseguendo la differenza fra la massa totale e la massa di IgG ottenuta mediante le analisi con la colonna proteina A, si ricava la massa di contaminanti e, quindi, tutti i parametri necessari per la caratterizzazione del supporto cromatografico, come descritto nel paragrafo 4.5.

Prima di eseguire i calcoli, bisogna determinare il valore “noto” di massa totale di proteina in alimentazione da cui partire. A questo fine, durante il lavoro di tesi sono state considerate due possibili strade: un calcolo di tipo teorico ed un calcolo basato sull’analisi dei campioni con un metodo colorimetrico. Se si procede mediante un calcolo di tipo teorico, la massa totale di proteine nella soluzione iniziale, per il caso di miscela binaria, viene calcolata come prodotto fra la concentrazione teorica ed il volume della soluzione, ignorando possibili errori sperimentali che potrebbero essere stati commessi durante la preparazione delle soluzioni; per le prove con il siero si dovrebbe invece prendere un valore di concentrazione totale reperibile dal fornitore o da dati di letteratura. La massa totale di proteina può essere determinata anche con un metodo colorimetrico: in particolare, sono stati eseguiti sia il saggio di Bradford sia il saggio del BCA, ma le elaborazioni sono state eseguite considerando solo i risultati di questo secondo metodo, ritenuto più preciso ed affidabile.

Bisogna considerare che le analisi sono state eseguite due mesi dopo le prove, periodo durante il quale i campioni sono stati mantenuti in freezer ad una temperatura di  $-18^{\circ}\text{C}$ ; inoltre, sono stati scongelati e ricongelati un paio di volte prima dell’esecuzione del test del BCA, quindi, i risultati ottenuti potrebbero sottostimare la massa reale contenuta nei campioni.

Avendo a disposizione siero umano appena acquistato dall’azienda Sigma Aldrich, si è deciso di quantificarne il contenuto totale di proteine mediante il saggio del BCA, in modo da riuscire a stimare l’entità della diminuzione del contenuto proteico dei campioni dovuta al tempo ed ai cambiamenti di temperatura; in realtà, però, l’informazione che si ottiene, si riferisce al calo di concentrazione proteica da un siero mai utilizzato e scongelato una sola volta ad un siero scongelato e ricongelato un numero di volte che non possiamo definire, a partire da un tempo precedente a questo lavoro di tesi.

La scelta è stata quella di considerare, come massa totale di proteina iniziale, quella teorica nel caso delle miscele binarie e quella ottenuta mediante il saggio del BCA per le prove con il siero.

#### 5.4.1 Miscela binaria: 0,5 mg/mL IgG – 0,25 mg/mL BSA

Con la miscela binaria di 0,5 mg/mL IgG e 0,25 mg/mL BSA, sono state effettuate prove utilizzando un set di due membrane attivate con il complesso HPTA-2LP e successivo

endcapping dei gruppi epossidici (set HPTA 02\_0.25), ed un secondo set di tre membrane già utilizzate in cicli cromatografici in condizioni dinamiche (set HPTA 01\_0.25).

Per il set HPTA 02\_0.25, le caratteristiche relative ad ogni fase del ciclo cromatografico sono riportate in tabella 5.1; in questo caso il tampone di adsorbimento è costituito da una miscela binaria di 0,5 mg/mL IgG e 0,25 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4.

Le caratteristiche delle fasi del ciclo cromatografico per il set HPTA 01\_0.25 sono riportate nella seguente tabella:

**Tabella 5.14:** Tamponi usati, volume alimentato e tempi relativi alle varie fasi cromatografiche per il set HPTA 01\_0.25.

Fase cromatografica	Tampone	Volume alimentato (mL)	Tempo (h)
Equilibratura	0,1 M PBS pH 7,4	5	0,25
Adsorbimento	Miscela di 0,5 mg/mL IgG e 0,25 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4	3	2
Lavaggio	0,1 M PBS pH 7,4	7,5	1
Eluizione	0,1 M Glicina pH 2,8	3	1

Per completezza si riportano i risultati ottenuti con entrambi i set, ma le membrane del set HPTA 01\_0.25, come già evidenziato, possono fornire informazioni solo a livello qualitativo.

**Tabella 5.15:** Risultati prove batch per la miscela binaria di 0,5 mg/mL IgG e 0,25 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	IgG		BSA	
		q (mg/mL)	Recupero (%)	q (mg/mL)	Recupero (%)
HPTA 02_0.25	I	1,225	38,35	0,702	0
	I	0,972	42,43	0,398	0
	III	0,656	33,94	0,515	2,52
HPTA 01_0.25	I	0,388	0	0,233	0

Confrontando tali valori con quelli ottenuti nelle prove con soluzione di IgG pura, si nota che la capacità di adsorbimento risulta ora ridotta del 30-40% e anche i valori di recupero di IgG in fase di eluizione sono notevolmente calati, diminuendo dal 70% al 30-40%. Questi dati mettono

in evidenza la competizione fra immunoglobulina e contaminante per i siti di legame del ligando, oltre agli inconvenienti relativi all'adsorbimento non specifico.

#### 5.4.2 Miscela binaria: 0,5 mg/mL IgG – 0,75 mg/mL BSA

Con la miscela binaria di 0,5 mg/mL IgG e 0,75 mg/mL BSA, sono state effettuate prove utilizzando un set di due membrane attivate con il complesso HPTA-2LP e successivo endcapping dei gruppi epossidici, secondo le procedure descritte nel paragrafo 5.3.

Le caratteristiche di ogni fase del ciclo cromatografico sono analoghe a quelle descritte nel paragrafo precedente, con la differenza che in questo caso la concentrazione di BSA in alimentazione è di 0,75 mg/mL; i risultati ottenuti sono illustrati di seguito:

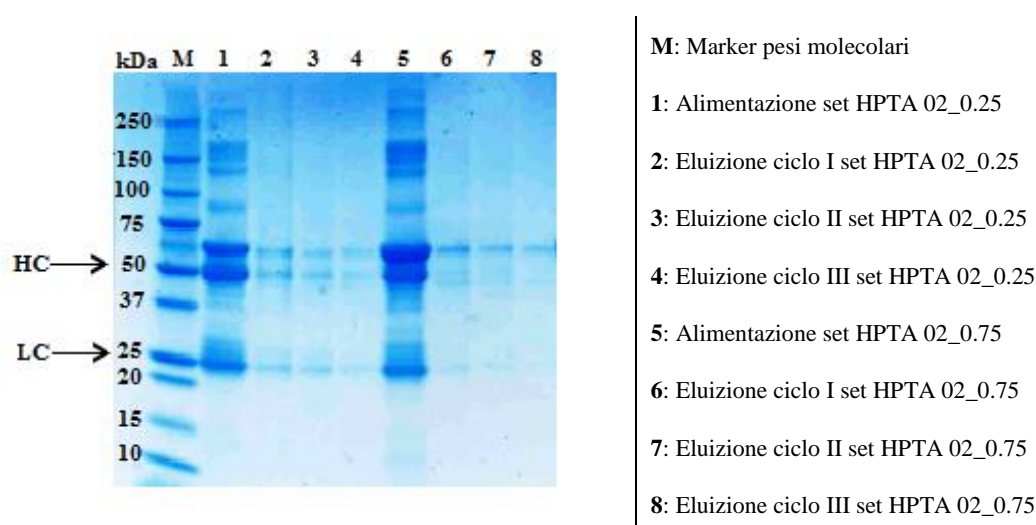
**Tabella 5.16:** Risultati prove batch per la miscela binaria di 0,5 mg/mL IgG e 0,75 mg/mL BSA in 0,1 M PBS pH 7.4.

Set	Ciclo Cromatografico	IgG		BSA	
		q (mg/mL)	Recupero (%)	q (mg/mL)	Recupero (%)
HPTA 02_0.75	I	1,006	20,60	1,019	2,98
	I	0,359	44,52	1,754	15,55
	III	0,323	26,76	0,626	8,35

Rispetto al caso in cui la concentrazione di BSA era pari a 0,25 mg/mL, ora si evidenzia un calo in termini di quantità di IgG adsorbita da parte del supporto, a favore di un aumento dell'adsorbimento di contaminante; anche la quantità di immunoglobulina recuperata in fase di eluizione mostra una leggera diminuzione. Considerando i tre cicli cromatografici successivi illustrati nella tabella 5.16, è evidente una diminuzione considerevole dell'adsorbimento delle IgG passando dal primo al secondo ciclo: se la BSA si lega irreversibilmente al supporto, le IgG faranno fatica a trovare siti attivi disponibili e a raggiungerli.

I campioni relativi all'alimentazione e alle eluizioni ottenuti nelle prove con le miscele binarie sono stati analizzati qualitativamente mediante il metodo dell'elettroforesi; per rendere più evidenti le bande nei campioni di eluizione, le soluzioni sono state concentrate utilizzando filtri da ultrafiltrazione ed una centrifuga: il volume è stato ridotto di 3,3 volte.

I risultati ottenuti sono mostrati nella seguente immagine:



**Figura 5.1:** Risultati dell'elettroforesi sui campioni di alimentazione e di eluizione per le prove con miscele binarie.

Analizzando i risultati ottenuti mediante la tecnica qualitativa dell'elettroforesi, si nota che le immunoglobuline sono presenti in tutti i campioni: le bande relative alla catena pesante (HC, 50 kDa) e alla catena leggera (LC, 25 kDa) sono evidenti, oltre che nei campioni di alimentazione, anche nelle eluizioni di ognuno dei tre cicli cromatografici successivi, eseguiti con i due set di membrane HPTA 02\_0.25 e HPTA 02\_0.75; si osserva comunque che l'intensità della colorazione della banda, e quindi la relativa quantità proteica, diminuisce gradualmente passando dalla prima alla terza eluizione e che le bande sono complessivamente più evidenti nei campioni ottenuti dalle prove con il set HPTA 02\_0.25, a conferma dei risultati illustrati nelle tabelle 5.15 e 5.16. In corrispondenza di un peso molecolare pari a circa 65-70 kDa, si osserva un'ulteriore banda: è quella relativa all'albumina. Questa proteina è presente nei campioni di alimentazione di entrambi i set studiati, ma la banda è maggiormente evidente nel campione del set HPTA 02\_0.75, che infatti ne contiene una maggiore quantità rispetto al set HPTA 02\_0.25. E' molto ben evidente la presenza della BSA anche nei campioni di eluizione, con una colorazione delle bande che cala gradualmente passando dalla prima alla terza eluizione. Si nota infine che la BSA sembra essere la proteina presente in maggiore quantità nei campioni di eluizione del set HPTA 02\_0.75, mentre nei campioni ottenuti dalle prove con il set HPTA 02\_0.25 le intensità delle bande relative alle IgG ed alla BSA sono paragonabili: la quantità di proteina da purificare e la quantità di contaminante sono simili nei campioni di eluizione. Questo sembra in contrasto con i bassi valori di recupero della BSA rispetto ai valori di recupero delle immunoglobuline riportati nelle tabelle 5.15 e 5.16.

A tal proposito è necessario fare alcune precisazioni: innanzitutto, bisogna considerare che l'elettroforesi è stata eseguita su campioni concentrati, mentre le analisi all'HPLC sono state eseguite sui campioni tal quali; inoltre, i dati di recupero delle IgG sono stati ottenuti mediante analisi con la colonna proteina A, mentre la quantificazione totale del contenuto proteico dei campioni di eluizione è stata eseguita tramite analisi con la colonna SEC e sono stati riscontrati dei problemi nella determinazione delle aree sottese ai picchi ottenuti nel cromatogramma. Oltre a queste considerazioni, si noti che, mentre le analisi con la colonna proteina A sono molto affidabili, le analisi con la SEC non sono altrettanto accurate, in quanto i picchi non sono ben risolti. Per questi motivi, è possibile che vi sia stata una sottostima del valore di recupero della BSA nei campioni di eluizione, come dimostrano i risultati ottenuti mediante l'analisi qualitativa eseguita con la tecnica dell'elettroforesi, in cui le bande relative alla BSA nei campioni di eluizione sono ben visibili e paragonabili per intensità alle bande che rappresentano le IgG.

### 5.4.3 Siero

Con il siero sono state effettuate prove utilizzando due set (HPTA 02\_HS01 e HPTA 02\_HS02), ognuno composto da due membrane attivate con il complesso HPTA-2LP e successivo endcapping dei gruppi epossidici.

Le caratteristiche relative ad ogni fase del ciclo cromatografico sono riportate in tabella 5.1; in questo caso il tampone di adsorbimento è costituito da siero umano diluito 1:10 in 0,1 M PBS pH 7,4. Ogni set è stato sottoposto a tre cicli cromatografici successivi.

Come anticipato all'inizio del paragrafo 5.4, il quantitativo totale di proteina presente nei campioni è stato determinato mediante il metodo colorimetrico del BCA ed è possibile che le quantità proteiche siano leggermente sottostimate. Infatti, l'analisi di un campione di siero umano appena acquistato, ha permesso di determinarne il contenuto proteico totale, pari a circa 57 mg/mL, mentre le analisi sui campioni di alimentazione utilizzati per le prove mostrano una riduzione, in termini di quantità proteica, pari al 61% rispetto al valore di 57 mg/mL. Ciò significa che i successivi congelamenti e scongelamenti influiscono in modo significativo su questo importante dato. I campioni ottenuti dalle prove son il siero, prima di essere analizzati con il saggio del BCA, sono stati conservati due mesi in freezer, scongelati e ricongelati due volte: vi sarà quindi stata sicuramente una riduzione, dovuta alla precipitazione, in termini di quantitativo proteico totale, ma non paragonabile ad un valore del 61%. E' stato quindi ritenuto

opportuno utilizzare tal quali i dati ottenuti mediante le analisi dei campioni con il metodo del BCA, senza definire un fattore moltiplicativo per tener conto di un'eventuale calo nel quantitativo proteico, con la precisazione che potrebbe esserci una leggera sottostima dei risultati.

La curva di calibrazione ricavata utilizzando albumina di siero bovino è riportata in Appendice A. Di seguito si illustrano i risultati ottenuti.

**Tabella 5.17:** Risultati delle analisi sui campioni relativi alle prove con il siero eseguita con il saggio del BCA: concentrazioni iniziali ( $c_{in}$ ) per due set di membrane (HPTA 02\_HS01 e HPTA 02\_HS02). Diluizione dei campioni 1:10.

$c_{in\_HS01}$ (mg/mL)	$c_{in\_HS02}$ (mg/mL)
2,030	2,105

Da questa analisi emerge che la concentrazione totale di proteine nel siero usato nelle prove è poco maggiore di 20 mg/mL, valore di gran lunga inferiore a 57 mg/mL.

Comunque è importante ricordare che i risultati ottenuti con questo saggio colorimetrico costituiscono valori indicativi del quantitativo proteico totale; infatti, per ricavare la curva di calibrazione viene utilizzata BSA, come specificato in letteratura e nelle istruzioni contenute nel Pierce™ BCA Protein Assay Kit [96], ma i campioni analizzati sono miscele anche complesse e non soluzioni pure.

Utilizzando i dati ottenuti con il metodo del BCA e seguendo le procedure descritte nel paragrafo 4.3.3.2 e nel paragrafo 4.5, sono state calcolate le capacità di adsorbimento ed il recupero per i due set di membrane HPTA 02\_HS01 e HPTA 02\_HS02; i risultati ottenuti sono illustrati nella seguente tabella:



**Tabella 5.18:** Risultati prove batch con il siero umano in 0,1 M PBS pH 7,4.

Set	Ciclo Cromatografico	IgG		Impurezze
		q (mg/mL)	Recupero (%)	q (mg/mL)
HPTA 02_HS01	I	0,142	70,63	1,089
	I	0,086	93,84	2,225
	III	0,176	34,58	2,155
HPTA 02_HS02	I	0,037	100	1,192
	II	0,058	100	1,441
	III	0,169	36,58	3,835

La quantità di IgG adsorbita è inferiore rispetto ai valori che si ottengono nel caso di miscele binarie IgG-BSA: considerando un valore pari a 0,14 mg/mL per il primo ciclo nelle prove con il siero, la riduzione rispetto alle miscele binarie è pari circa all'88%. Si osserva inoltre un aumento della quantità di IgG adsorbita sul supporto nel terzo ciclo per entrambi i set, contrariamente a quanto ci si aspetterebbe.

I valori di recupero delle immunoglobuline sono alti e paragonabili nei primi due cicli, ed in particolare sono maggiori rispetto ai valori ottenuti nel caso di miscele binarie

Con il terzo ciclo si verifica un calo del recupero di IgG, fino ad arrivare ad un valore del 35% per entrambi i set.

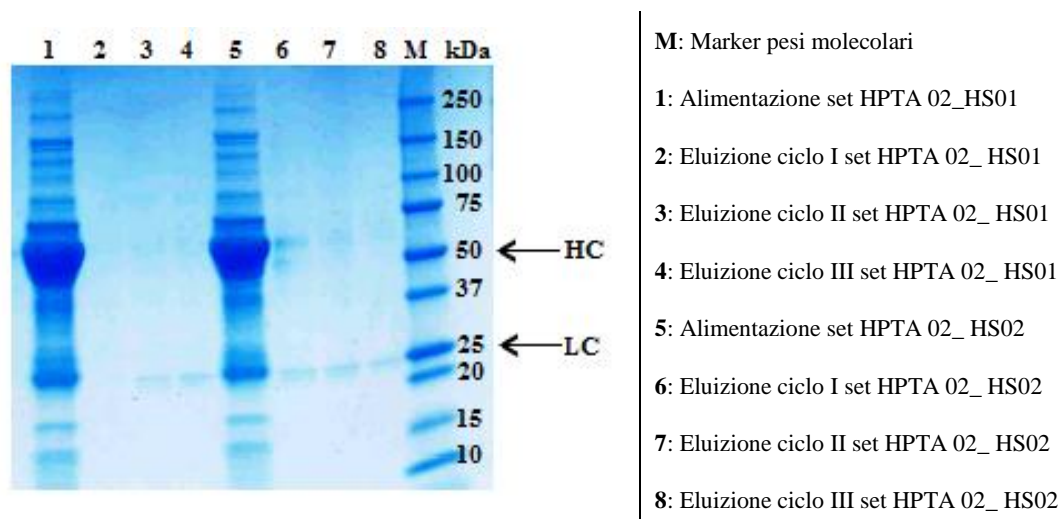
Le quantità di impurezze adsorbite, variano molto da set a set e, all'interno di ogni set, da ciclo a ciclo, mostrando un comportamento strano: si verifica infatti un aumento della quantità adsorbita nei cicli successivi al primo, fino ad arrivare ad un valore pari a 2,2 mg/mL per il set HS01 e ad un valore di 3,8 mg/mL per il set HS02.

Il recupero delle impurezze è caratterizzato da valori sempre molto bassi e prossimi allo zero.

I campioni relativi all'alimentazione ed alle eluizioni ottenuti in queste prove sono stati analizzati qualitativamente mediante il metodo dell'elettroforesi; come per le miscele binarie, anche in questo caso le soluzioni sono state concentrate utilizzando filtri da ultrafiltrazione ed una centrifuga: il volume è stato ridotto di 3,2 volte. Questo passaggio è necessario per rendere più evidenti le bande che si formano sul gel, in quanto le concentrazioni dei campioni ottenuti

dalle eluizioni sono talmente basse che sarebbe difficile identificare le molecole in essi contenute.

I risultati ottenuti sono mostrati nella seguente immagine:



*Figura 5.2: Risultati dell'elettroforesi sui campioni di alimentazione e di eluizione per le prove con il siero umano.*

Analizzando i risultati ottenuti mediante la tecnica qualitativa dell'elettroforesi, si nota che le immunoglobuline sono presenti nei due campioni di alimentazione, in cui le bande relative alla catena leggera (LC, 25 kDa) e alla catena pesante (HC, 50 kDa) sono ben evidenti, ma anche nei campioni relativi alle eluizioni; in questo caso, le bande relative alla catena leggera sono evidenti, ma le bande relative alla catena pesante sono difficili da identificare. Va sottolineato che le analisi all'elettroforesi sono state svolte dopo aver tenuto i campioni in congelatore per un periodo di due mesi, durante il quale sono stati scongelati e ricongelati una volta, è quindi possibile che le proteine siano precipitate. Comunque, se compaiono le bande relative alla catena leggera delle immunoglobuline, allora tali anticorpi sono presenti nei campioni in esame. Quindi, le IgG sono presenti oltre che nei campioni di alimentazione, anche nelle eluizioni di ognuno dei tre cicli cromatografici successivi, eseguiti con i due set di membrane HPTA 02\_HS01 e HPTA 02\_HS02; non si osserva una riduzione di intensità nella colorazione della banda, e quindi nella relativa quantità proteica, passando dalla prima alla terza eluizione.

In corrispondenza di un peso molecolare pari a circa 65-70 kDa, si osserva un'ulteriore banda: è quella relativa all'albumina, la cui presenza è predominante nei campioni di alimentazione dei due set studiati. Nei campioni di eluizione, invece, la banda relativa alla BSA è apprezzabile solo per il primo ciclo cromatografico eseguito con il set HPTA 02\_HS02 (si ricorda tuttavia che i due set HPTA 02\_HS01 e HPTA 02\_HS02 dovrebbero essere identici). Quindi, nei campioni

di eluizione, è preponderante la presenza di IgG piuttosto che di BSA, in accordo con i risultati illustrati nella tabella 5.18.

Infine, si nota che i campioni di alimentazione sono caratterizzati da molte bande, relative a tutte le proteine presenti nel siero utilizzato per le prove; in eluizione, però, nessuna di queste bande risalta per intensità, dimostrando l'assenza di altre eventuali proteine oltre alle IgG e alla BSA.

Complessivamente, i risultati ottenuti fino ad ora con le miscele, mettono in evidenza un problema legato al ligando che si sta caratterizzando, ovvero la sua scarsa capacità di eluizione che, anche se superiore al ligando A2P precedentemente caratterizzato dal gruppo di ricerca [24], non è comunque soddisfacente e deve essere migliorata affinché si possa iniziare a considerare il sistema in esame come una valida alternativa al processo di cromatografia convenzionale con proteina A, attualmente utilizzato su scala industriale per la purificazione delle immunoglobuline. Poiché l'effetto dello spaziatore può influenzare significativamente parametri importanti, quali la capacità di adsorbimento, la selettività ed il recupero della biomolecola di interesse, si potrebbe considerare la sostituzione del 2LP con un'altra molecola, come il DES (3,6-dioxa-1,8-octanedithiol) o il TRZ (1,2,3 triazole): in particolare, quest'ultimo, ha dato ottimi risultati in combinazione con il ligando A2P, utilizzando resine come supporto, e in combinazione con il ligando B14, immobilizzato su membrane commerciali [22]. Gli studi futuri potrebbero quindi essere incentrati sulla caratterizzazione di membrane di affinità con il complesso TRZ-HPTA.

## CAPITOLO 6

# RISULTATI DELLE PROVE SPERIMENTALI IN CONDIZIONI DINAMICHE

### 6.1 INTRODUZIONE

Lo scopo di questa seconda parte della tesi è la caratterizzazione di membrane a scambio ionico.

In particolare, sono state eseguite prove sperimentali in condizioni dinamiche con membrane per cromatografia a scambio cationico; questa tecnica è ampiamente utilizzata a livello industriale per i processi di purificazione degli anticorpi monoclonali, a valle del processo cromatografico di affinità con la proteina A [16], anche se vengono utilizzati supporti in resina piuttosto che membrane. Molti studi tuttavia sono mirati all'ottimizzazione delle prestazioni degli scambiatori di tipo cationico, in previsione di un possibile utilizzo di questo tipo di cromatografia come alternativa al processo di cattura convenzionale delle immunoglobuline, magari combinando in modo opportuno più processi in serie [3, 27, 29]. Per esempio, si potrebbe procedere mediante uno scambiatore di tipo cationico per la “cattura” delle IgG, seguito da un processo cromatografico ad interazione idrofobica oppure da uno scambiatore di tipo anionico, in grado di eliminare i contaminanti ed aumentare la purezza del prodotto.

Nel caso di cromatografia a scambio cationico, il supporto presenta gruppi funzionali carichi negativamente e può essere utilizzato nei processi di purificazione di anticorpi il cui pI sia neutro-basico: le IgG1 e le IgG2 sono candidate perfette [16]. In generale, le immunoglobuline si legano al supporto, e verranno successivamente eluite cambiando le condizioni del tampone, solitamente mediante metodo a gradiente di sale. La scelta delle condizioni di eluizione dipende, oltre che dalla capacità di recupero degli anticorpi, anche dalle condizioni richieste dalla fase successiva scelta per proseguire il processo di purificazione delle biomolecole.

Le prime prove sono state eseguite con membrane non commerciali a base di politriazolo, le membrane PTA-OH, funzionalizzate con gruppi solfonici e descritte in dettaglio nel capitolo 4. Prima di procedere con le prove di adsorbimento, sono state eseguite prove ad impulso, con lo scopo di ottenere il valore del grado di vuoto del supporto; sono stati poi eseguiti cicli

cromatografici in condizioni dinamiche utilizzando soluzioni pure di lisozima, in modo da determinare la capacità dinamica di adsorbimento ed il rendimento in fase di eluizione.

Infine, sono state eseguite alcune prove con le membrane commerciali SartoBind S: prove ad impulso con acetone e cicli cromatografici in condizioni dinamiche con la stessa proteina utilizzata per caratterizzare le membrane PTA-OH.

## 6.2 LE MEMBRANE A SCAMBIO CATIONICO PTA-OH

Sono stati studiati due tipi di membrane a base di politriazolo: le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35 e le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30.

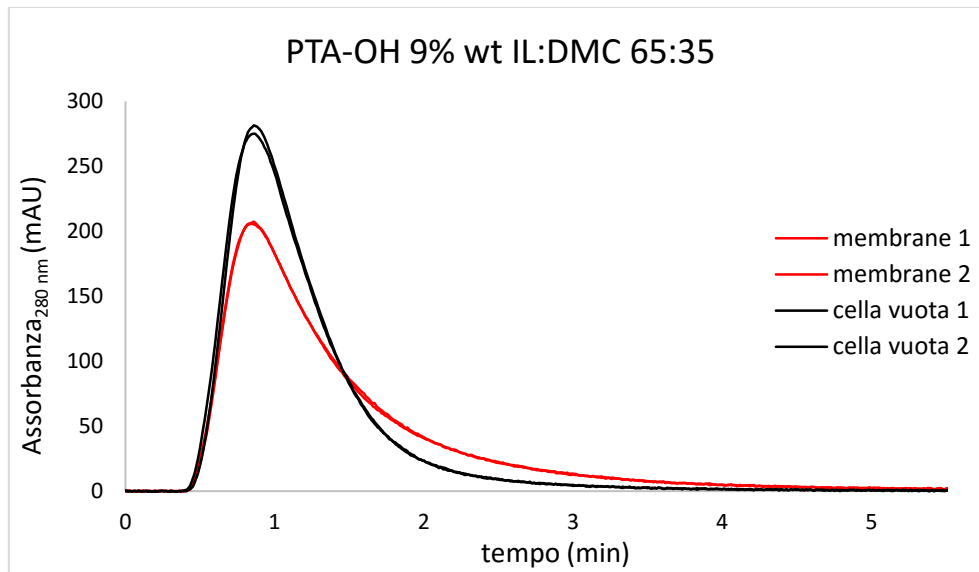
### 6.2.1 Determinazione del grado di vuoto

Le prove ad impulso sono state eseguite attenendosi alla procedura descritta nel paragrafo 4.6.3. Il tracciante scelto per le prove è acetone (soluzione acetone-acqua 5% v/v), sostanza che non va ad interagire con la fase stazionaria; la portata della fase mobile è costante e pari ad 1 mL/min, mentre il loop in cui viene caricato il campione, il quale verrà inviato in colonna durante la fase di iniezione, possiede una capacità di 100  $\mu$ L.

Sono state eseguite prove con il modulo al completo (contenente quindi le membrane, i frits e gli o-rings) e prove escludendo le membrane dalla cella, ma contenente comunque i frits e gli o-rings: in questo modo, per differenza, è possibile calcolare il valore del momento primo relativo alle sole membrane,  $\mu_1^{membrane}$ , seguendo la procedura descritta nel paragrafo 4.6.3. Per ottenere risultati più affidabili, ogni prova è stata eseguita due volte ed è stata utilizzata una media dei valori ottenuti.

Grazie alla conoscenza del parametro  $\mu_1^{membrane}$ , di  $L$  (altezza della colonna cromatografica) e di  $u$  (velocità superficiale della fase mobile), è possibile ricavare il valore del grado di vuoto del supporto in esame.

I risultati ottenuti sono illustrati nel seguente grafico:



**Figura 6.1:** Risultati delle prove ad impulso con acetone (5% v/v) per le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35.

Come si può osservare, le due prove relative al modulo contenente le membrane (in rosso) sono perfettamente sovrapponibili, e lo stesso vale per le altre due curve (in nero).

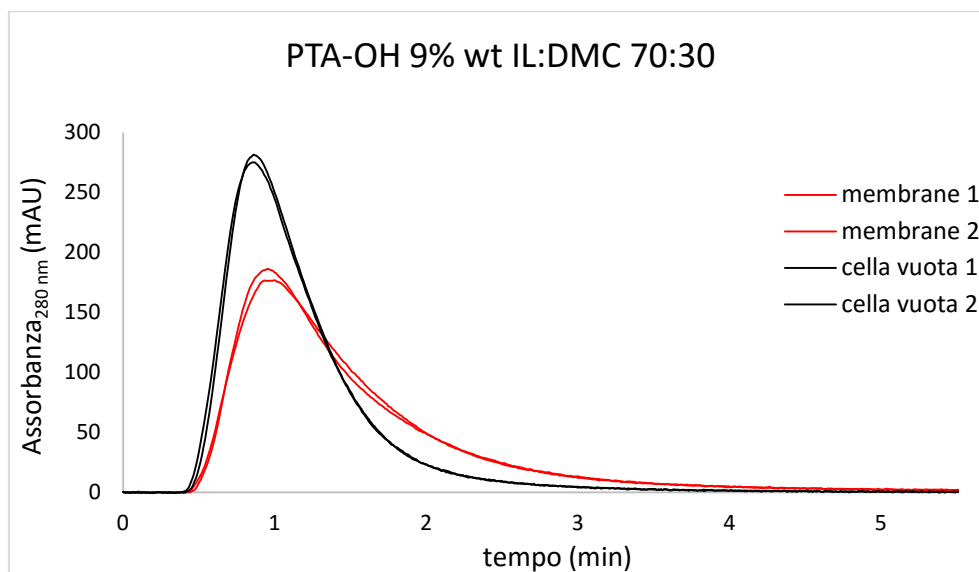
Elaborando i dati secondo la procedura descritta nel paragrafo 4.6.3., si ottiene la seguente tabella:

**Tabella 6.1:** Grado di vuoto per le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35 (15 membrane sovrapposte).

$\mu_1^{\text{totale}}$ (min)	$\mu_1^{\text{sistema}}$ (min)	$\mu_1^{\text{membrane}}$ (min)	u (cm/s)	L (cm)	$\epsilon$
1,409	1,143	0,266	4,38E-03	0,174	40,09%

Quindi, il grado di vuoto delle membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35 è pari al 40,1%.

Le prove eseguite con il secondo set, PTA-OH 9% IL:DMC 70:30, hanno permesso di ottenere il seguente grafico:



**Figura 6.2:** Risultati delle prove ad impulso con acetone (5% v/v) per le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30.

Nella seguente tabella è illustrata l'elaborazione dei dati che ha permesso di calcolare il valore del grado di vuoto relativo al supporto in esame:

**Tabella 6.2:** Grado di vuoto per le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30 (13 membrane sovrapposte).

$\mu_1^{\text{totale}}$ (min)	$\mu_1^{\text{sistema}}$ (min)	$\mu_1^{\text{membrane}}$ (min)	u (cm/s)	L (cm)	$\epsilon$
1,491	1,143	0,349	4,38E-03	0,182	50,49%

Il grado di vuoto delle membrane PTA-OH 9% 70:30 risulta quindi maggiore rispetto al valore ottenuto per le membrane PTA-OH 9% 65:35. Dato questo risultato, ci si aspetta una maggiore capacità di adsorbimento da parte del secondo set di membrane.

### 6.2.2 Cicli cromatografici in condizioni dinamiche

I cicli cromatografici eseguiti in condizioni dinamiche permettono di calcolare le quantità di proteine adsorbite sul supporto, lavate ed eluite, dati necessari per determinare le prestazioni delle membrane: grazie alla loro conoscenza, infatti, è possibile ottenere il valore della capacità dinamica di adsorbimento ed il valore del parametro che rappresenta il recupero della biomolecola in fase di eluizione.

Tutte le prove sono state eseguite impostando una portata costante, pari a 1 mL/min, e sottoponendo le membrane al seguente ciclo cromatografico:

**Tabella 6.3:** *Tamponi usati e volumi alimentati nelle varie fasi del ciclo cromatografico in condizioni dinamiche per le membrane a scambio cationico.*

Fase cromatografica	Tampone	Volume alimentato (mL)
Equilibratura	50 Mm Tris pH 8	*
Adsorbimento	0.5 mg/mL lisozima in 50 mM Tris pH 8	~ 60 (PTA-OH 70:30) ~ 45 (PTA-OH 65:35)
Lavaggio	50 Mm Tris pH 8	~ 50
Eluizione	50 Mm Tris pH 8 - 2 M NaCl	10

\* *La durata dell'equilibratura non è standardizzata, ma dipende essenzialmente dal tempo impiegato per uniformare le condizioni di lavoro lungo la colonna ed è durante questa fase che vengono allontanate eventuali bolle d'aria intrappolate nel sistema e che comprometterebbero l'esito dei risultati.*

L'eluizione è stata ottenuta con il metodo del gradiente di sale, ovvero la concentrazione di sale è stata aumentata gradualmente, in modo da raggiungere un certo valore entro un determinato intervallo di tempo.

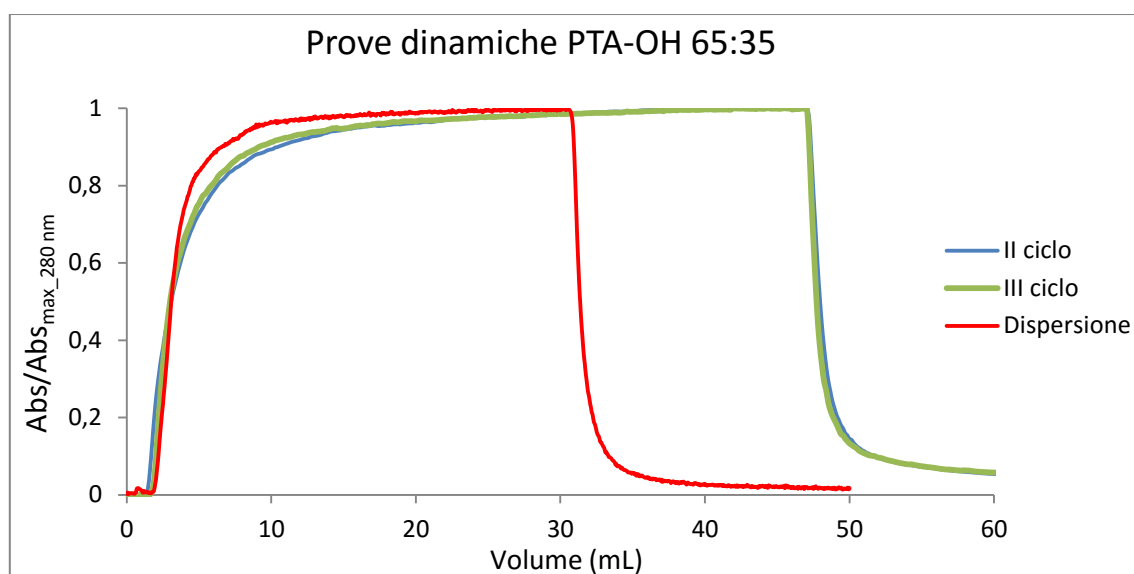
Oltre all'esecuzione di prove dinamiche, sono state eseguite le prove di dispersione, necessarie per tener conto dell'influenza dei volumi esterni alla colonna sul processo cromatografico, utilizzando una soluzione di acetone in acqua demineralizzata, 0,4 % v/v.

### 6.2.2.1 Le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35

Di seguito si riportano i risultati ottenuti eseguendo prove di adsorbimento in condizioni dinamiche con il primo set di membrane a scambio ionico; l'alimentazione è costituita da una soluzione pura di lisozima alla concentrazione di 0,5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8. Sono stati eseguiti tre cicli cromatografici successivi sulle stesse membrane, ma nel primo ci sono stati problemi causati da bolle di aria all'interno del sistema, quindi si illustrano i risultati ottenuti per il secondo e il terzo ciclo.



Nel seguente grafico si mostrano le curve di breakthrough e la curva di dispersione:



**Figura 6.3:** Andamento delle curve di breakthrough e della curva di dispersione per cicli cromatografici eseguiti con soluzione pura di lisozima 0,5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8, per le membrane PTA-OH 65:35.

Seguendo il procedimento descritto per l'elaborazione dei dati nel paragrafo 4.6, si ottengono i valori di massa adsorbita per ogni ciclo e le relative capacità dinamiche (DBC):

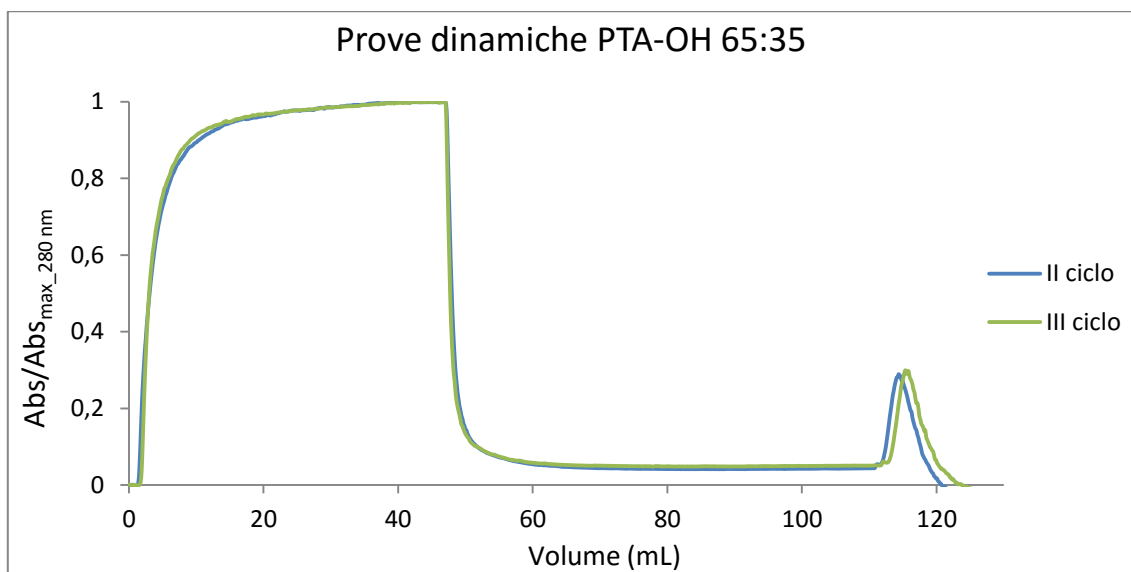
**Tabella 6.4:** Risultati prove dinamiche per le membrane PTA-OH 65:35 con soluzione pura di lisozima 0.5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8: massa adsorbita e DBC.

Sostanza	Ciclo Cromatografico	$m_{ads}$ (mg)	DBC (mg/mL)
Lisozima	II	0,650	0,982
	III	0,584	0,882

Purtroppo non è stato possibile fare un confronto con i dati ottenuti nel primo ciclo cromatografico, ma, osservando i valori in tabella relativi al II e al III ciclo, si nota che la capacità di adsorbimento è piuttosto bassa e diminuisce del 10,2% passando da un ciclo al successivo.

La determinazione del recupero richiede che venga calcolata la massa eluita, ottenibile tramite integrazione del picco di eluizione.

I cromatogrammi relativi al secondo e al terzo ciclo di adsorbimento sono riportati nel seguente grafico:



**Figura 6.4:** Cromatogramma relativo al secondo e al terzo ciclo cromatografico eseguito con soluzione pura di lisozima, per le membrane PTA-OH 65:35.

Nella tabella seguente vengono riportati i valori di massa eluita per i due cicli ed i valori di recupero di lisozima, ottenuti considerando  $m_{elu}^{ideal} = m_{ads}$  :

**Tabella 6.5:** Risultati prove dinamiche per le membrane PTA-OH 65:35 con soluzione pura di lisozima 0.5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8: massa eluita e recupero.

Sostanza	Ciclo Cromatografico	$m_{elu}^{actual}$ (mg)	Recupero
Lisozima	II	0,576	88,64%
	III	0,589	~ 100% *

\* Le quantità di massa adsorbita ed eluita sono molto piccole e poco diverse fra loro: è possibile quindi che, per quanto si cerchi di elaborare i dati nel modo più preciso possibile, si verifichino variazioni significative nei risultati ottenuti, che giustificano gli alti valori di recupero riportati in tabella e che potrebbero essere inferiori.

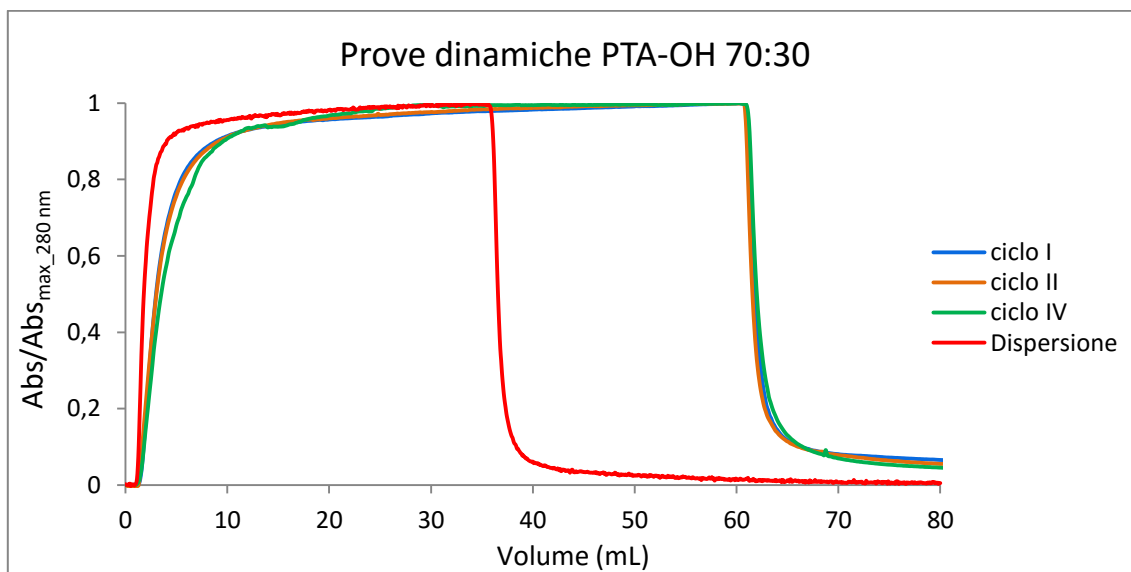
Si nota una maggiore efficienza nel III ciclo cromatografico, poiché le membrane sono state saturate nei cicli precedenti in termini di adsorbimento “non specifico”.

### 6.2.2.2 Le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30

In questo paragrafo si illustrano i risultati ottenuti eseguendo prove di adsorbimento in condizioni dinamiche con il secondo set di membrane a scambio ionico; come per il primo set,

l'alimentazione è costituita da una soluzione pura di lisozima alla concentrazione di 0,5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8. Sono stati eseguiti quattro cicli cromatografici successivi, ma i risultati ottenuti nel III ciclo risultano poco affidabili e non è stato possibile calcolare il valore di massa eluita, questo a causa di problemi derivanti da bolle di aria rimaste nel sistema durante l'esecuzione della prova.

Nel seguente grafico si mostrano le curve di breakthrough e la curva di dispersione:



**Figura 6.5:** Andamento delle curve di breakthrough e della curva di dispersione per cicli cromatografici eseguiti con soluzione pura di lisozima 0,5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8, per le membrane PTA-OH 70:30.

I valori di massa adsorbita per ogni ciclo e le relative capacità dinamiche (DBC) sono riportate nella seguente tabella:

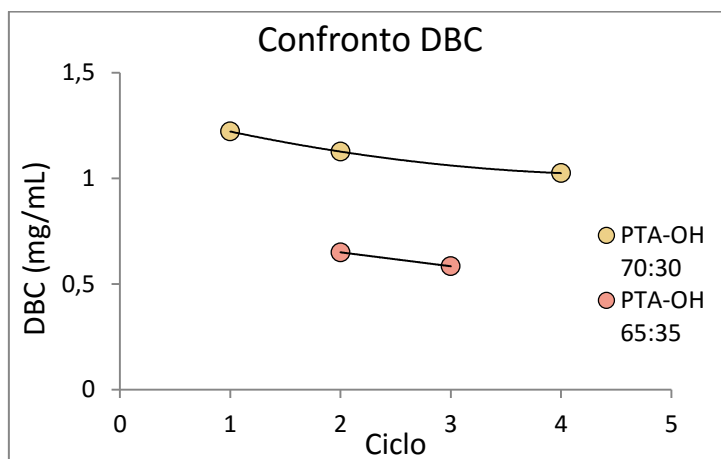
**Tabella 6.6:** Risultati prove dinamiche per le membrane PTA-OH 70:30 con soluzione pura di lisozima 0.5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8: massa adsorbita e DBC.

Sostanza	Ciclo Cromatografico	$m_{ads}$ (mg)	DBC (mg/mL)
Lisozima	I	1,222	1,769
	II	1,127	1,631
	III *	1,187	1,718
	IV	1,025	1,484

\* I valori ottenuti per il ciclo III potrebbero essere affetti da errori sperimentali.

Osservando i valori in tabella e non considerando i valori ottenuti nel terzo ciclo cromatografico, si nota che la capacità di adsorbimento diminuisce del 7-8% dal primo al secondo ciclo mentre, dopo 4 cicli successivi, la DBC cala complessivamente del 16%,.

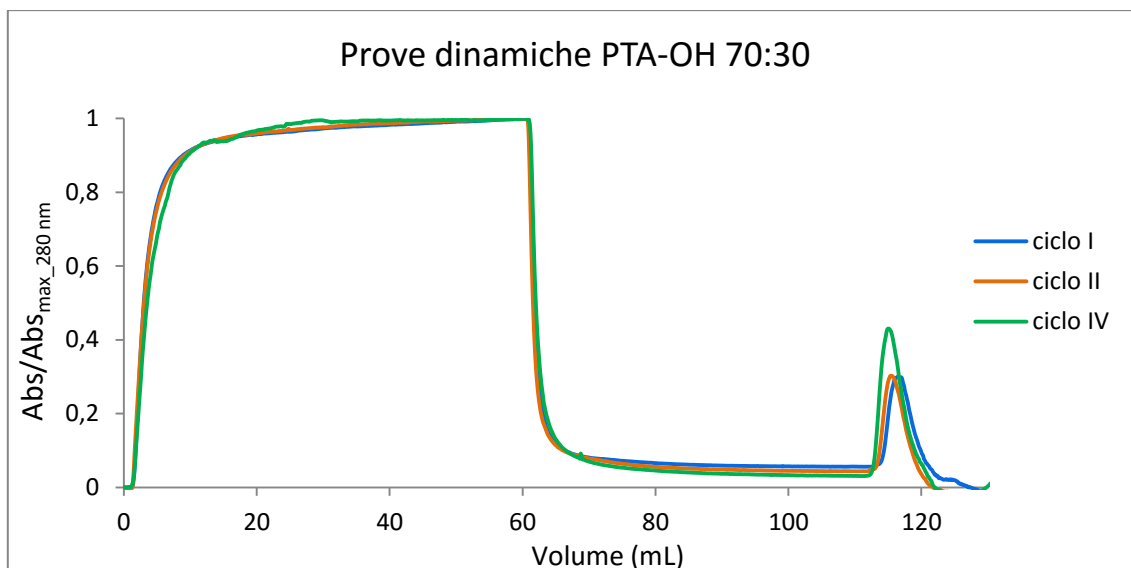
Nel seguente grafico si mostra un riassunto dei valori delle capacità dinamiche di adsorbimento ottenuti in ogni ciclo cromatografico per entrambi i set di membrane:



**Figura 6.6:** Confronto dei risultati ottenuti in termini di DBC per i due set di membrane PTA-OH.

Anche se per le membrane PTA-OH 70:30 i valori di DBC sono maggiori rispetto a quelli ottenuti con le membrane PTA-OH 65:35 di quasi il 45%, si tratta comunque di valori molto bassi. Il fatto che la capacità dinamica di adsorbimento sia più alta per il secondo set di membrane potrebbe essere dovuto al maggiore grado di vuoto che le caratterizza.

I cromatogrammi completi relativi al primo, al secondo e al quarto ciclo di adsorbimento, per il set PTA-OH 70:30, sono riportati nel seguente grafico:



**Figura 6.7:** Cromatogramma relativo al primo, al secondo e al quarto ciclo cromatografico eseguito con soluzione pura di lisozima, per le membrane PTA-OH 70:30.

Nella tabella seguente vengono riportati i valori di massa eluita per i tre cicli ed i valori di recupero di lisozima, ottenuti considerando  $m_{elu}^{ideal} = m_{ads}$  :

**Tabella 6.7:** Risultati prove dinamiche per le membrane PTA-OH 70:30 con soluzione pura di lisozima 0.5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8: massa eluita e recupero.

Sostanza	Ciclo Cromatografico	$m_{elu}^{actual}$ (mg)	Recupero
Lisozima	II	0,586	47,98%
	III	0,553	49,04%
	IV	0,691	67,36%

Questo secondo set mostra valori di recupero inferiori rispetto a quelli ottenuti per il primo set di membrane. Si nota inoltre che, fra il secondo ed il terzo ciclo, il valore del recupero resta pressoché invariato, mentre nel quarto ciclo si ha un aumento di circa il 39% (ma in questo caso è possibile che ci siano stati dei problemi con il lettore UV dell’FPLC).

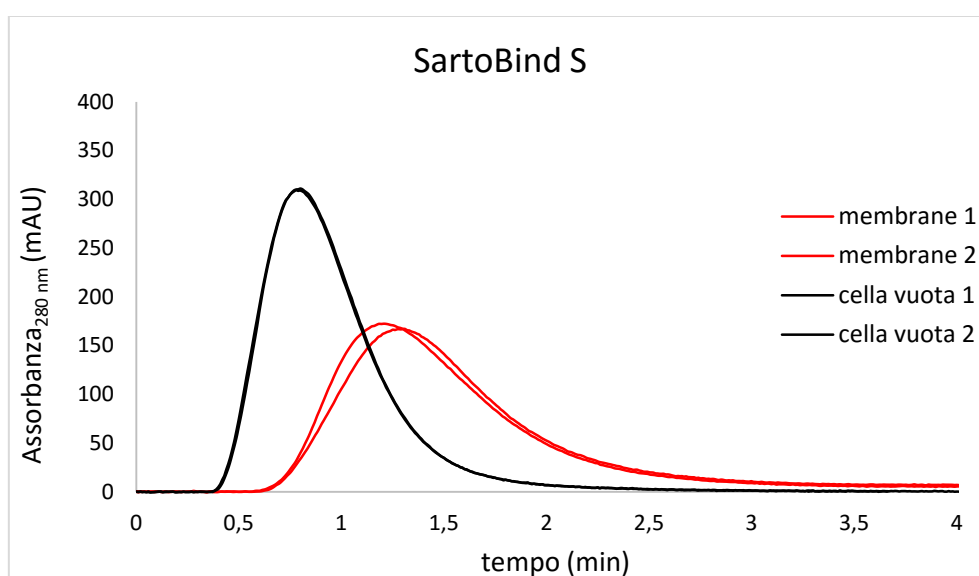
In generale, le membrane PTA-OH mostrano scarse capacità dinamiche di adsorbimento; tuttavia la caratterizzazione di questi supporti a scambio ionico è solo all’inizio e si pensa di poterli utilizzare in futuro come membrane per cromatografia ad interazione idrofobica, cambiando in modo opportuno le condizioni di pH e forza ionica.

## 6.3 LE MEMBRANE A SCAMBIO CATIONICO SARTOBIND S

### 6.3.1 Determinazione del grado di vuoto

Le prove sono state eseguite secondo la stessa procedura descritta per le membrane PTA-OH: la portata della fase mobile è costante e pari ad 1 mL/min, mentre il loop in cui viene caricato il campione (una soluzione di acetone-acqua 5% v/v) possiede una capacità di 100  $\mu$ L. Sono state utilizzate 5 membrane sovrapposte e, anche in questo caso, sono state eseguite prove ad impulso con il modulo al completo e prove escludendo il supporto dalla cella.

I risultati ottenuti sono illustrati nel seguente grafico:

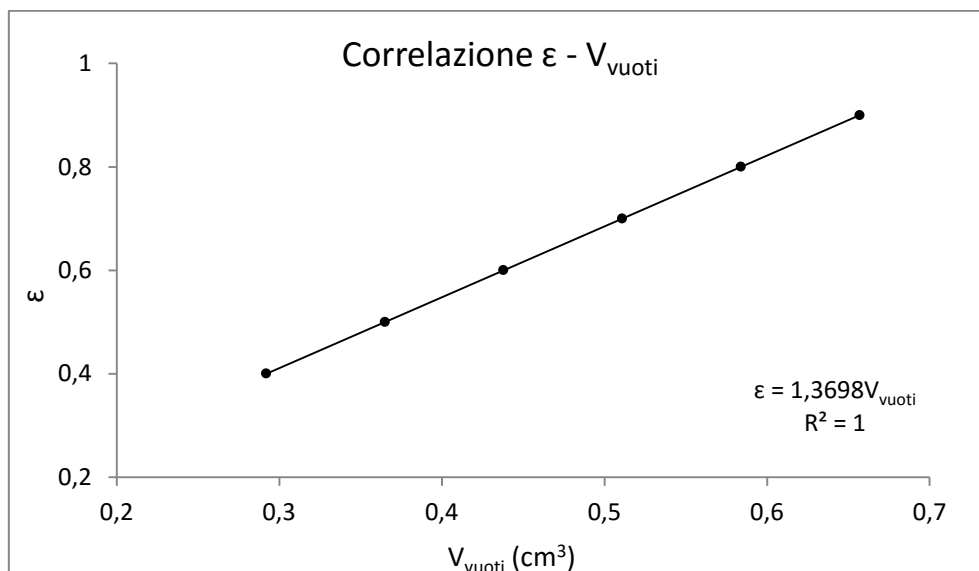


*Figura 6.8: Risultati delle prove ad impulso con acetone (5% v/v) per le membrane SartoBind S.*

A differenza di quanto avviene per le membrane a scambio cationico PTA-OH, è presente ora un ritardo nell'uscita del picco relativo alla prova con il modulo al completo. La differenza potrebbe essere data dalla presenza del distanziale, elemento utilizzato per garantire una certa compressione al sistema quando si eseguono le prove con le membrane: mentre per le membrane PTA-OH il distanziale non è mai stato usato, le prove con le membrane SartoBind S sono state eseguite avvalendosi di tale elemento. Per tenere in considerazione questo dato, si procede con il calcolo del grado di vuoto introducendo una correzione nella valutazione di  $\mu_1^{\text{membrane}}$ . Sia  $V_{pieno}$  il volume delle membrane a meno dei pori, sia  $V_{vuoti}$  il volume dei pori, allora il volume totale del pacchetto di membrane,  $V_{totale}$ , sarà dato dalla somma di questi due contributi. Il ritardo della curva che rappresenta la prova ad impulso del modulo al completo rispetto alla curva relativa alla prova senza membrane, corrisponde a  $V_{pieno}$  e risulta pari a 0,224

cm<sup>3</sup>. Il  $V_{totale}$  può essere calcolato come prodotto fra l'area di una membrana e lo spessore delle cinque membrane sovrapposte e risulta pari a 0,73 cm<sup>3</sup>; il volume dei vuoti è dato dal prodotto tra il grado di vuoto,  $\varepsilon$ , e  $V_{totale}$ .

Ipotizzando diversi valori per  $\varepsilon$ , è possibile calcolare i volumi in gioco nel sistema ed ottenere una retta che correli  $\varepsilon$  a  $V_{vuoti}$ :



**Figura 6.9:** Correlazione fra il grado di vuoto e il volume dei pori delle membrane.

Utilizzando l'equazione  $\varepsilon = 1,3698 * V_{vuoti}$  e calcolando  $V_{vuoti}$  per il sistema in esame come differenza fra  $V_{totale}$  e  $V_{pieno}$ , si ottiene  $\varepsilon = 69,33\%$ . Questo numero rappresenta un valore indicativo del grado di vuoto delle membrane SartoBind S, che è stato utilizzato come parametro di verifica.

Procedendo elaborando i dati delle prove con il metodo dei momenti, secondo la procedura descritta nel paragrafo 4.6.3., e correggendo il parametro  $\mu_1^{membrane}$  mediante sottrazione del valore di  $V_{pieni}$  (0,224 cm<sup>3</sup>), si ottengono i risultati illustrati nella seguente tabella:

**Tabella 6.8:** Grado di vuoto delle membrane SartoBind S.

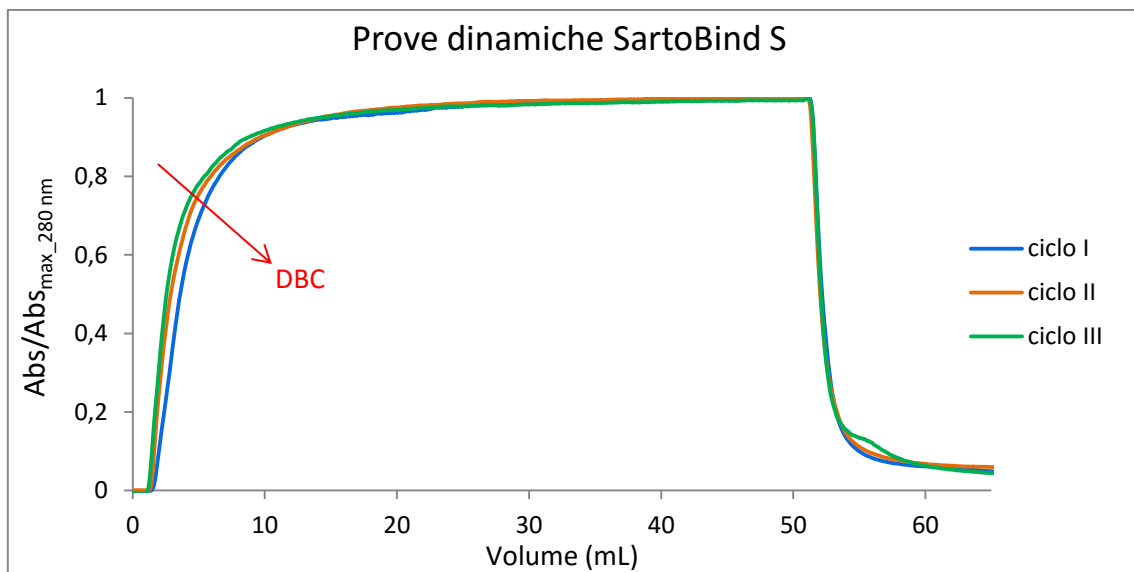
$\mu_1^{totale}$ (min)	$\mu_1^{sistema}$ (min)	$\mu_1^{membrane}$ (min)	u (cm/s)	L (cm)	$\varepsilon$
1,533	0,942	0,367	4,38E-03	0,138	70,21%

Il valore di  $\varepsilon$ , 70,21%, è perfettamente in accordo con quanto ci si aspettava (69,33%).

### 6.3.2 Cicli cromatografici in condizioni dinamiche

Le prove sono state eseguite impostando una portata costante, pari a 2 mL/min, e sottoponendo le membrane a tre cicli cromatografici successivi; i tamponi usati e i volumi relativi ad ogni fase del ciclo sono riportati nella tabella 6.3, con la differenza che, in questo caso, il volume relativo alla fase di adsorbimento è pari a 51,3 mL. Come per le membrane PTA-OH, l'eluizione è stata ottenuta con il metodo del gradiente di sale.

Nel seguente grafico si mostra l'andamento delle curve di breakthrough:



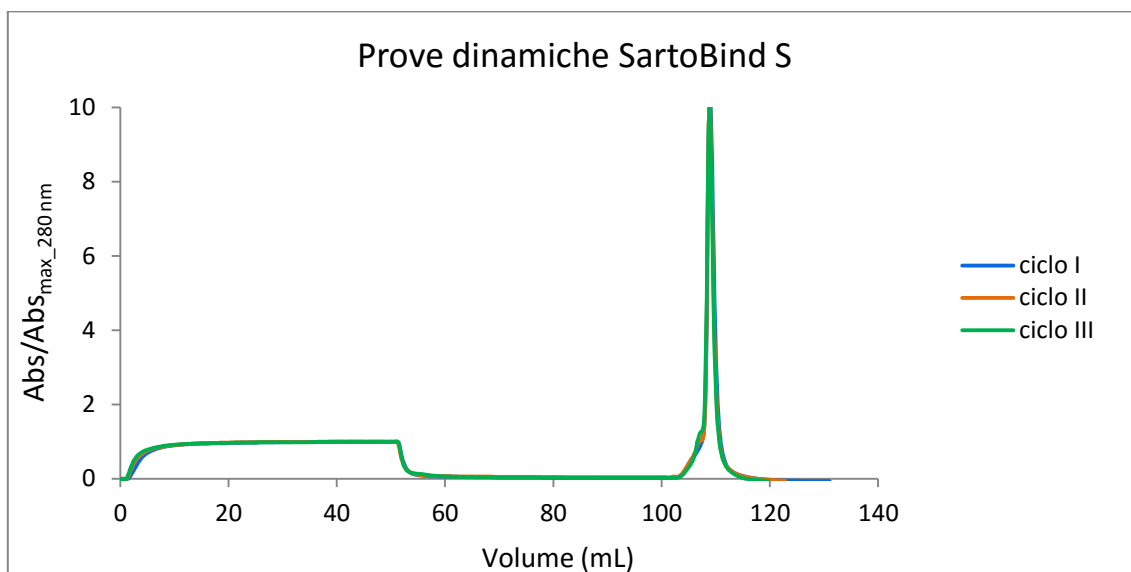
**Figura 6.10:** Andamento delle curve di breakthrough per i cicli cromatografici eseguiti con soluzione pura di lisozima 0,5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8, per le membrane SartoBind S.

Dal primo al terzo ciclo cromatografico, si verifica uno spostamento della curva di breakthrough verso sinistra: questo significa che la massa adsorbita sarà maggiore nel ciclo I, per andare a diminuire nei cicli successivi (la freccia rossa nel grafico sta appunto ad indicare che il valore della capacità dinamica di adsorbimento, DBC, aumenta dal terzo al primo ciclo).

Come si può osservare dal grafico 6.11, relativo ai cromatogrammi completi ottenuti nelle prove dinamiche con le membrane SartoBind S, i picchi di eluizione sono ben pronunciati. Purtroppo, nel caso in esame, non è stato possibile ottenere valori affidabili in termini di massa adsorbita, a causa di problemi legati probabilmente al lettore UV dell'FPLC. Per avere comunque una stima delle capacità dinamiche di adsorbimento, si è scelto di procedere nel seguente modo: si calcolano i valori di massa eluita, i quali corrispondono ai valori minimi di massa adsorbita dal



supporto, e si determinano i valori minimi di DBC come rapporto  $m_{ads\_min}/V_{mem}$ , dove  $V_{mem}$  rappresenta il volume totale delle membrane.



**Figura 6.11:** Cromatogramma relativo al primo, al secondo e al terzo ciclo cromatografico eseguito con soluzione pura di lisozima, per le membrane SartoBind S.

I risultati ottenuti sono illustrati nella seguente tabella:

**Tabella 6.9:** Risultati prove dinamiche per le membrane SartoBind S con soluzione pura di lisozima 0.5 mg/mL in 50 mM Tris pH 8: massa adsorbita e DBC (valori minimi).

Sostanza	Ciclo Cromatografico	$m_{ads\_min}$ (mg)	DBC <sub>min</sub> (mg/mL)
Lisozima	I	7,329	14,021
	II	6,871	13,145
	III	6,741	12,897

Ovviamente si tratta di valori puramente indicativi; tuttavia è evidente che la capacità di adsorbimento risulta molto più alta rispetto alle membrane PTA-OH, per le quali il massimo valore è stato ottenuto nel primo ciclo del set 70:30 (1,769 mg/mL); si nota inoltre un lieve calo della DBC, pari al 6% dal primo al secondo ciclo e del 2% dal secondo al terzo ciclo.

In conclusione, le membrane SartoBind S sono caratterizzate da capacità di adsorbimento molto più alte rispetto ai supporti non commerciali a base di politriazolo, ma non è stato possibile determinare i valori di recupero della proteina. Per comprendere meglio il comportamento delle membrane studiate, bisognerà caratterizzarne il comportamento alimentando miscele.

## CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni l'utilizzo delle biotecnologie nella medicina ha portato a una serie di importanti sviluppi in campo diagnostico e terapeutico: oggi per molte patologie è possibile effettuare una diagnosi precoce per individuarle in tempo e curarle con metodi altamente specifici. Particolare interesse è rivolto ai farmaci a base di anticorpi monoclonali, o immunoglobuline, proteine utilizzate per la cura di molte gravi malattie, come tumori e leucemie.

A partire dal 1972, anno in cui César Milstein e Georges Köhler, vincitori del Premio Nobel per la medicina nel 1984, misero a punto una tecnica per ottenere quantità illimitate di molecole di anticorpi identiche tra loro, sono state sviluppate molteplici strategie di produzione. Nel caso delle immunoglobuline di classe G, oggetto di questa tesi di laurea, per ottenere un prodotto caratterizzato da un elevato grado di purezza, si sfruttano le prestazioni dei processi cromatografici di affinità con proteina A, il ligando naturale biospecifico per le IgG: questa molecola è in grado di legarsi con alta specificità agli anticorpi, i quali dovranno essere successivamente eluiti e recuperati. Lo stadio cromatografico di affinità rappresenta il processo più costoso nell'ambito della purificazione e, per questo motivo, sono state sviluppate e vengono tuttora studiate alternative più economiche, ma che siano comunque in grado di raggiungere il grado di purezza richiesto.

Nei processi cromatografici convenzionali, la fase stazionaria su cui viene immobilizzato il ligando è costituita da granuli porosi; oggi molte ricerche sono dedicate allo studio di supporti costituiti da membrane e allo sviluppo di ligandi sintetici alternativi alla proteina A, che siano caratterizzati da una buona affinità per le IgG e che siano poco costosi. La tesi si inserisce all'interno di questo scenario: si cerca una combinazione ligando-spaziatore in grado di sostituire il ruolo della proteina A nella cattura delle immunoglobuline G, utilizzando membrane come supporto; queste ultime offrono una serie di vantaggi rispetto alle resine: sono infatti caratterizzate da inferiori perdite di carico ed il trasporto di materia non è limitato dalla diffusione, come nei processi convenzionali, ma avviene principalmente per convezione, motivo per il quale si ottiene un risparmio in termini di tempo di separazione e quantitativi di tamponi utilizzati.

Il lavoro si sviluppa a partire dai risultati precedentemente ottenuti dal gruppo di ricerca: in particolare, sono stati già caratterizzati alcuni ligandi sintetici, come il ligando A2P, ma, ad oggi, nessuna di queste molecole è stata in grado di offrire le stesse prestazioni ottenute tramite la cromatografia convenzionale con proteina A.

Alla luce di questo, sono stati preparati supporti di affinità utilizzando un nuovo ligando, HPTA, appositamente progettato per legare selettivamente le IgG e con lo scopo di migliorare il rendimento nella fase di eluizione: l'HPTA è stato immobilizzato su membrane commerciali costituite da cellulosa ed attivate con gruppi epossidici. Per facilitare l'interazione ligando-anticorpo, viene utilizzata una molecola a basso peso molecolare, lo spaziatore (2LP), che si lega con un'estremità alle membrane e con l'altra estremità al ligando. Lo studio del complesso HPTA-2LP è stato iniziato precedentemente al lavoro di tesi e ha evidenziato il problema dell'adsorbimento non specifico legato a questo supporto di affinità, per la risoluzione del quale sono stati indagati il ruolo delle membrane, dell'agente utilizzato per eseguire i protocolli di reticolazione e dello spaziatore; mediante prove con soluzioni pure e con miscele di IgG e contaminanti, è emerso che la causa principale del fenomeno indesiderato dell'adsorbimento non specifico debba essere cercata nello spaziatore: questa molecola, infatti, introducendo gruppi amminici sul supporto, può dare luogo ad interazioni e legami con eventuali impurità, come la BSA, creando un ostacolo all'adsorbimento e al successivo recupero delle immunoglobuline.

Quindi, il lavoro di tesi parte da un'indagine sul legame della molecola 2LP con il fenomeno indesiderato appena descritto. A tal fine, sono state eseguite prove di adsorbimento in batch con alcuni contaminanti, legando alle membrane SartoBind Epoxy solo lo spaziatore 2LP e valutando varie strategie di endcapping dei gruppi epossidici del supporto e dei gruppi amminici: è possibile eseguire il protocollo di reticolazione dei gruppi epossidici e successivamente quello dei gruppi amminici, o viceversa; inoltre, in alcuni casi, è possibile eseguire i due protocolli contemporaneamente.

Come alimentazione, sono state scelte soluzioni pure di albumina di siero bovino e soluzioni pure di lisozima; come agenti di endcapping, per i gruppi  $-NH_2$ , sono stati provati l'acetaldeide e l'acetone, mentre per i gruppi epossidici è stato utilizzato il  $\beta$ -mercaptoetanololo. L'acetaldeide non ha portato alcun miglioramento in termini di adsorbimento non specifico e sono stati riscontrati alcuni problemi legati al suo impiego, a causa dell'elevata volatilità, per cui la reazione è stata fatta avvenire a bassa temperatura e non c'è la certezza di aver effettivamente

legato tutti i gruppi amminici. Anche l'acetone, dopo le prime prove eseguite, sembrava non essere in grado di limitare il fenomeno dell'adsorbimento dei contaminanti, ma, modificando il protocollo scelto per eseguire la reticolazione dei gruppi amminici (lasciando le membrane a bagno in acetone puro) sono stati ottenuti risultati soddisfacenti. Questa considerazione vale solo per il caso in cui è stato eseguito prima l'endcapping dei gruppi amminici e poi quello dei gruppi epossidici, con una riduzione del 30-40% in termini di quantità di BSA adsorbita sul supporto, rispetto al caso in cui è stata effettuata solo la reticolazione dei gruppi epossidici.

Dopo l'indagine del legame fra lo spaziatore ed il fenomeno dell'adsorbimento non specifico, sono state eseguite prove in batch con supporti di affinità, utilizzando le membrane SartoBind Epoxy ed il complesso HPTA-2LP, con lo scopo di ottenerne una caratterizzazione in termini di capacità di adsorbimento e di efficienza nella fase di eluizione. E' stato eseguito solo l'endcapping dei gruppi epossidici e, come tamponi di alimentazione, sono state scelte soluzioni pure di IgG, miscele binarie di IgG e BSA e siero umano.

Nelle prove con soluzioni pure di IgG, si ottiene una capacità di adsorbimento massima pari a 2,2 mg/mL, valore che diminuisce da un ciclo al successivo a causa probabilmente della formazione di legami irreversibili fra il ligando e l'anticorpo, che porta ad una riduzione dei siti di legame disponibili da un ciclo al consecutivo. Inoltre, il valore di recupero delle immunoglobuline in fase di eluizione è pari circa al 70%, dato in accordo con i risultati ottenuti su prove analoghe in un precedente lavoro di tesi. Per trarre conclusioni sul supporto cromatografico in esame, ne è stato studiato il comportamento in caso di miscele ma, anche in questo caso, è stato eseguito solo l'endcapping dei gruppi epossidici e non quello dei gruppi amminici. Sono state usate miscele binarie contenenti le IgG da purificare e la BSA come contaminante, oltre a prove di adsorbimento in batch in cui è stato utilizzato siero umano. In ogni caso, purtroppo, sono stati riscontrati alto adsorbimento non specifico, bassi rendimenti del supporto in fase di eluizione ed un calo della capacità di adsorbimento delle IgG da un ciclo al successivo. Se si confrontano i dati ottenuti per la miscela binaria IgG (0,5 mg/mL) – BSA (0,25 mg/mL) con quelli relativi alle prove con soluzione di IgG pura, si nota che la capacità di adsorbimento risulta ridotta del 30-40%, così come i valori di recupero calano dal 70 al 30-40%: questi risultati mettono in evidenza la competizione fra IgG e contaminante per i siti di legame del ligando, oltre agli inconvenienti relativi all'adsorbimento non specifico. Se la concentrazione di BSA nella miscela binaria viene aumentata da 0,25 mg/mL a 0,75 mg/mL, mantenendo la concentrazione di IgG pari a 0,5 mg/mL, si nota un ulteriore peggioramento: cala la quantità di anticorpi adsorbita da parte del supporto ed aumenta invece la quantità di contaminante

adsorbito; anche i valori di recupero si riducono. La capacità di adsorbimento delle IgG diminuisce da un ciclo al successivo in quanto, se la BSA si lega irreversibilmente al supporto, gli anticorpi trovano un numero sempre minore di siti disponibili per il legame ed il raggiungimento di questi ultimi potrebbe essere ostacolato anche da problemi di tipo sterico. Infine, le ultime prove in batch sono state eseguite utilizzando siero umano: le quantità di IgG adsorbite sono inferiori rispetto ai valori ottenuti per le miscele binarie, mentre i valori di recupero sono abbastanza alti nei primi due cicli cromatografici, per diminuire drasticamente nel terzo ciclo. Dalle analisi qualitative condotte mediante la tecnica dell'elettroforesi, nei campioni di eluizione ottenuti dalle prove con il siero sembra essere presente molta meno albumina rispetto ai campioni derivanti dalle prove con le miscele binarie.

Complessivamente, i risultati ottenuti mettono in evidenza un problema importante legato al ligando HPTA: la scarsa capacità in fase di eluizione che, anche se superiore al ligando A2P precedentemente studiato dal gruppo di ricerca, deve essere migliorata affinché si possa considerare il supporto di affinità in esame come un'alternativa valida al processo di cromatografia convenzionale con proteina A. Ulteriori studi dovranno essere mirati a provare la validità della strategia, precedentemente discussa, mirata alla soluzione del problema dell'adsorbimento non specifico: si dovrebbero ripetere le prove con le miscele utilizzando le membrane attivate con il complesso HPTA-2LP e sottoposte, oltre che al protocollo di endcapping dei gruppi epossidici, anche al protocollo di endcapping dei gruppi amminici, seguendo lo schema identificato durante questo lavoro di tesi, basato sull'utilizzo di acetone. Purtroppo, non è stato momentaneamente possibile proseguire questo studio, che potrebbe essere portato avanti in futuro da parte del gruppo di ricerca. Un'alternativa, potrebbe essere quella di sostituire lo spaziatore 2LP con un'altra molecola da immobilizzare al supporto, la cui formulazione chimica sia pensata appositamente con lo scopo di evitare la formazione di possibili legami con i contaminanti presenti nelle miscele da purificare.

Tuttavia, è stato possibile proseguire il lavoro di tesi concentrandosi su un altro importante aspetto legato alla produzione delle immunoglobuline: infatti, il processo di purificazione attualmente utilizzato a livello industriale, prevede una serie di stadi successivi, all'interno del quale riveste un ruolo di primaria importanza la cromatografia di affinità con proteina A, ma che comprende anche altri processi cromatografici, come la cromatografia a scambio ionico e la cromatografia ad interazione idrofobica. In particolare, la cromatografia a scambio cationico viene utilizzata a valle dello stadio di affinità, con lo scopo di purificare ulteriormente il prodotto a base di anticorpi; molti studi sono mirati all'ottimizzazione degli scambiatori di tipo

cationico, in previsione di un possibile utilizzo di questi ultimi come alternativa al processo convenzionale di purificazione con proteina A. Negli scambiatori cationici, il “ligando” è costituito da gruppi carichi negativamente (i gruppi solfonici per esempio) che vanno ad interagire con gli anticorpi carichi positivamente; le immunoglobuline legate al supporto possono essere successivamente eluite cambiando le condizioni del tampone, solitamente con metodo a gradiente di sale. Ovviamente, lo stadio di separazione con scambiatori cationici deve essere inserito all’interno di un processo in cui vengano combinati in modo opportuno più stadi cromatografici in serie ed altre fasi di purificazione.

Durante il lavoro di tesi, sono state studiate sia membrane non commerciali a base di politriazolo (PTA-OH), funzionalizzate con gruppi solfonici, sia membrane commerciali (SartoBind S): sono stati eseguiti cicli cromatografici in condizioni dinamiche utilizzando soluzioni pure di lisozima, con lo scopo di determinare la capacità dinamica di adsorbimento delle membrane ed il rendimento in fase di eluizione. Inoltre, sono state eseguite prove ad impulso per determinare il grado di vuoto di questi supporti: 40% per le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 65:35, 50% per le membrane PTA-OH 9% IL:DMC 70:30 e 70% per le SartoBind S.

Nei cicli cromatografici in condizioni dinamiche è stata utilizzata, per la fase di adsorbimento, una soluzione pura di lisozima, proteina il cui comportamento dovrebbe rispecchiare quello delle immunoglobuline G nelle condizioni operative adottate. Le prove hanno permesso di determinare la quantità di proteina adsorbita ed eluita dal supporto, in modo da ottenere informazioni sulla capacità dinamica di adsorbimento e sul recupero della biomolecola per ogni set di membrane. In tutti i casi esaminati, si è verificato un calo in termini di quantità di massa adsorbita da un ciclo al successivo. Per il set PTA-OH 65:35 si ottengono basse capacità di adsorbimento ma alti valori di recupero, anche se, essendo le quantità in gioco molto piccole, è possibile che piccole differenze nelle procedure usate durante l’elaborazione dei dati, per esempio nell’integrazione dei picchi, provochino variazioni non trascurabili sull’esito dei risultati; il set PTA-OH 70:30, mostra valori di DBC maggiori, fino all’80% più alti rispetto al set precedente, mentre i valori di recupero di lisozima calano: questa ovviamente è una delle cause per le quali la quantità di proteina adsorbita da un ciclo al successivo diminuisce. Le maggiori capacità di adsorbimento riscontrate con il set PTA-OH 70:30 potrebbero essere direttamente correlate al maggiore grado di vuoto che lo caratterizza: più è alto  $\epsilon$ , maggiore sarà la superficie a disposizione del “ligando”, i gruppi ionici, e, quindi, maggiore sarà il quantitativo proteico che può essere trattenuto dal supporto durante la fase di adsorbimento.

In generale, le membrane PTA-OH mostrano scarse capacità dinamiche ma sono supporti in fase di ottimizzazione: la loro caratterizzazione è solo all'inizio.

Infine, sono stati eseguiti cicli cromatografici in condizioni dinamiche con le membrane SartoBind S: dal primo al terzo ciclo, si verifica uno spostamento della curva di breakthrough verso sinistra: questo significa che la massa adsorbita sarà maggiore nel ciclo I, per andare a diminuire nei cicli successivi, comportamento in generale caratteristico di ogni supporto cromatografico, ma che dovrebbe essere migliorato in modo da evitare un calo delle prestazioni. Poiché in questo caso non è stato possibile ottenere valori affidabili in termini di massa adsorbita, a causa di problemi legati probabilmente al lettore UV dell'FPLC, sono stati valutati dei valori minimi di massa adsorbita dal supporto, e, quindi, dei valori minimi di DBC. Si tratta ovviamente di dati puramente indicativi, ma sufficienti per evidenziare la grande differenza fra queste membrane commerciali e le membrane PTA-OH: le capacità di adsorbimento risultano ora molto più alte, passando da valori pari a circa a 1,8 mg/mL (set PTA-OH 70:30) fino a valori di 14 mg/mL (essendo quest'ultimo dato una stima del valore minimo di DBC per le membrane SartoBind S). Non è stato possibile determinare i valori di recupero, e non è quindi fattibile un confronto con i set di membrane precedentemente studiati.

Le ricerche future devono essere mirate al completamento della caratterizzazione dei supporti SartoBind S e, in particolare, allo studio del comportamento in caso di miscele, come il siero. E' possibile combinare più processi cromatografici in serie: per esempio, potrebbe essere eseguito un ciclo di purificazione con membrane a scambio cationico seguito da un ciclo di purificazione con membrane a scambio anionico, come le SartoBind Q. Infine, nell'ambito dei processi cromatografici di affinità, la ricerca dovrebbe proseguire con lo studio del complesso HPTA-2LP, provando la validità del protocollo di immobilizzazione dei gruppi amminici definito durante questo lavoro di tesi ed utilizzando miscele come soluzione di alimentazione; un'altra possibile strada da percorrere, prevede l'utilizzo di uno spaziatore, differente dal 2LP, tale da non indurre il fenomeno dell'adsorbimento non specifico; in particolare, gli studi futuri potrebbero essere incentrati sulla caratterizzazione di membrane di affinità con il complesso TRZ-HPTA, in quanto lo spaziatore 1,2,3-triazolo ha già dato risultati promettenti in combinazione con altri ligandi.

Sono quindi molti i campi di ricerca ancora aperti, tutti con il fine comune di identificare i materiali ed i metodi più opportuni che permettano di purificare, nel modo più economico

possibile, queste preziose molecole, così da sostenere la crescita dei prodotti a scopo terapeutico a base di anticorpi monoclonali e soddisfare la richiesta di mercato.

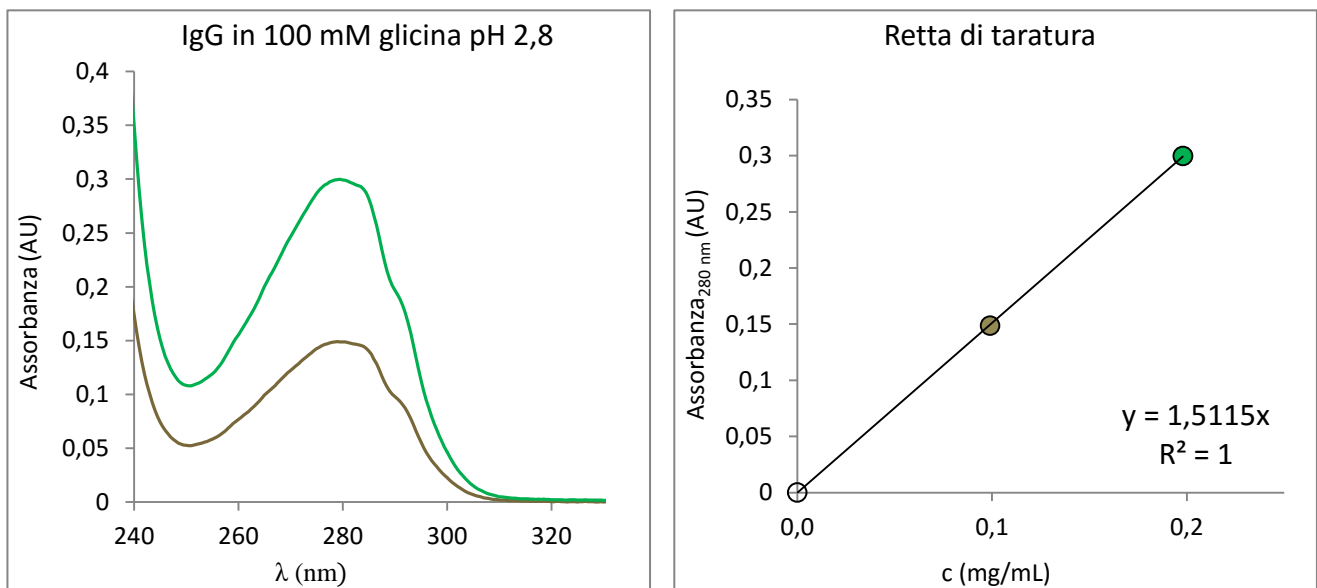


# APPENDICE

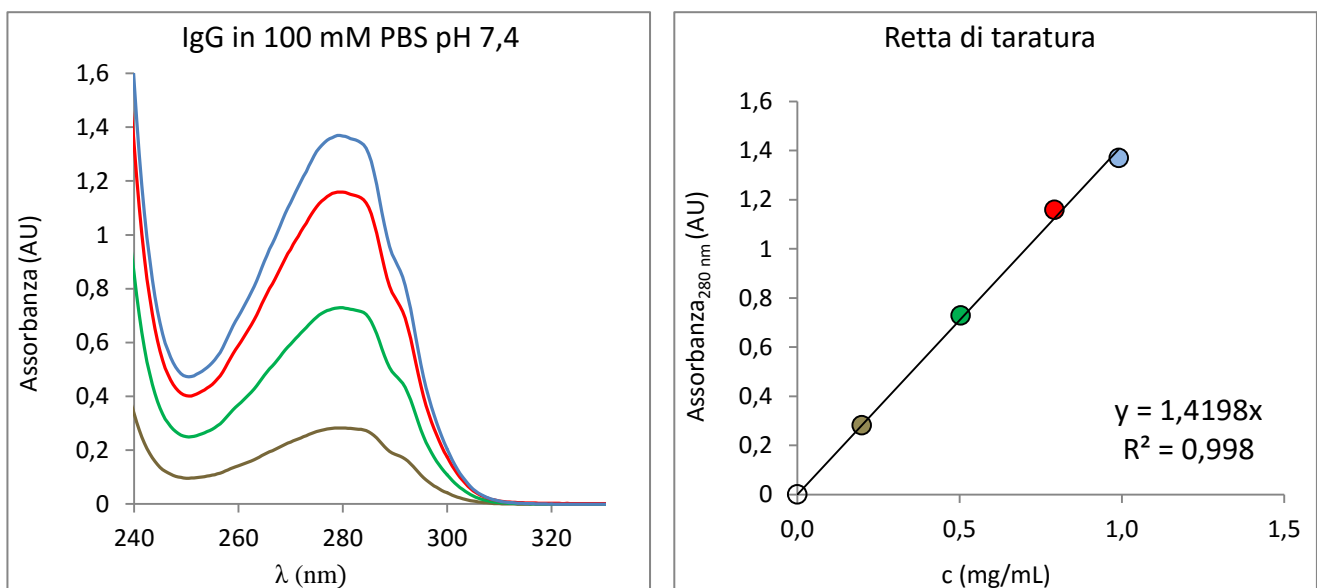
## A. CURVE DI CALIBRAZIONE

### A.1 Spettroscopia di assorbimento nell'UV-visibile

– IgG

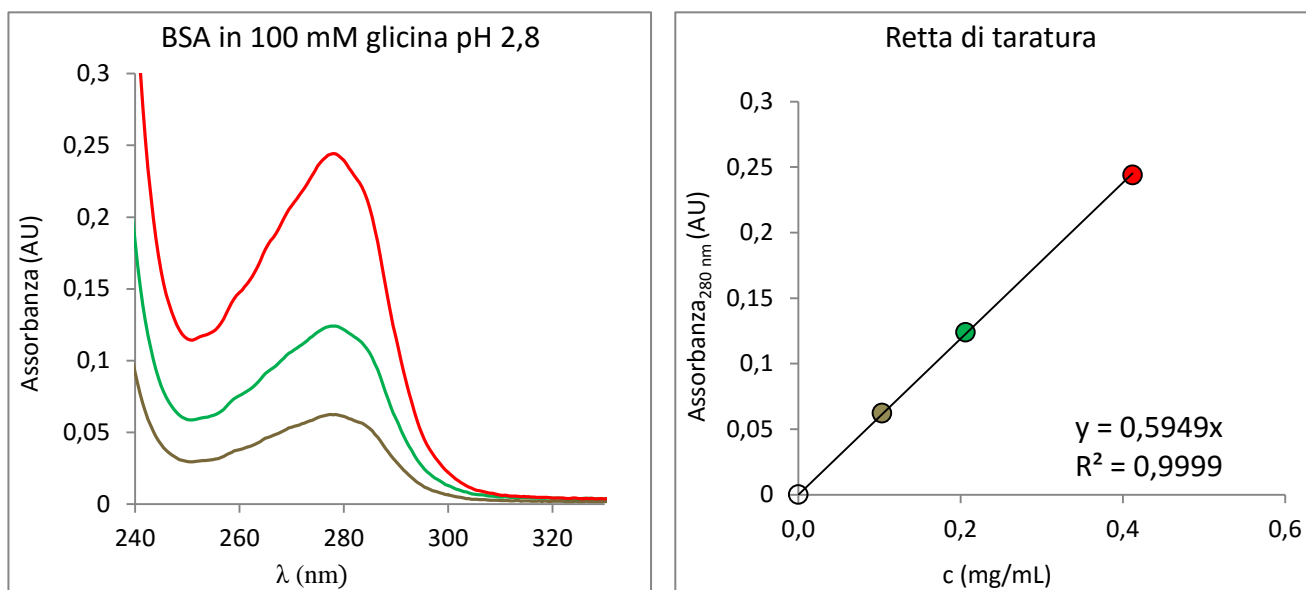


**Figura 1:** Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per le IgG in 100 mM glicina pH 2,8.

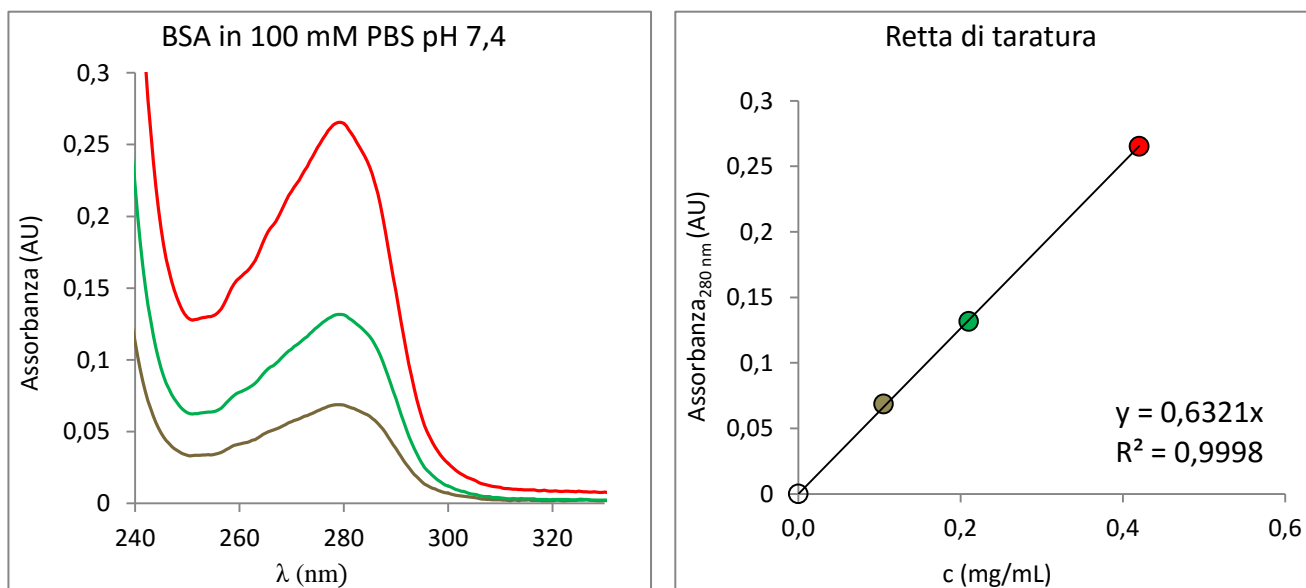


**Figura 2:** Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per le IgG in 100 mM PBS pH 7,4.

– BSA



**Figura 3:** Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per la BSA in 100 mM glicina pH 2,8.



**Figura 4:** Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per la BSA in 100 mM PBS pH 7,4.

– Liozima

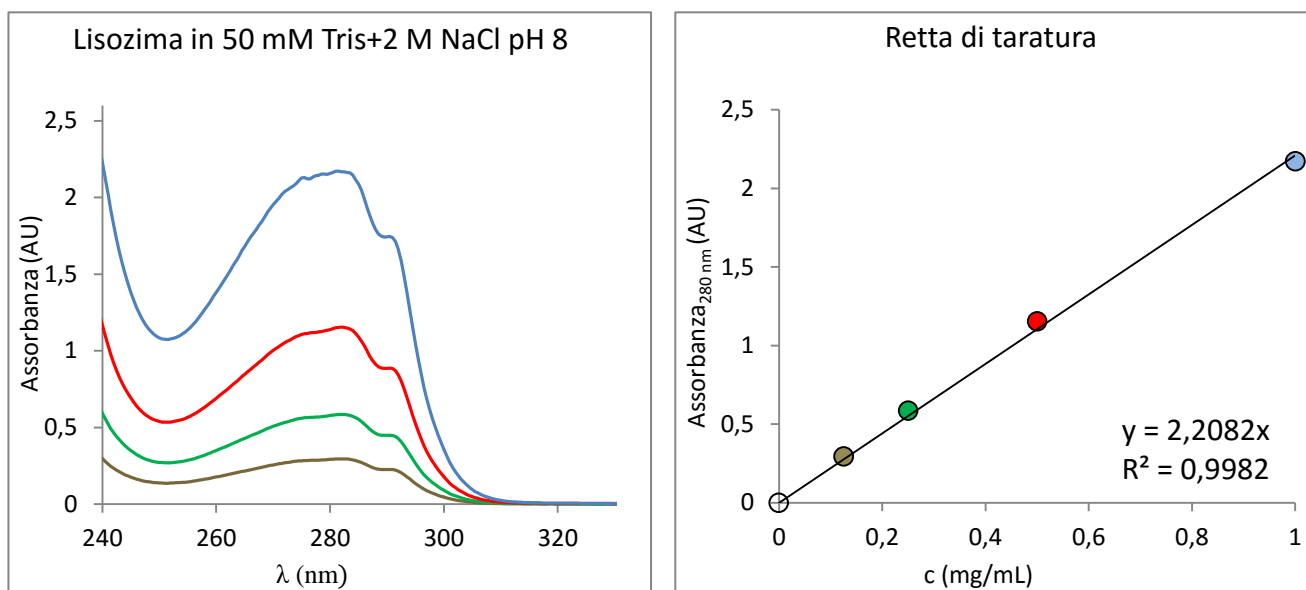


Figura 5: Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per il liozima in 50 mM Tris+2 M NaCl pH 8.

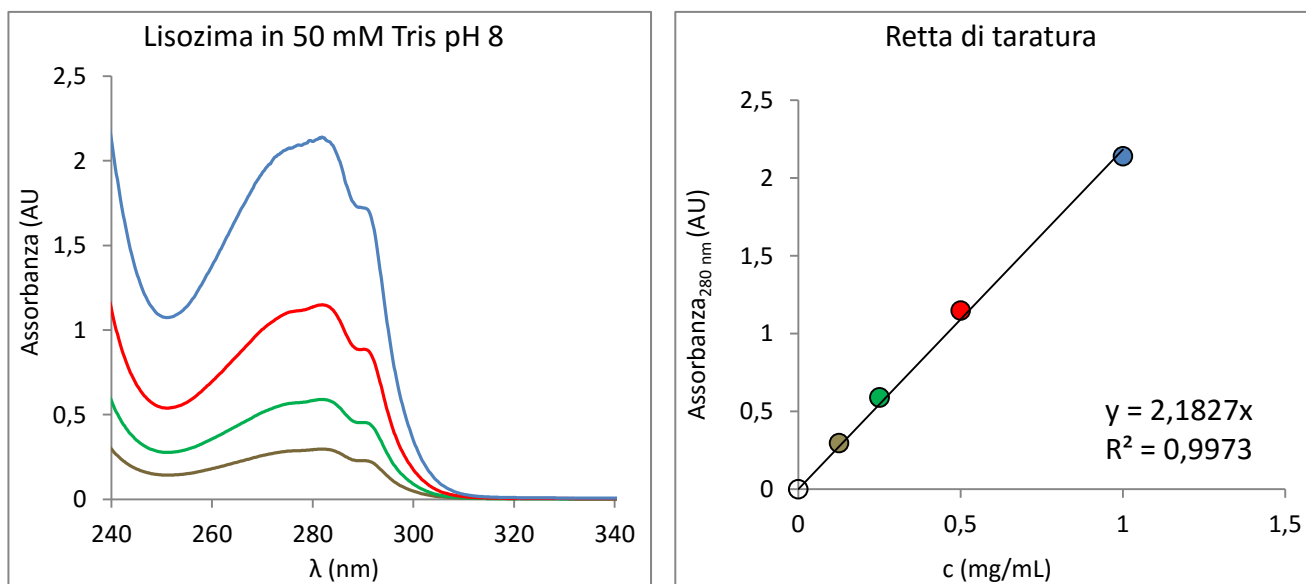
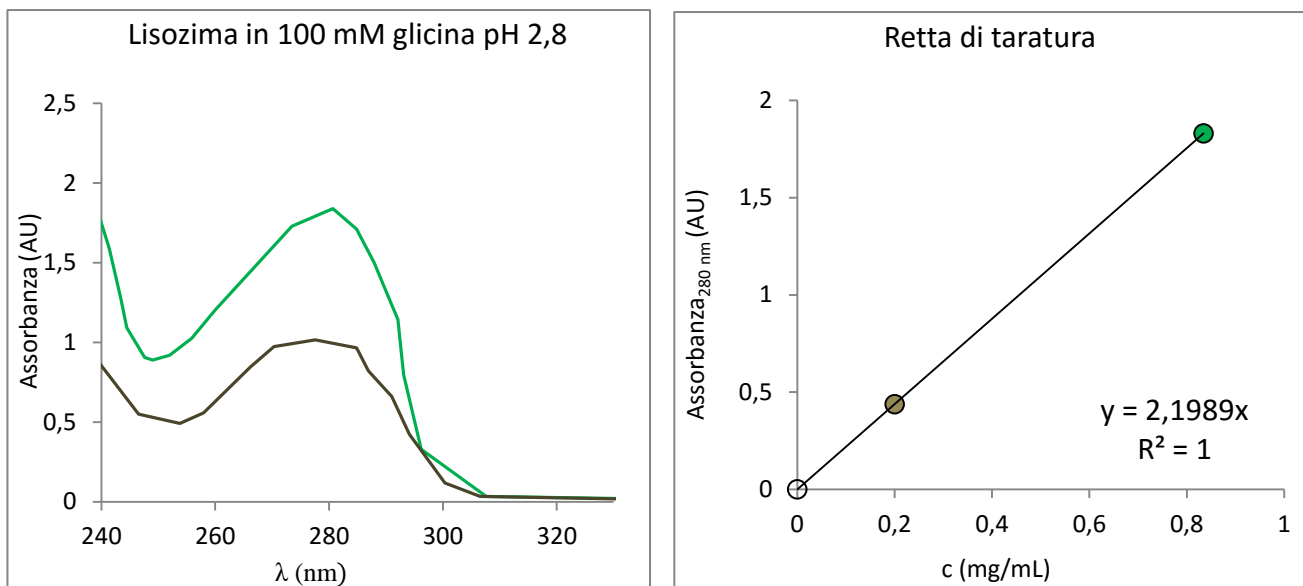
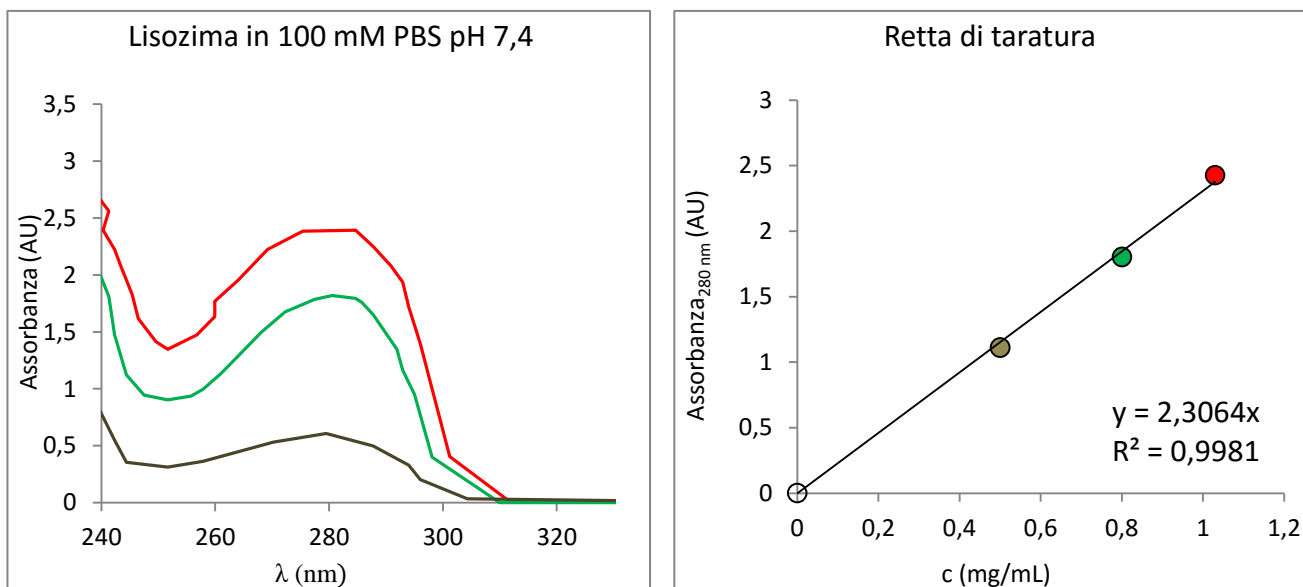


Figura 6: Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per il liozima in 50 mM Tris pH 8.



**Figura 7:** Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per il lisozima in 100 mM glicina pH 2,8.



**Figura 8:** Curva di calibrazione relativa allo spettrofotometro UV per il lisozima in 100 mM PBS pH 7,4.

Nota: alcune rette di taratura derivano da analisi svolte precedentemente a questo lavoro di tesi: Tesi di Laurea Magistrale in Chemical and Process Engineering di F. Brienza, Preparation and characterization of affinity membranes for IgG purification [24].

## A.2 HPLC: COLONNA PROTEINA A

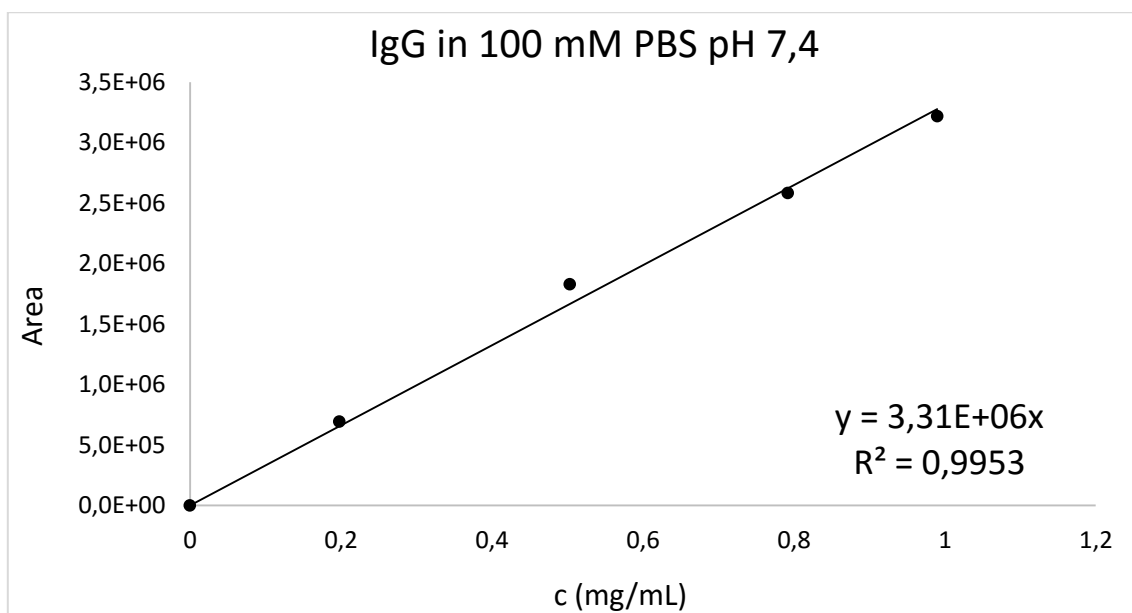


Figura 9: Curva di calibrazione relativa alla colonna proteina A per le IgG in 100 mM PBS pH 7,4.

## A.3 SAGGIO DEL BCA

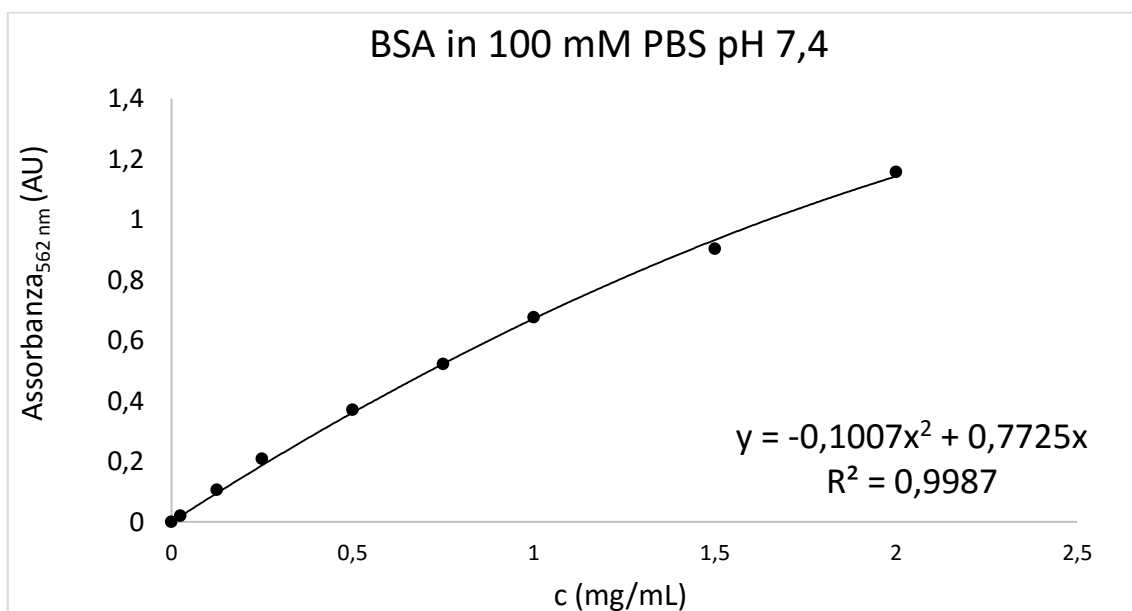


Figura 10: Curva di calibrazione relativa al saggio del BCA per la BSA in 100 mM PBS pH 7,4.

## B. COMPOSIZIONE DELLE SOLUZIONI UTILIZZATE NELLE ANALISI CON L'HPLC

Composizioni dei tamponi per la quantificazione di IgG attraverso cromatografia di affinità con proteina A:

- Tampone A (di adsorbimento):

Dosi per 2 litri: 2,76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 17,54 g  $\text{NaCl}$ .

Sciogliere i sali in circa 1,8 L di acqua Milli-Q;

portare ad un valore di pH pari a 8 usando una soluzione di  $\text{NaOH}$  5 M e a pH 8,5 usando una soluzione di  $\text{NaOH}$  1 M;

portare a volume aggiungendo acqua Milli-Q;

filtrare la soluzione con un filtro Millipore da 0,45  $\mu\text{m}$ .

- Tampone B (di eluizione):

Dosi per 1 litro: 8,77 g  $\text{NaCl}$  e 1 mL  $\text{HCl}$  12 M.

Sciogliere il sale in circa 950 mL di acqua Milli-Q;

portare a volume aggiungendo acqua Milli-Q;

filtrare la soluzione con un filtro Millipore da 0,45  $\mu\text{m}$ ;

aggiungere l'acido cloridrico alla soluzione.

- Tampone C (di stoccaggio della colonna):

Dosi per 1 litro: 1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 200 mg  $\text{NaN}_3$ .

Sciogliere le due sostanze in circa 900 mL di acqua Milli-Q;

portare ad un valore di pH pari a 7,4 usando una soluzione di  $\text{NaOH}$  2 M;

portare a volume aggiungendo acqua Milli-Q;

filtrare la soluzione con un filtro Millipore da 0,45  $\mu\text{m}$ .

- Tampone D (di diluizione, necessario per concentrazioni maggiori di 0,4 mg/mL):

Dosi per 100 mL: 5 mL di “dilution buffer stock solution” e 95 mL del tampone A.

Preparazione del “dilution buffer stock solution”:

Dosi per 100 mL: 1 g polisorbato 80 e 100 mL tampone A.

Sciogliere il polisorbato in 90 mL di tampone A;

portare a volume aggiungendo il tampone A.

Composizioni dei tamponi per l'esecuzione delle analisi con la colonna SEC:

– Tampone A:

Dosi per 1 litro: 17,53 g NaCl e 13,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Sciogliere in circa 800 mL di acqua Milli-Q;

portare a volume aggiungendo acqua Milli-Q.

filtrare la soluzione con un filtro Millipore da 0,45 µm.

– Tampone B:

Dosi per 1 litro: 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 17,53 g NaCl.

Sciogliere in circa 800 mL di acqua Milli-Q;

portare a volume aggiungendo acqua Milli-Q.

Aggiungere il tampone A al tampone B fino a raggiungere un pH pari a 6,7;

aggiungere 0,5 g di NaN<sub>3</sub>;

filtrare la soluzione con un filtro Millipore da 0,45 µm.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Ettre, *M. S. Tswett and the invention of Chromatography*, LCGC North America, 21, 2003, 458-467.
- [2] K. Huse, H. J. Böhme, G. H. Scholz, *Purification of antibodies by affinity chromatography*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 51, 3, 2002, 217–231.
- [3] P. K. Ng, M. A. Snyder, *pH-based cation exchange chromatography in the capture and elution of monoclonal antibodies*, Journal of Separation Science, 35, 2012, 29–35.
- [4] J. M. Reichert, C. J. Rosensweig, L. B. Faden, M. C. Dewitz, *Monoclonal antibody successes in the clinic*, Nature Biotechnology, 23, 2005, 1073-1078.
- [5] D. M. Ecker, S. D. Jones, H. L. Levine, *The therapeutic monoclonal antibody market*, MAbs, 7, 2015, 9-14.
- [6] S. S. Farid, *Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture*, Journal of Chromatography B, 848, 2007, 8-18.
- [7] S. Dimartino, *Studio sperimentale e modellazione della separazione di proteine con membrane di affinità*, Tesi di Dottorato di Ricerca in Ingegneria Chimica dell’Ambiente e della Sicurezza XXI Ciclo, Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Bologna, 2009.
- [8] S. Dimartino, C. Boi, G. C. Sarti, *Influence of protein adsorption kinetics breakthrough broadening in membrane affinity chromatography*, Journal of Chromatography A, 1218, 2011, 3966-3972.
- [9] V. Girard, N. J. Hilbold, C. K. S. Ng, L. Pegon, W. Chahima, F. Rousset, V. Monchois, *Large-scale monoclonal antibody purification by continuous chromatography, from process design to scale-up*, Journal of Biotechnology, 213, 2015, 65-73.
- [10] A. A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, D. Low, *Downstream processing of monoclonal antibodies-application of platform approaches*, Journal of Chromatography B, 848, 2007, 28-39.
- [11] L. Blain, *Protein A: The life of a disruptive technology*, Bioprocess International, 11 (8), 2013, 29-38.



- [12] C. Boi, *Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibodies purification*, Journal of Chromatography B, 848, 2007, 19-27.
- [13] M. O. Herigstad, S. Dimartino, C. Boi, G. C. Sarti, *Experimental characterization of the transport phenomena, adsorption, and elution in a protein A affinity monolithic medium*, Journal of Chromatography A, 1407, 2015, 130-138.
- [14] C. Boi, S. Dimartino, *Advances in Membrane Chromatography for the Capture Step of Monoclonal Antibodies*, Current Organic Chemistry, 20, 2016, 1-7.
- [15] I. Sjöholm, A. Bjerken, J. Sjöquist, *Protein A from Staphylococcus Aureus. The Effect of Nitration of Protein A with Tetranitromethane and subsequent reduction*, The Journal of Immunology, 110, 6, 1973, 1562-1569.
- [16] H. F. Liu, J. Ma, C. Winter, R. Bayer, *Recovery and purification process development for monoclonal antibody production*, MAbs, 2, 2010, 480-499.
- [17] G. Bayramoglu, H. A. Oktem, M. Y. Arica, *A dye-ligand immobilized poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membrane used for adsorption and isolation of immunoglobulin G*, Biochemical Engineering Journal, 34 (2), 2007, 147-155.
- [18] C. Boi, S. Dimartino, G. C. Sarti, *Modelling and simulation of affinity membrane adsorption*, Journal of Chromatography A, 1162, 2007, 24-33.
- [19] T. Barroso, M. Temtem, A. Hussain, A. Aguiar-Ricardo, A. C. A. Roque, *Preparation and characterization of a cellulose affinity membrane for human immunoglobulin G (IgG) purification*, Journal of Membrane Science, 348, 2010, 224-230.
- [20] C. Boi, R. Facchini, M. Sorci, G. C. Sarti, *Characterization of affinity membranes for IgG separation*, Desalination, 199, 2006, 544-546.
- [21] C. Boi, G. C. Sarti, *Development and characterization of affinity membranes for immunoglobulin purification*, Separation Science and Technology, 42, 2007, 2987-3001.
- [22] C. Boi, S. Dimartino, G. C. Sarti, S. Williams, S. Hofer, J. Horak, W. Lindner, *Influence of different spacer arms on Mimetic Ligand™ A2P and B14 membranes for human IgG purification*, Journal of Chromatography B, 879, 2011, 1633-1640.
- [23] C. Boi, C. Algeri, G. C. Sarti, *Preparation and characterization of polysulfone affinity membranes bearing a synthetic peptide ligand for the separation of murine immunoglobulins*, Biotechnology Progress, 24, 2008, 1304-1313.

- [24] Filippo Brienza, *Preparation and characterization of affinity membranes for IgG purification*, Tesi di Laurea Magistrale in Chemical and Process Engineering, Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Bologna, 2014-2015.
- [25] D. Yu, M. D. McLean, J. C. Hall, R. Ghosh, *Purification of monoclonal antibody from tobacco extract using membrane-based bioseparation techniques*, Journal of Membrane Science, 323, 2008, 159-166.
- [26] H. F. Tong, D. Q. Lin, X. M. Yuan, S. J. Yao, *Enhancing IgG purification from serum albumin containing feedstock with hydrophobic charge-induction chromatography*, Journal of Chromatography A, 1244, 2012, 116-122.
- [27] T. Müller-Späth, G. Ströhlein, L. Aumann, H. Kornmann, P. Valax, L. Delegrange, E. Charbaut, G. Baer, A. Lamproye, M. Jöhnck, M. Schulte, M. Morbidelli, *Model simulation and experimental verification of a cation-exchange IgG capture step in batch and continuous chromatography*, Journal of Chromatography A, 1218, 2011, 5195-5204.
- [28] V. Ilić, S. Mojsilović, D. Marković, I. Maslovarić, N. Milošević-Jovčić, *Anion exchange chromatographic distribution of human monoclonal immunoglobulin G is determined by heavy chain subclass and level of sialic acid expression*, Hemijska Industrija, 66, 2012, 531–540.
- [29] M. Urmann, H. Graalfs, M. Joehnck, L. R. Jacob, C. Frech, *Cation exchange chromatography of monoclonal antibodies*, MAbs, 2, 2010, 395–404.
- [30] R. K. Scopes, *Protein Purification – Principles and Practice*, 2<sup>nd</sup> edition, Springer-Verlang, 1987.
- [31] S. Paul-Dauphin, F. Karaca, T. J. Morgan, M. Millan-Agorio, A. A. Herod, R. Kandiyoti, *Probing Size Exclusion Mechanisms of Complex Hydrocarbon Mixtures: The Effect of Altering Eluent Compositions*, Energy & Fuels, 21, 6, 3484–3489.
- [32] A. D. Mc Naught and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology*, 2<sup>nd</sup> ed. (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [33] J. P. Foley and J. G. Dorsey, *Equations for Calculation of Chromatographic Figures of Merit for Ideal and Skewed Peaks*, Analytical Chemistry, 55, 1983, 730-737.
- [34] Paul Cutler, *Size-Exclusion Chromatography*, in John M. Walker, R. Rapley Molecular Biomethods Handbook, Humana Press, 2<sup>nd</sup> Edition, 2008.

- [35] [slideplayer.it / slide / 2317917 /](http://slideplayer.it / slide / 2317917 /), Immagine: *Cromatografia per Esclusione Molecolare o Filtrazione su Gel*, (accesso il 10-12-2016).
- [36] GE Healthcare, *Size Exclusion Chromatography: principles and methods*, Milano, Italia, 2010.
- [37] D. Green, R. Perry, *Perry's Chemical Engineer's Handbook*, 8<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill, New York, 2008.
- [38] GE Healthcare, *Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography*, Milano, Italia, 2010.
- [39] T. Chen, K. Zhang, J. Gruenhagen, C. D. Medley, *Hydrophobic Interaction Chromatography for Antibody Drug Conjugate Drug Distribution Analysis*, American Pharmaceutical Review, 2015.
- [40] A. Mehta, *Principle of Reversed-Phase Chromatography HPLC/UPLC*, PharmaXChange.info, 2012, (accesso il 10-12-2016).
- [41] [en.wikibooks.org / wiki / Proteomics / Protein \\_ Separations \\_ - \\_ Chromatography / Reversed \\_ Phase](http://en.wikibooks.org / wiki / Proteomics / Protein _ Separations _ - _ Chromatography / Reversed _ Phase), Immagine: *Protein Separations-Chromatography, Reversed Phase* (accesso il 10-12-2016).
- [42] F. Salvato, M. C. da Cruz Gallo de Carvalho and A. de Lima Leite, *Strategies for Protein Separation*, in: Hon-Chiu Eastwood Leung, Tsz-Kwong Man, Ricardo J. Flores, *Integrative Proteomics*, InTech, 2012.
- [43] GE Healthcare, *Ion exchange chromatography and chromatofocusing: Principles and methods*, Milano, Italia, 2010.
- [44] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 2010.
- [45] [slideplayer.it/slide/5658869/](http://slideplayer.it/slide/5658869/), Immagine: *Cromatografia a Scambio Ionico*, (accesso il 10-12-2016).
- [46] S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno, *Ion-exchange chromatography of proteins, Chromatographic Science Series*, Volume 43, Marcel Dekker INC., New York, 1988.
- [47] [www.bio - rad.com / it - it / applications - technologies / anion - exchange - chromatography](http://www.bio - rad.com / it - it / applications - technologies / anion - exchange - chromatography), Immagine: *Anion Exchange Chromatography*, (accesso il 10-12-2016).

- [48] M. Kastner, *Protein Liquid Chromatography*, Journal of Chromatography Library, Volume 61, Elsevier, Amsterdam, 2000.
- [49] [www.sigmaaldrich.com / content / dam / sigma – aldrich / life – science / proteomics – and – protein / proteomics/chromatography\\_ion\\_exchange.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/proteomics-and-protein/proteomics/chromatography_ion_exchange.pdf), Tabella: *Ion Exchange Media*, (accesso il 9-12-2016).
- [50] H. L. Knudsen, R. L. Fahrner, Y. Xu, L. A. Norling, G. S. Blank, *Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification*, Journal of Chromatography A, 907, 2001, 145-154.
- [51] F. Dechow, *Separation and Purification Techniques in Biotechnology*, Noyes Publication, Park Ridge, 1989.
- [52] Mirco Sorci, *Membrane di affinità per la purificazione di biomolecole*, Tesi di Dottorato di Ricerca in Ingegneria Chimica dell’Ambiente e della Sicurezza XVIII ciclo, Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Bologna, 2006.
- [53] [slideplayer.com/slide/1669271/](http://slideplayer.com/slide/1669271/), Immagine: *Affinity Chromatography*, (accesso il 9-12-2016).
- [54] A. Tejada Mansir, R. M. Montesinos, R. Guzman, *Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 49, 1-3, 2001, 1-28.
- [55] C. E. Schwartz, J. M. Smith, *Flow distribution in packed beds*, Industrial and Engineering Chemistry, 45, 1953, 1209–1218.
- [56] S. M. White, C. L. Tien, *Analysis of flow channeling near the wall in packed beds*, Heat and Mass Transfer, 21, 1987, 291-296.
- [57] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, *Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 49, 2001, 199-240.
- [58] A. Zochling, R. Hahnl, K. Ahrerl, J. Urthaler, A. Jungbauer, *Mass transfer characteristics of plasmids in monoliths*, Journal of Separation Science, 2004, 27, 819-827.
- [59] J. Urthaler, R. Schlegl, A. Podgornik, A. Strancar, A. Jungbauer, R. Necina, *Application of monoliths for plasmid DNA purification. Development and transfer to production*, Journal of Chromatography A, 2005, 1065, 93-106.

- [60] M. R. Etzel, Layered Stacks in F. Svec, T. B. Tennikova, Z. Debyl, *Monolithic Materials*, Journal of Chromatography Library, 67, 2003, 213-233.
- [61] S. Y. Suen, M. R. Etzel, *A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations*, Chemical Engineering Science, 47, 1992, 1355-1364.
- [62] H. C. Liu, J. R. Fried, *Breakthrough of lysozyme through an affinity membrane of cellulose-cibacron blue*, AIChE Journal, 40, 1994, 40-49.
- [63] R. Ghosh, *Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges*, Journal of Chromatography A, 952, 2002, 13-27.
- [64] E. Klein, *Affinity Membranes: Their Chemistry and Performance in Adsorptive Separation Processes*, John Wiley and Sons, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK, 1991.
- [65] P. Cuatrecasas, *Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads*, Journal of Biological Chemistry, 245, 1970, 3059-3065.
- [66] A. I. Liapis, K. K. Unger, *Highly selective separations in Biotechnology, The Chemistry and Engineering of affinity chromatography*, G. Street, Middlesbrough (UK), 1994.
- [67] A. R. Newcombe, C. Cresswell, S. Davies, K. Watson, G. Harris, K. O'Donovan, R. Francis, *Optimized affinity purification from hyper immunized ovine serum using a synthetic protein A adsorbent MAbsorbent® A2P*, Journal of Chromatography B, 814, 2005, 209-215.
- [68] M. Racchi, *Gli anticorpi monoclonali in terapia*, Dipartimento di Farmacologia Sperimentale ed Applicata, Università di Pavia, Aggiornamento Scientifico, 2007.
- [69] A. H. Lichtman, A. K. Abbas, S. Pillai, *Le basi dell'immunologia: Fisiopatologia del sistema immunitario*, IV Edizione, Edra Masson, Milano, 2015.
- [70] H. W. Schroeder Jr., L. Cavacini, *Structure and Function of Immunoglobulins*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125, 2010, 41-52.
- [71] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller, *Microbiologia Medica*, VII Edizione, Edra Masson, Milano, 2011.
- [72] J. Woof, D. Burton, *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*, Nature Reviews Immunology, 4, 2004, 89-99.
- [73] [www . elisa - antibody . com / elisa - antibody / elisa - antibody - structure](http://www.elisa-antibody.com/), *Immagine: Antibody Structure*, (accesso il 10-12-2016).

- [74] A. Salpietro, G. E. Calabrò, I. Loddo, L. Colavita, L. Grasso, P. Vicchio, R. Mallamace, V. Chirico, V. Ferrà, C. Cuppari, S. Briuglia, R. Gallizzi, *Deficiency of IgG subclasses: history and current*, Italian Journal of Genetic and Pediatric Immunology, 3, 2009.
- [75] G. Köhler, C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, Nature, 256, 5517, 1975, 495-497.
- [76] study.com / academy / lesson / monoclonal – vs – polyclonal – antibodies – definition – production.html, Immagine: *Polyclonal Antibody Production*, (accesso il 10-12-2016).
- [77] M. Leenaars, C. F. M. Hendriksen, *Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations*, ILAR Journal, 46, 2005, 269-279.
- [78] D. Sadava, H. Heller, G. H. Orians, W. K. Purves, D. M. Hillis, *Biologia. La Scienza della Vita*, Zanichelli, Bologna, 2010.
- [79] Nicola Lo Buono, *Nuovo approccio metodologico per la produzione di IgG monoclonali umane per impieghi clinici: anticorpi anti-citomegalovirus*, Tesi di Laurea Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Torino, 2005-2006.
- [80] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*, Nature, 348, 1990, 552 – 554.
- [81] K. J. Jeong, S. H. Jang, N. Velmurugan, *Recombinant antibodies: Engineering and production in yeast and bacterial hosts*, Biotechnology Journal, 2011, 6, 16–27.
- [82] S. Jolles, W. A. C. Misbah, *Clinical uses of intravenous immunoglobulin*, *Clinical and Experimental Immunology*, 142, 2005, 1-11.
- [83] Sartorius, *SartoBind® Epoxy Sheet*, A Separation Technology Based on Microporous Membranes, Operating Instructions.
- [84] C. Boi, E. Lalli, G. C. Sarti, G. Giovenzana, C. Cavallotti, *Insights on ligand-protein interactions in affinity membranes for antibody purification*, AIChE 2016 Annual Meeting, San Francisco, CA, Nov 13-18, 2016.
- [85] S. Chisca, M. Torsello, M. Avanzato, Y. Xie, C. Boi and S. P. Nunes, *Highly porous polytriazole ion exchange membranes from solutions in non-toxic solvents*, submitted to Polymer, November 2016.

- [86] C. Boi, M. Avanzato, M. Torsello, S. Chisca, S. Nunes, *Novel Polytriazole Ion-exchange Membranes for Protein Purification*, AIChE 2016 Annual Meeting, San Francisco, CA, Nov 13-18, 2016.
- [87] Sartorius Stedim Biotech, *Sartobind® Ion Exchange Sheet*, A Separation Technology Based on Microporous Membranes, Operating Instructions.
- [88] Octapharma, *Gammanorm® Human Normal Immunoglobulin*, Product Information.
- [89] [www.pathologyharmony.co.uk/graphics/Pathology % 20Harmony % 20II % 20 % 20for % 20web.pdf](http://www.pathologyharmony.co.uk/graphics/Pathology%20Harmony%20II%20%20for%20web.pdf), Tabella: *Harmonisation of Reference Intervals*, (accesso il 3-12-2016).
- [90] R. K. Scopes, *Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm*, *Analytical Biochemistry*, 1974, 277-282.
- [91] Ferdinand Friedrich, *Mem. Soc. Imperiale Naturalistes de Moscou*, vol. 2, 1809, 327.
- [92] C. A. Russell, G. K. Roberts, *Chemical history: reviews of the recent literature*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), 2005.
- [93] M. M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, 248-254.
- [94] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*, *Analytical Biochemistry*, 150, 1985, 76-85.
- [95] Thermo Scientific, *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, User Guide.
- [96] D. Giri, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications*, *Biochemistry*, 2015.
- [97] Sigma-Aldrich, *Lysozyme from chicken egg white for Molecular Biology*, Product Information.
- [98] F. H. Arnold, H. W. Blanch, C. R. Wilke, *Liquid Chromatography plate height equations*, *Journal of Chromatography A*, 330, 1985, 159-166.