



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA**

MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE CURVAS DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS EN CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCIÓN QUÍMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

GABRIELA DANIELA SANDOVAL HEVIA

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL DE 2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE CURVAS DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS EN CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCIÓN QUÍMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

GABRIELA DANIELA SANDOVAL HEVIA

**PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BARBARA ANDREWS FARROW
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
IVÁN RAPAPORT ZIMERMANN
ANDREA MAHN OSSES**

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL DE 2011

A mis padres y esposo

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta primera etapa en esta universidad quiero dar las gracias a quienes han hecho posible la realización de este trabajo. A mi profesor guía, Dr. Juan Asenjo, por confiar en mí cuando mi propia confianza estaba debilitada y a la Iniciativa Científica Milenio por su financiamiento (ICM-P05-001-F). A los miembros de mi comisión: Dra. Barbara Andrews, Dra. María Elena Lienqueo, Dra. Andrea Mahn y Dr. Iván Rapaport por sus valiosos comentarios y recomendaciones. A la Dra. Carolina Shene por introducirme al tema de la modelación matemática aplicada a cromatografías y por guiarme al inicio de este trabajo. Al Dr. Pablo Moisset por ayudarme a entender la metodología de discretización que utilicé, haciendo parecer todo muchísimo más sencillo y a Nancy Carrasco por enseñarme a realizar cromatografías y por estar siempre ahí cuando aparecía alguna duda existencial. Siempre pudiste aliviar mis problemas.

Quiero agradecer a quienes me acompañaron cuando empezaba este trabajo una y otra vez. A mis amigas de doctorado: Cami, Dani S., Gianni, Fran y Vida, su compañía y comprensión fue lejos uno de los apoyos más importantes para mí en esta época tan estresante. Con ustedes redescubrí aquello que en algún momento pensé que no volvería a encontrar. Su amistad fue uno de los más preciados regalos que me llevo luego de estos dos años de trabajo.

A quienes me acompañaron desde Plan Común: Seba, Dani R., Felipe y Javier. Ustedes permitieron que mis primeros años en esta universidad fueran más llevaderos. Reunirme con ustedes era una bonita razón para asistir a clases. A mis amigas de la carrera: Coni y Dani B., fueron compañeras increíbles. Siempre fue un gusto y una alegría estudiar y trabajar con ustedes. Todo era mucho más claro y entretenido cuando estudiábamos e incluso madrugábamos juntas. Pablo, Lore y Óscar le entregaron a mi paso por el pregrado una visión más tranquila, cada uno a su modo. No puedo dejar de mencionar el increíble equipo que conformamos para taller: Dani B. y Seba, les agradezco por haber sido mis compañeros en esa época y por dejarme una bonita sensación de lo que es trabajar en equipo. Siento que siempre trabajamos codo a codo y el resultado fue increíble (literalmente). Gracias a cada uno de ustedes por acompañarme en mi paso por el pregrado y por regalarme bonitos recuerdos y bonitos sentimientos.

Quiero agradecer a mis padres por apoyarme siempre en mis estudios y en todas las actividades que realicé desde pequeña. A mi madre por obligarme a despertar por las mañanas y por preocuparse por lo que comería durante el día o cuando llegara a casa cansada por las noches. A mi padre porque también me ayudó a despertar por las mañanas (no es tarea fácil), por llevarme cada día a la universidad y por impulsar mis ganas de ser siempre mejor mediante el ejemplo. A mis hermanos que sin proponérselo me impulsaron a levantarme cuando los resultados a nivel académico eran bastante negativos. Si ustedes se lo proponen, ustedes también pueden lograrlo. A mi familia completa por emprender el viaje a Santiago y acompañarme en esta aventura. Gracias por estar siempre ahí y agregarle condimento a mi vida. A mis abuelos, yiya y tata, por acogerme en su hogar durante mi último año de colegio y por permitirme cerrar bien esa etapa de mi vida. Gracias porque eso me ayudó a ver a mis padres y hermanos de manera distinta y gracias porque ese año fui muy feliz. Creo que ese tiempo no pudo haber sido mejor. Gracias a todos ustedes por la alegría que me entregan al ver que poseo una linda familia, siempre unida y acogedora.

Finalmente, quiero agradecer mi compañero desde primer año y el amor de mi vida, mi esposo Andrés. Tú llegaste a llenar el vacío que dejaron mis amigas de Linares y me has hecho inmensamente feliz desde que te conocí. Te amo con todo mi corazón y quiero darte las gracias por esas peleas en las que tratabas de ayudarme a sacar adelante este trabajo. Gracias por entenderme esas semanas en las que estaba escribiendo mi borrador y andaba más insoportable que nunca aunque estábamos recién casados. Gracias de verdad.

Santiago, Marzo de 2011

“MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE CURVAS DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS EN CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD”

La purificación cromatográfica de proteínas es una de las técnicas de separación más utilizadas en el proceso de purificación de productos biológicos, ya sea para usos terapéuticos o catalíticos. Estos procesos utilizan para la separación propiedades como la carga, la hidrofobicidad y la bioafinidad por determinados ligandos fijados a una matriz. Esta última cromatografía resulta ser la más específica.

Modelos matemáticos que simulan y optimizan los procesos de separación cromatográfica, contribuyen con la disminución de los costos asociados al diseño de dichas etapas, puesto que permiten optimizar las condiciones de operación computacionalmente, invirtiendo mucho menos tiempo y recursos en su determinación experimental.

En este trabajo se investigó la utilización de un modelo general de balances de masa, consistente en dos conjuntos de ecuaciones diferenciales parciales -para los balances de masa en la fase móvil y en el líquido estancado al interior de la partícula- acopladas con una ecuación diferencial ordinaria -que describe la cinética de adsorción-, para la predicción del comportamiento de separaciones cromatográficas mediante afinidad. Para ello se utilizaron dos sistemas modelo: una columna *HiTrap rProtein A FF* (afinidad a un ligando biológico) y una matriz *Blue Sepharose* (afinidad a un ligando sintético: *dye-ligand*). Para el primer sistema se utilizaron 3 proteínas de prueba (IgG1, IgG2a e IgG2b) con distinta afinidad por la proteína A, las que fueron eluidas mediante un gradiente no lineal de pH. Para el segundo sistema se utilizaron 2 proteínas modelo (Albumina de suero bovino y Hemoglobina de conejo), permitiendo su elución mediante un gradiente lineal de fuerza iónica.

La implementación del modelo en el programa computacional Matlab® permitió calcular las curvas de elución de proteínas puras y de mezclas de proteínas. Para cada sistema se determinaron parámetros como los números de Peclet (Pe_{Li}) y de Biot (Bi) para la transferencia de masa, los que mostraron que en las condiciones en las que se trabajó la dispersión axial es despreciable ($Pe_{Li} > 141$) y la transferencia de masa está gobernada por la difusión intrapartícula ($Bi > 51$).

Se estudiaron dos relaciones de desorción para cada una de las proteínas mencionadas anteriormente, cuyos parámetros cinéticos fueron determinados utilizando, paralelamente, dos mecanismos: un algoritmo genético y la función *fminsearch* de Matlab. Un modelo lineal entre la concentración de modulador (sal o pH) y el logaritmo de la constante de equilibrio de adsorción de cada proteína permitió simular correctamente los *peaks* asimétricos encontrados experimentalmente, cuyos parámetros cinéticos permitieron, a su vez, un ajuste de los datos experimentales con un error relativo de los tiempos de retención inferior a un 3%.

El modelo propuesto permitió predecir adecuadamente el comportamiento de mezclas de proteínas en condiciones de operación distintas de las utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos, logrando coeficientes de correlación entre los datos de absorbancia experimentales y calculados superiores a 0.94 para variaciones de hasta un 27% en la longitud del gradiente, un 30% en el flujo de la fase móvil y un 100% tanto en la concentración de proteínas en la muestra, como en su volumen de inyección.

ABSTRACT

Chromatographic purification of proteins is one of the most useful separation techniques in the process of purification of biological products, for therapeutic and catalytic uses. These processes use properties such as charge, hydrophobicity and bioaffinity to ligands bonded to a matrix for separation. The last property, bioaffinity, is the most specific.

Mathematical models which simulate and optimize chromatographic purification processes contribute to diminish the costs related to the design of the steps of purification leading to the optimization of operational conditions using a computer demanding less time and resources than experimental procedures.

In this work the investigation of the use of a general rate model was made for the prediction of affinity chromatographic separations. This rate model consists of two sets of partial differential equations –for the mass balance in the bulk-fluid phase and in the liquid inside the particle- coupled to an ordinary differential equation –which describes the adsorption kinetics-. Two model systems were studied: a HiTrap rProtein A FF column (affinity to a biological ligand) and a Blue Sepharose matrix (dye-ligand). For the first system 3 proteins were used (IgG1, IgG2a and IgG2b) with different affinities for the protein A and were eluted with a nonlinear pH gradient. For the second system two proteins were used (bovine serum albumin and rabbit hemoglobin) with a linear ionic strength gradient elution.

The model implementation in the Matlab® software led to the computation of the elution curves of pure and mixed proteins. For each system the Peclet (Pe_{Li}) and Biot (Bi) numbers for mass transfer were determined and showed that in the studied conditions the axial dispersion is negligible ($Pe_{Li} > 141$) and the mass transfer is controlled by intraparticle diffusion ($Bi > 51$).

Two elution relationships were studied for each protein and their kinetic parameters were calculated using two tools: a genetic algorithm and the Matlab function *fminsearch*. A linear eluite (protein)-modulator (pH or salt) relationship led to a successful prediction of the asymmetrical elution peaks experimentally obtained and the kinetic parameters led to a good adjustment of the retention times with relative errors lower than 3%.

Successful simulations of protein mixtures were carried out using the proposed model obtaining values of the correlation coefficient between the experimental and calculated absorbance data higher than 0.94 for 27% variation of the gradient longitude, 30% variation of the mobile phase flux and a 100% variation of the protein concentration and mixture injection volume.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos	ii
“MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE CURVAS DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS EN CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD”	iv
Abstract	v
Índice de Contenido	vi
Índice de Figuras y Tablas	ix
Nomenclatura.....	xiii
1 Introducción	1
1.1 <i>Cromatografía Líquida</i>	1
1.1.1 Propiedades del <i>peak</i> de elución de cada proteína.....	3
1.1.2 Cromatografía de afinidad	4
1.1.2.1 <i>Dye-ligand</i>	4
1.1.2.2 Afinidad a proteína A recombinante	5
1.2 <i>Modelo de balances de masa (Rate model)</i>	7
1.2.1 Relación afinidad por ligando – concentración de modulador.....	11
1.2.1.1 Relación exponencial.....	11
1.2.1.2 Relación lineal	12
1.3 <i>Técnicas utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos</i>	12
1.3.1 Algoritmo genético.....	13
1.3.2 Función <i>fminsearch</i> de Matlab®	13
1.3.3 Comparación entre ambos métodos.....	13
1.4 <i>Objetivos</i>	14
1.4.1 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específicos	14
1.4.3 Alcances.....	14
2 Metodología	15
2.1 <i>Materiales</i>	15
2.1.1 Proteínas.....	15
2.1.2 Columnas cromatográficas	15
2.1.3 Reactivos.....	15
2.1.4 Solventes.....	16
2.1.5 Equipos.....	16
2.1.5.1 Cromatografía	16
2.1.5.2 Simulaciones	16
2.1.6 <i>Softwares</i>	16
2.2 <i>Metodología Experimental</i>	17
2.2.1 Cromatografía.....	17
2.2.2 Relación entre concentración de proteína y absorbancia	19

2.3	<i>Metodología de Simulación</i>	19
2.3.1	Discretización espacial del modelo de balances de masa	20
2.3.2	Determinación de parámetros adimensionales	21
2.3.2.1	Número de Peclet para la transferencia de masa	21
2.3.2.2	Constante adimensional η_i	21
2.3.2.3	Número de Biot para la transferencia de masa	22
2.3.2.4	Constante adimensional ξ_i	22
2.3.3	Algoritmo de simulación	22
2.3.4	Determinación de parámetros cinéticos	23
3	Resultados y Discusión	25
3.1	<i>Resultados experimentales</i>	25
3.1.1	Curvas de elución de proteínas puras	25
3.1.2	Relación entre absorbancia y concentración de proteína	26
3.2	<i>Implementación del modelo en código Matlab</i>	27
3.2.1	Determinación del gradiente de pH y su efecto en el tiempo que dura la simulación	27
3.2.2	Parámetros físicos utilizados	28
3.2.2.1	Densidad y viscosidad de la fase móvil	28
3.2.2.2	Peso molecular de las proteínas estudiadas	28
3.2.2.3	Dimensiones de la columna y propiedades de la matriz	29
3.2.2.4	Factor de tortuosidad	29
3.2.3	Parámetros cinéticos	30
3.2.3.1	Comparación entre el algoritmo genético y la función <i>fminsearch</i>	30
3.2.3.2	Comparación entre las relaciones de elución lineal y exponencial	33
3.2.3.3	Parámetros cinéticos utilizados en este trabajo	36
3.3	<i>Simulaciones</i>	37
3.3.1	Afinidad por proteína A recombinante	37
3.3.1.1	Efecto del cambio de flujo y concentración en la simulación	38
3.3.1.2	Efecto del cambio de volumen y concentración en la simulación	40
3.3.1.3	Efecto del cambio de gradiente y concentración en la simulación	43
3.3.2	Afinidad en <i>Blue Sepharose</i>	46
3.3.2.1	Efecto del cambio de flujo y concentración en la simulación	47
3.3.2.2	Efecto del cambio de gradiente y concentración en la simulación	50
3.3.2.3	Efecto del cambio de flujo y largo de gradiente en la simulación	53
3.3.2.4	Absorbancias a 280nm y 405nm	55
3.4	<i>Discusión final</i>	56
4	Conclusiones	58
5	Referencias	59
6	Anexos	61
6.1	<i>Anexo A: Uso del Cluster</i>	61
6.2	<i>Anexo B: Cromatografía paso a paso</i>	61
6.2.1	Preparación de <i>buffers</i>	62
6.2.1.1	<i>Blue Sepharose</i>	62
6.2.1.2	<i>rProtein A FF</i>	63

6.2.2	Preparación del equipo	63
6.2.2.1	Conexión de la columna	64
6.2.2.2	Regeneración y ambientación de la columna	65
6.2.2.3	Preparación de la muestra	65
6.2.3	Ejecución de la cromatografía	66
6.2.4	Almacenamiento de la columna	66
6.3	<i>Anexo C: Discretización espacial del sistema</i>	67
6.3.1	Método de elementos finitos para los balances de masa en la fase seno del líquido.....	67
6.3.2	Método de colocación ortogonal para los balances de masa en la fase partícula	72
6.4	<i>Anexo D: Ajuste de parámetros cinéticos</i>	73
6.4.1	Resultados entregados por la relación exponencial.....	73
6.4.2	Comparación entre relaciones lineales y relación exponencial	75
6.5	<i>Anexo E: Simulaciones para las proteínas con afinidad por la proteína A</i>	77
6.5.1	Comparación entre datos calculados para las proteínas individuales y la mezcla.....	77
6.6	<i>Anexo F: Simulaciones para las proteínas con afinidad por Cibacron blue</i>	78
6.6.1	Comparación de curvas de Hb a 405nm	78
6.6.2	Comparación entre datos calculados para las proteínas individuales y la mezcla.....	80
6.7	<i>Anexo G: Programas computacionales</i>	81
6.7.1	Funciones para el cálculo de las curvas de elución, y su comparación con datos experimentales.	81
6.7.1.1	curva_calculada.m.....	81
6.7.1.2	datos_experimentales.m	82
6.7.1.3	ecuaciones_diferenciales.m	83
6.7.1.4	matrices_colocacion_ortogonal.m.....	87
6.7.1.5	operacion.m	88
6.7.1.6	par_cineticos.m	90
6.7.1.7	parametros.m.....	91
6.7.1.8	prop_proteinas.m	95
6.7.2	Funciones para la obtención de los parámetros cinéticos utilizando <i>fminsearch</i>	96
6.7.2.1	mifuncion.m.....	96
6.7.2.2	encontrar.m	97
6.7.2.3	minsearch.m	98

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Índice de Figuras

Figura 1.1 Pasos típicos de una purificación utilizando cromatografía de afinidad. Fuente: Amersham Biosciences, 2002.	3
Figura 1.2 Forma básica de un colorante con anillo diclorotriazonio. Fuente: Labrou, 2000.	4
Figura 1.3 Estructura típica de una inmunoglobulina. Fuente: Amersham Biosciences, 2002.	6
Figura 2.1 Estrategia de solución para el modelo de balances de masa multicomponente general. Fuente: Gu, 1995.	20
Figura 3.1 Cromatogramas de las Inmunoglobulinas puras estudiadas en este trabajo.	25
Figura 3.2 Cromatogramas de las proteínas con afinidad por Blue Sepharose estudiadas en este trabajo.	26
Figura 3.3 Relación entre el pH y la concentración del buffer de elución, para distintos largos de gradiente utilizados para la elución de las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante.	27
Figura 3.4 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de la proteína IgG1 utilizando un algoritmo genético y una relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.	32
Figura 3.5 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de BSA y Hb utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.	34
Figura 3.6 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de los parámetros cinéticos de la IgG1 utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.	35
Figura 3.7 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2a con un flujo de 0.7 mL/min, $C_0=0.1$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.28 min^{-1} (Experimento PA7).	39
Figura 3.8 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2b con un flujo de 1.3 mL/min, $C_0=0.1$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.52 min^{-1} (Experimento PA6).	39
Figura 3.9 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG2a e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $C_0=0.065$ mg/mL, $v_m=0.2$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min^{-1} (Experimento PA8).	41
Figura 3.10 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de las tres proteínas, con un flujo de 1 mL/min, $C_0=0.065$ mg/mL, $v_m=0.2$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min^{-1} (Experimento PA9).	41
Figura 3.11 Comparación entre la mezcla teórica de las 3 proteínas puras y la curva calculada con el modelo utilizando las siguientes condiciones de operación: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.4 min^{-1}	42
Figura 3.12 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2a con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual -0.2 min^{-1} (Experimento PA4).	44
Figura 3.13 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG2a e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.2$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.2 min^{-1} (Experimento PA5).	44
Figura 3.14 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.1$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.2 min^{-1} (Experimento PA10).	45

Figura 3.15 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.1$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.31 min^{-1} (Experimento PA11).	45
Figura 3.16 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=0.7 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.022 M/min (Experimento CB6).	48
Figura 3.17 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=1 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.022 M/min (Experimento CB4).	49
Figura 3.18 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=1.3 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.022 M/min (Experimento CB5).	49
Figura 3.19 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=1 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.017 M/min (Experimento CB7).	51
Figura 3.20 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=0.75 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.014 M/min (Experimento CB3).	51
Figura 3.21 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=0.75 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.01 M/min (Experimento CB8).	52
Figura 3.22 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=1 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.005 M/min (Experimento CB10).	52
Figura 3.23 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> con un flujo igual a 0.5 mL/min, $C_0=0.9 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.048 M/min (Experimento CB9).	54
Figura 3.24 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> para un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=0.75 \text{ mg/mL}$, $v_m=0.5 \text{ mL}$ y pendiente de gradiente igual a 0.014 M/min (Experimento CB3).	55
Figura 6.1 Equipo ÄKTApurifier de GE Healthcare Fuente: <i>Manual de ÄKTApurifier Getting Started</i> .	61
Figura 6.2 Conexión del electrodo de pH en el circuito seguido por la fase móvil durante la cromatografía.	64
Figura 6.3 Inyección de la muestra a la válvula de inyección. Fuente: <i>Manual de ÄKTApurifier Getting Started</i> .	66
Figura 6.4 Ecuaciones de prueba cuadráticas para el método de Elementos finitos de Galerkin. a) Sistema global con numeración <i>i</i> . b) Sistema local con numeración <i>n</i> . Fuente: <i>Finlayson, 1980</i> .	68
Figura 6.5 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de la proteína IgG2a utilizando un algoritmo genético y una relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.	74
Figura 6.6 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de la proteína IgG2b utilizando un algoritmo genético y una relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.	75
Figura 6.7 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de los parámetros cinéticos de la IgG2a utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.	76
Figura 6.8 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de los parámetros cinéticos de la IgG2b utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.	77

Figura 6.9 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> para un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=0.8$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y un largo de gradiente de 5.5 vc (Experimento CB4).	79
Figura 6.10 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a <i>Cibacron blue</i> para un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=1.3$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y un largo de gradiente de 5.5 vc (Experimento CB5).	79

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Principios de separación de procesos cromatográficos <i>Fuente: Amersham Biosciences</i> .	2
Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas con afinidad por <i>dye-ligand</i> .	5
Tabla 1.3 Propiedades fisicoquímicas y biológicas de las inmunoglobulinas de ratón estudiadas en este trabajo. <i>Fuente: GE Healthcare</i> .	6
Tabla 2.1 Proteínas utilizadas en este trabajo.	15
Tabla 2.2 <i>Buffers</i> de unión (A) y de elución (B) utilizados en las cromatografías estudiadas.	16
Tabla 2.3 Condiciones de operación utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos.	17
Tabla 2.4 Condiciones de operación de experimentos de afinidad por proteína A para comparación con resultados experimentales.	18
Tabla 2.5 Condiciones de operación de experimentos en <i>Blue Sepharose</i> para comparación con resultados experimentales.	18
Tabla 3.1 Valores del factor FC que relaciona la absorbancia medida por el cromatógrafo con la concentración de proteína.	27
Tabla 3.2 Parámetros físicos utilizados para la determinación de los parámetros adimensionales.	28
Tabla 3.3 Parámetros cinéticos de la IgG1 estimados para distintos valores de tortuosidad y número de nodos de colocación ortogonal, obtenidos mediante el algoritmo genético para la relación de elución exponencial.	31
Tabla 3.4 Parámetros cinéticos de las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante, para la relación de elución exponencial, determinados utilizando <i>fminsearch</i> ($N_r=3$ y $\tau_{tor}=2$).	32
Tabla 3.5 Parámetros cinéticos utilizados en este trabajo.	36
Tabla 3.6 Comparación entre la absorbancia máxima y el tiempo de retención de las curvas de elución de proteínas experimentales y calculadas estudiadas en este trabajo, utilizadas para el ajuste de los parámetros cinéticos de una relación de elución lineal.	37
Tabla 3.7 Números adimensionales relacionados con la transferencia de masa al interior de la columna, determinados para las cromatografías llevadas a cabo en la columna <i>HiTrap rProtein A FF</i> .	37
Tabla 3.8 Comparación entre los <i>peaks</i> de elución experimentales y calculados para las mezclas PA7 y PA6.	40
Tabla 3.9 Comparación entre los <i>peaks</i> de elución experimentales y calculados para las mezclas PA8 y PA9.	42
Tabla 3.10 Comparación entre los <i>peaks</i> de elución experimentales y calculados para las mezclas PA4, PA5, PA10 y PA11.	46
Tabla 3.11 Números adimensionales relacionados con la transferencia de masa al interior de la columna, determinados para las cromatografías llevadas a cabo en la columna <i>Blue Sepharose</i> .	47
Tabla 3.12 Comparación entre los <i>peaks</i> de elución experimentales y calculados para las mezclas CB6, CB4 y CB5.	50
Tabla 3.13 Comparación entre los <i>peaks</i> de elución experimentales y calculados para las mezclas CB7, CB3, CB8 y CB10.	53
Tabla 3.14 Comparación entre los <i>peaks</i> de elución experimentales y calculados para la mezcla CB9.	54
Tabla 6.1 Peso Molecular de los reactivos utilizados en la preparación de los <i>buffers</i> .	62
Tabla 6.2 Masa requerida de reactivos para 100 mL de <i>buffers</i> de unión y elución para cromatografías en <i>Blue Sepharose</i> .	62

Tabla 6.3 Masa requerida de reactivos para 250 mL de <i>buffers</i> de bajo y alto pH para la regeneración de la matriz <i>Blue Sepharose</i>	63
Tabla 6.4 Masa requerida de reactivos para 100 mL de <i>buffers</i> de unión y elución para cromatografías en <i>rProtein A FF</i>	63
Tabla 6.5 Parámetros cinéticos de IgG2a e IgG2b obtenidos para una relación de elución exponencial utilizando distintos valores de tortuosidad y número de nodos de colocación ortogonal, utilizando el algoritmo genético.....	74
Tabla 6.6 Comparación de parámetros cinéticos obtenidos utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.	76
Tabla 6.7 Absorbancias máximas y tiempos de retención de las curvas calculadas para las proteínas individuales y para la mezcla de proteínas con afinidad por proteína A recombinante.....	77
Tabla 6.8 Comparación entre las áreas bajo el <i>peak</i> de absorbancia experimental y la calculada por el modelo para las distintas cromatografías realizadas en la columna <i>HiTrap r Protein A FF</i>	78
Tabla 6.9 Absorbancias máximas y tiempos de retención de las curvas calculadas para las proteínas individuales y para la mezcla de proteínas con afinidad por <i>Cibacron blue</i>	80
Tabla 6.10 Comparación entre las áreas bajo el <i>peak</i> de absorbancia experimental y la calculada por el modelo para las distintas cromatografías realizadas en la columna <i>Blue Sepharose</i>	80

NOMENCLATURA

$abs_{máxi}$	Absorbancia máxima del <i>peak</i> i , en mAU
abs_{C_i}	Absorbancia máxima del <i>peak</i> experimental i , en mAU
abs_{e_i}	Absorbancia máxima del <i>peak</i> experimental i , en mAU
a_i	Constante de la isoterma de Langmuir para el componente i , $b_i C_i^\infty$
A_{peak}	Área bajo el <i>peak</i> de absorbancia, en $mAU \cdot mL$
b_i	Constante de equilibrio de adsorción para el componente i , k_{ai}/k_{di}
Bi_i	Número de Biot para el componente i , $k_i R_p / (\varepsilon_p D_{pi})$
C	Concentración de proteína, en mg/mL
$C_{A,N+1}$	Concentración adimensional inicial del modulador
$C_{A,N+1}$	Concentración inicial del modulador, en mg/mL
$C_{B,N+1}$	Concentración adimensional final del modulador
$C_{B,N+1}$	Concentración final del modulador, en mg/mL
C_{0i}	Concentración utilizada para adimensionalizar la concentración del componente i , en mg/mL , $\max(C_{fi}(t))$
C_{bi}	Concentración del componente i en la fase móvil, en mg/mL
c_{bi}	Concentración adimensional del componente i en la fase móvil, C_{bi}/C_{0i}
C_{fi}	Concentración de alimentación del componente i , en mg/mL
C_i^∞	Capacidad máxima de adsorción para el componente i (basado en el volumen de sólido en la matriz)
c_i^∞	Capacidad adimensional máxima de adsorción para el componente i , C_i^∞/C_{0i}
C_{N+1}	Concentración del modulador, en mg/mL
C_{N+1}	Concentración adimensional del modulador
C_{pi}	Concentración del componente i en el líquido estancado dentro de la partícula, en mg/mL
c_{pi}	Concentración adimensional del componente i en la fase estancada al interior de la partícula de adsorbente, C_{pi}/C_{0i}
C_{pi}^*	Concentración del componente i en la fase sólida de la partícula, en mg/mL
c_{pi}^*	Concentración adimensional del componente i en la fase sólida de la partícula, C_{pi}^*/C_{0i}
d	Diámetro interno de la columna, en cm
Da_i^a	Número de Damköhler para adsorción del componente i , $Lk_{ai}C_{0i}/v$
Da_i^d	Número de Damköhler para desorción del componente i , Lk_{di}/v
D_{bi}	Coefficiente de dispersión axial del componente i , en cm^2/s
D_{mi}	Difusividad molecular del componente i , en cm^2/s
d_{mi}	Diámetro del componente i , en $\text{\AA}$
D_{pi}	Difusividad efectiva intrapartícula del componente i en la partícula, en cm^2/s
d_{poro}	Diámetro del macroporo de la partícula, en $\text{\AA}$
ER	Error relativo, $(dato_{experimental} - dato_{calculado}) \cdot 100 / dato_{experimental}$
$Error_p$	Suma de las diferencias al cuadrado entre los datos de absorbancia calculados y los datos experimentales.
F	Flujo volumétrico de la fase móvil, en mL/min
FC	Constante de proporcionalidad entre concentración y absorbancia, en $mg/(mAU \cdot mL)$
k_{ai}	Constante de velocidad de adsorción del componente i , en $mL/(mg \cdot s)$
k_{di}	Constante de velocidad de desorción del componente i , en $1/s$
k_i	Coefficiente de transferencia de masa, en cm/s
L	Largo de la columna, en cm
L_a	Número de sitios disponibles para adsorción de proteínas
$m_{proteína}$	Masa de proteína inyectada a la columna, en mg/mL
N	Número de proteínas presentes en la muestra

N_e	Número de elementos cuadráticos del método numérico de elementos finitos
N_r	Número de nodos internos del método numérico de colocación ortogonal
N_z	Número de nodos del método numérico de elementos finitos, $2N_e + 1$
Pe_{Li}	Número de Peclet para dispersión axial, vL/D_{bi}
R	Distancia en la dirección radial de la partícula, en cm
r	Coordenada radial adimensional, R/R_p
Re	Número de Reynolds, $2\rho_l v R_p / \mu_l$
R_p	Radio de la partícula, en cm
t	Tiempo, en s
t_{c_i}	Tiempo de retención del <i>peak</i> calculado i , en min
t_{e_i}	Tiempo de retención del <i>peak</i> experimental i , en min
t_{reti}	Tiempo de retención del <i>peak</i> i , en min
v	Velocidad intersticial de la fase móvil, en mL/s , $4F/(\pi d^2 \varepsilon_b)$
vm	Volumen de muestra, en mL
Z	Distancia en la dirección axial de la columna, en cm
z	Coordenada axial adimensional, Z/L

Letras Griegas

α'_i, β'_i	Parámetros de la cinética de desorción de la relación exponencial de elución para la proteína i
α_i, β_i	Parámetros de la cinética de desorción de la relación lineal de elución para la proteína i
ε_b	Fracción de huecos intrapartícula de la columna
ε_{pi}	Porosidad de la partícula de adsorbente para el componente i
η_i	Constante adimensional para el componente i , $\varepsilon_p D_{pi} L / (2R_p v)$
λ_i	Razón entre el diámetro del componente i y el diámetro del macroporo de la partícula
μ_l	Viscosidad de la fase móvil, en $g/(cm \cdot s)$
ξ_i	Constante adimensional para el componente i , $3Bi_i \eta_i (1 - \varepsilon_b) / \varepsilon_b$
ρ_l	Densidad de la fase móvil, en g/cm^3
τ	Tiempo adimensional, vt/L
$\tau_{inyección}$	Tiempo adimensional que toma inyectar la muestra como un pulso rectangular
$\tau_{elución}$	Tiempo adimensional en el cual finaliza el gradiente del modulador
τ_{lavado}	Tiempo adimensional en el cual finaliza el lavado de la columna luego de la inyección
τ_{tor}	Factor de tortuosidad

Abreviaciones

Abs	Absorbancia, en mAU
BSA	Albúmina de suero bovino
EDO	Ecuación diferencial ordinaria
EDP	Ecuación diferencial parcial
Hb	Hemoglobina de conejo
I	Fuerza iónica
IgG1	Inmunoglobulina de ratón tipo 1
IgG2a	Inmunoglobulina de ratón tipo 2a
IgG2b	Inmunoglobulina de ratón tipo 2b
PM	Peso molecular

1 INTRODUCCIÓN

La purificación cromatográfica es una de las técnicas más utilizadas en el proceso de purificación de productos biológicos. Debido a su alta resolución es prácticamente indispensable en la fabricación de productos biofarmacéuticos para diagnóstico humano o propósitos terapéuticos.

Los modelos matemáticos que simulan y optimizan los procesos cromatográficos de purificación de proteínas, contribuyen a la disminución de los costos asociados al diseño de dichas etapas, puesto que permiten simular y optimizar las condiciones de operación, invirtiendo mucho menos tiempo y recursos en su determinación experimental.

En cromatografía, la adsorción de proteínas depende de la composición y concentración de la muestra y de las condiciones de operación como el flujo, gradiente del modulador, volumen de inyección, propiedades físicas de la matriz de adsorción y las dimensiones de la columna. Modelos matemáticos para describir la separación cromatográfica, como el Modelo de platos y el de balances de masa, han sido discutidos previamente (Ruthven, 1984; Shene et al., 2006) e implementados para simular cromatografías de intercambio iónico a bajas (Shene et al., 2006) y altas concentraciones de proteína (Orellana et al. 2009) y en cromatografía de interacción hidrofóbica (Lienqueo et al. 2009).

En este trabajo se utilizó el Modelo de balances de masa para predecir el comportamiento de separaciones cromatográficas mediante afinidad biológica. Este modelo ha sido escogido dada la ventaja que posee en el proceso de escalamiento de la columna, puesto que para ello sólo es necesario utilizar el modelo para simular los cromatogramas de escala industrial (Gu 1995), necesitando sólo unos pocos datos experimentales de una columna pequeña con el mismo empaquetamiento que la columna que se desea escalar.

En las siguientes secciones se explicará en qué consiste la cromatografía líquida, en particular la cromatografía de afinidad, y el modelo de balances de masa utilizado para la simulación de la elución de mezclas de proteínas con afinidad por el colorante *Cibacron blue* y por la proteína A recombinante. Además, se explicarán brevemente las técnicas utilizadas para el ajuste de los parámetros cinéticos involucrados en el modelo: Algoritmo genético y la función *fminsearch* de Matlab®.

1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes a ser separados se distribuyen entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra que se mueve en una determinada dirección (fase móvil) (Ettre, 1993). En cromatografía líquida esta última fase corresponde a un líquido.

La fase estacionaria puede ser un sólido, un gel o un líquido, estando conformada en el caso particular de este trabajo por esferas porosas, a la cual se encuentran unidos ligandos que interactúan de manera reversible con los componentes de la mezcla que se desea separar. La fase móvil consiste en una solución que, de acuerdo con su concentración de sales o su pH, entrega las condiciones propicias para que los componentes de la mezcla en estudio presenten una mayor o

menor interacción con los ligandos fijos en la fase estacionaria. De acuerdo con las interacciones que se producen entre los componentes de la mezcla y los ligandos fijados a la matriz (o la forma de la matriz, en el caso de filtración por geles), los procesos cromatográficos utilizados para la separación de proteínas pueden clasificarse en las categorías listadas en la siguiente tabla:

Tabla 1.1 Principios de separación de procesos cromatográficos Fuente: Amersham Biosciences.

Propiedad	Técnica
Bioreconocimiento (Ligando específica)	Cromatografía de afinidad
Carga	Cromatografía de intercambio iónico
Tamaño	Filtración por geles (cromatografía de no adsorción)
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica
	Cromatografía de fase reversa

Independiente de la propiedad explotada por la técnica (exceptuando la filtración por geles), la cromatografía de elución se lleva a cabo realizando 5 pasos genéricos:

- (1) **Equilibrio de la columna con un buffer de unión.** Este *buffer*, idealmente, corresponde al mismo en el cual están suspendidas las proteínas antes de su inyección a la columna, y permite que aquellas que tengan afinidad por el ligando inmovilizado en la matriz, o que formen algún tipo de interacción con él, se adsorban en la resina. Es decir, este *buffer* entrega las condiciones propicias para maximizar la fuerza de la interacción ligando-proteína.
- (2) **Inyección de la muestra.** En esta etapa la mezcla de proteínas es inyectada a la columna. Todas aquellas capaces de generar una interacción con el ligando (ya sea fuerte o débil), se adsorben en él, mientras hayan sitios disponibles para su adsorción.
- (3) **Lavado de la columna.** Aquí, todas aquellas proteínas no adsorbidas son eluidas a través de la fase móvil, que aún está compuesta por el *buffer* de unión.
- (4) **Elución.** En esta etapa se varían las propiedades de la fase móvil, ya sea generando un gradiente de pH o de fuerza iónica, o agregando moléculas que compiten por la unión al ligando, lo que permite que las proteínas adsorbidas vayan abandonando la matriz conforme las fuerzas que las mantienen unidas al ligando se van debilitando. Aquellas proteínas que interactúen más fuertemente con el ligando, serán eluidas más tarde. El gradiente generado puede ser isocrático (no cambian las propiedades de la fase móvil), lineal (la fuerza iónica o el pH, aumentan o disminuyen linealmente durante la cromatografía) o escalonado (la fuerza iónica o el pH, aumentan o disminuyen formando “escalones” a lo largo de la cromatografía).
- (5) **Reequilibrio de la columna.** Una vez realizada la separación y eluidas todas las proteínas adsorbidas a la matriz, es necesario ambientar la columna en el *buffer* de unión para una posterior cromatografía.

Lo que ocurre al interior de la columna durante los diferentes pasos del proceso cromatográfico descrito anteriormente puede verse de forma esquemática en la Figura 1.1, donde se ejemplifica una cromatografía de afinidad.

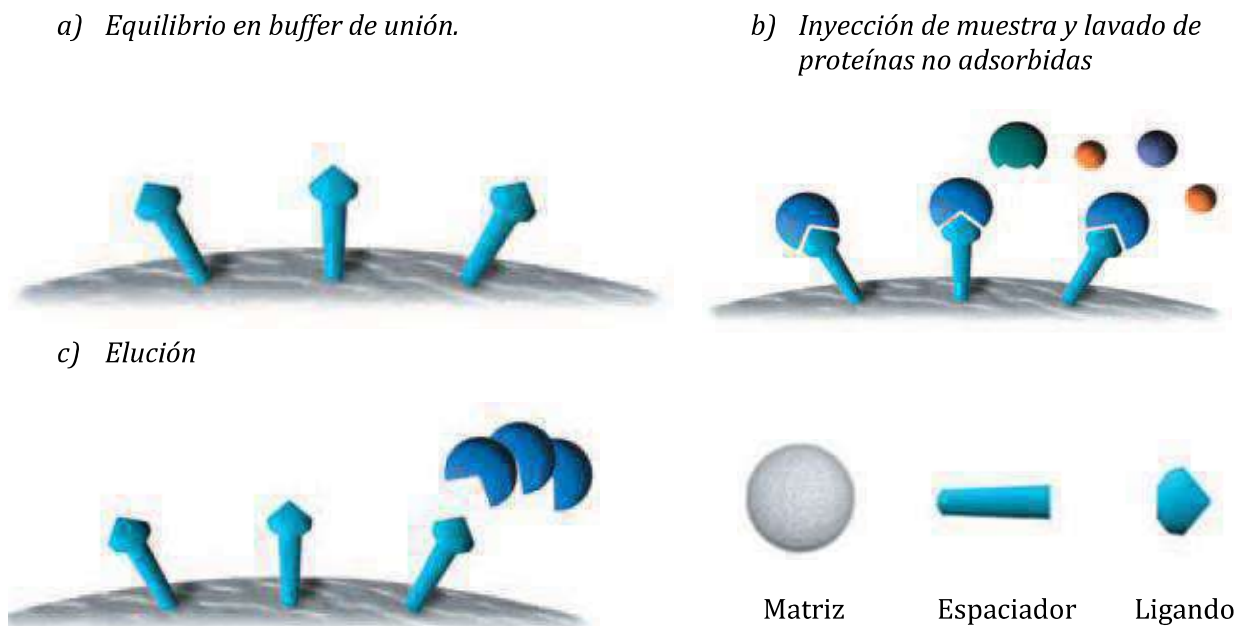


Figura 1.1 Pasos típicos de una purificación utilizando cromatografía de afinidad. Fuente: Amersham Biosciences, 2002.

En a) se ejemplifica la ambientación de la resina en buffer de unión previo a la inyección de la muestra (b) y lavado de aquellas proteínas no adsorbidas en la resina debido tanto a la no afinidad por el ligando, como a la no disponibilidad de sitios de unión libres. En c) se muestra esquemáticamente el proceso de elución de la proteína de interés gracias a modificaciones de la fase móvil a favor del debilitamiento de las interacciones entre la proteína y el ligando.

1.1.1 PROPIEDADES DEL *PEAK* DE ELUCIÓN DE CADA PROTEÍNA

En cromatografías líquidas se han definido diversos parámetros que permiten caracterizar la migración diferencial que las distintas proteínas presentan en la mezcla a separar. Entre ellos destaca el tiempo de retención puesto que permite determinar, cuando el *peak* es simétrico, parámetros como la pureza, el rendimiento y la resolución de un proceso cromatográfico, los que a su vez permiten llevar a cabo la optimización del proceso de acuerdo con los requerimientos que se tengan (mayor pureza o mayor rendimiento).

El tiempo de retención corresponde al tiempo en que un determinado componente eluye de la columna. Debido a que la proteína no eluye completamente en un solo punto, sino más bien, eluye durante un período de tiempo, el tiempo de retención se determina en el punto en que se alcanza el máximo de absorbancia o concentración del *peak* de elución de la proteína (o de la mezcla de proteínas).

El modelo que se estudia en este trabajo busca predecir correctamente tanto la concentración (o absorbancia) máxima de elución de las distintas proteínas en estudio, como el tiempo de retención, además de la forma de los *peaks*. En el caso en que los *peaks* son asimétricos, el tiempo de retención de igual manera logra predecir aquellas fracciones en que eluirá la mayor cantidad de la proteína de interés, permitiendo desarrollar estrategias para optimizar el proceso de separación de dicha proteína.

1.1.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

En cromatografía de afinidad la proteína de interés es separada en base a interacciones que pueden ser de carácter electrostático, hidrofóbico o debido a fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno (Subramanian, 2000), las que son revertidas de manera específica, mediante ligandos competitivos, o de manera inespecífica, variando el pH, la fuerza iónica o la polaridad de la fase móvil.

En este trabajo se estudiaron dos tipos de cromatografías de afinidad: *dye-ligand* y afinidad por la proteína A recombinante. En ambos casos, la elución se llevó a cabo cambiando las propiedades de la fase móvil: en el caso de *dye-ligand* se varió la fuerza iónica de manera lineal (entre 0.05 y 1 M de NaCl), mientras que la afinidad por la proteína A recombinante varió conforme cambió el pH de la fase móvil (entre 7 y 3). Una explicación breve de ambas técnicas se presenta a continuación:

1.1.2.1 DYE-LIGAND

Los colorantes (*dyes*), como ligandos sintéticos, han ganado gran importancia en los procesos de separación cromatográfica mediante afinidad. Esto, debido a su bajo costo, la facilidad de su inmovilización en la matriz, su resistencia a la degradación tanto biológica como química y a su alta capacidad de unión frente a ligandos biológicos. Sin embargo, poseen una selectividad moderada (Labrou, 2000).

Estructuralmente, los colorantes poseen grupos sulfónicos (SO_3^-) que le entregan la propiedad de solubilidad en agua y un sistema reactivo (anillo diclorotriazonio de la Figura 1.2, en rojo) que le entrega sitios para su inmovilización en el soporte sólido. La sustitución del sulfonato terminal del aminobenceno (anillo central de la Figura 1.2, en verde) permite obtener colorantes diseñados para imitar la estructura y función de ligandos biológicos o su interacción con los sitios de unión de las proteínas (Labrou, 2000).

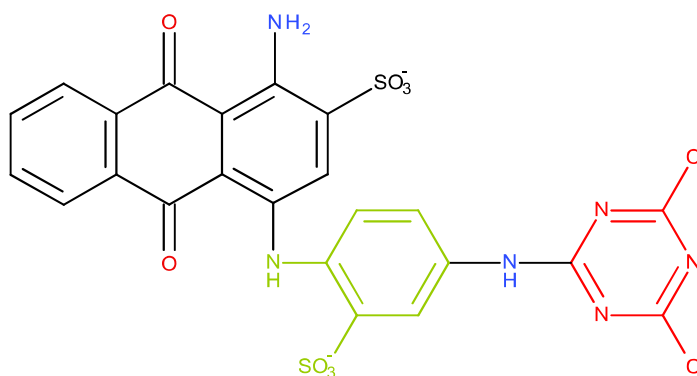


Figura 1.2 Forma básica de un colorante con anillo diclorotriazonio. Fuente: Labrou, 2000.

En particular, en este trabajo se utilizó como matriz una *Blue Sepharose CL-6B* (de *Sigma-Aldrich*) que es una resina con propiedades tanto de afinidad, como de intercambio iónico, la cual es utilizada comúnmente para remover albúmina de suero bovino desde muestras en estudio (Sigma-Aldrich Co.

2010). Las proteínas utilizadas corresponden a las mismas estudiadas por Li y colaboradores (2004): albúmina de suero bovino (BSA) y hemoglobina (Hb), en este caso de conejo, que fueron escogidas debido a su propiedad de entregar *peaks* de absorbancia a distintas longitudes de onda. La BSA, como todas las proteínas, entrega *peaks* de absorbancia a 280nm, mientras que la Hb entrega, además, *peaks* de absorbancia a 405 nm, lo que hace más fácil la identificación de la fracción en la cual esta última está presente. El peso molecular y el punto isoeléctrico de estas proteínas se presentan en la Tabla 1.2:

Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas con afinidad por *dye-ligand*.

Proteína	Peso Molecular (kDa)¹	Punto Isoeléctrico²
BSA	66.0	4.7
Hb	64.5	6.8

1.1.2.2 AFINIDAD A PROTEÍNA A RECOMBINANTE

La proteína A, así como la proteína G y la L, por ejemplo, son proteínas con una conocida capacidad de unión a la región constante (F_c) de diversos tipos de inmunoglobulinas (IgG's) o anticuerpos, lo cual las hace útiles para su purificación de estos últimos (Hage et al., 2006).

La proteína A es producida en la superficie celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*, donde forma sitios de unión para la región F_c de inmunoglobulinas (Figura 1.3) presentes en la sangre del organismo infectado (Hage et al., 2006). La proteína A recombinante incluye además una cisteína en el extremo C-terminal que permite su unión a la matriz de *Sepharose* en un solo punto, mejorando su capacidad de unión a las inmunoglobulinas (Amersham Biosciences, 2000), cuya afinidad se debe principalmente a interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión.

Todas las inmunoglobulinas, independiente de su especificidad, tienen una estructura común de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas “pesadas” idénticas (H), y dos cadenas “livianas” (L) también idénticas entre sí. Las cadenas pesadas se encuentran unidas por puentes disulfuros, cada una de las cuales, a su vez, une una cadena liviana también por puentes disulfuro (Altshuler et al., 2010; Weir, 1978) tal y como se observa en la Figura 1.3.

¹ Los pesos moleculares son entregados por el proveedor y se encuentran disponibles en la página <http://www.sigmaaldrich.com>.

² El punto isoeléctrico de la BSA corresponde al reportado por Chaiyasut y Tsuda (2001) y el de la Hb, al reportado por White y Monaghan (1935).

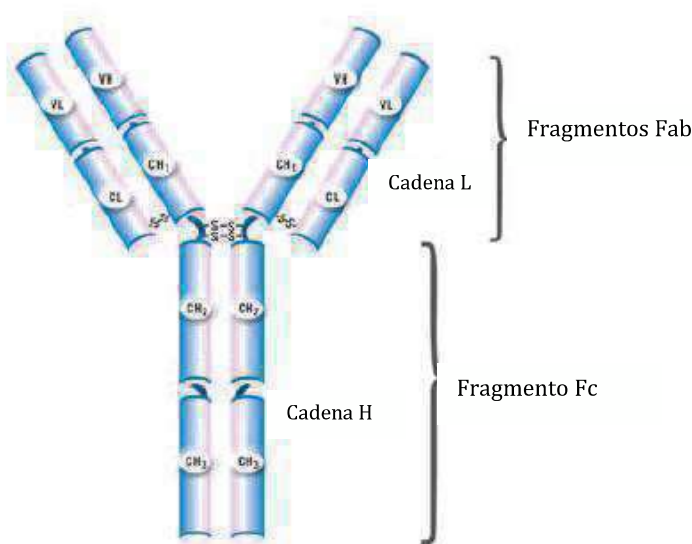


Figura 1.3 Estructura típica de una inmunoglobulina, Fuente: Amersham Biosciences, 2002.

Las inmunoglobulinas animales pueden agruparse en cinco clases principales: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE, de acuerdo con el componente de la cadena pesada (γ , μ , α , ϵ y δ , respectivamente). En cuanto a las cadenas livianas, existen 2 tipos: κ y λ , estando cada molécula de anticuerpo compuesta por sólo un tipo de estas cadenas (Janeway, 2001).

Las inmunoglobulinas del tipo G pueden subdividirse en 4 subclases, todas similares en tamaño, pero con secuencias aminoacídicas diferentes puesto que varían en el tipo de cadena pesada por la cual están compuestas (Altshuler et al., 2010). En este trabajo se escogieron 3 proteínas pertenecientes a 3 de estas subclases, las que poseen diferentes grados de afinidad por la proteína A recombinante. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las inmunoglobulinas seleccionadas se listan en la Tabla 1.3:

Tabla 1.3 Propiedades fisicoquímicas y biológicas de las inmunoglobulinas de ratón estudiadas en este trabajo. Fuente: GE Healthcare³.

Inmunoglobulina	Cadena Pesada	Cadena liviana	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico	Afinidad a proteína A
IgG1	γ_1	κ	150	7.0-8.5	Baja
IgG2a	γ_{2a}	κ	150	6.5-7.5	Moderada
IgG2b	γ_{2b}	κ	150	5.5-7.0	Alta

³ Disponible en la página web de la empresa (<http://www.gelifesciences.com>) como información técnica sobre el producto HiTrap rProtein A FF.

1.2 MODELO DE BALANCES DE MASA (RATE MODEL)

El modelo utilizado en este trabajo está basado en el modelo general de balances de masa presentado por Gu (1995), que consiste en un set de dos ecuaciones en derivadas parciales (balances de masa para los componentes en la fase móvil y en el líquido estancado al interior de la partícula de adsorbente) y una ecuación diferencial ordinaria (que describe la cinética de adsorción de las proteínas). Los supuestos del modelo son las siguientes:

- El tiempo cero corresponde al momento en el cual la muestra comienza a entrar a la columna.
- El proceso cromatográfico es isotérmico.
- No existe un efecto de dispersión radial de los componentes en la fase móvil.
- Al interior de la partícula de adsorbente, las propiedades de la fase estancada (fuerza iónica o pH) son las mismas que las de la fase móvil en la superficie de la partícula. Es decir, no existe un gradiente al interior de la partícula.
- Las partículas de adsorbente son esféricas y de radio uniforme, R_p .
- Los coeficientes de transferencia de masa y de difusividad son constantes e independientes de los efectos de mezcla entre los distintos componentes.
- Las proteínas son adsorbidas sobre los ligandos fijados a la matriz de acuerdo con una cinética de segundo orden:

$$C_{pi} + L_a \overset{k_{ai}}{\underset{k_{di}}{\rightleftharpoons}} C_{pi}^* \quad (1.1)$$

donde el número de sitios disponibles para adsorción, L_a , está dado por la diferencia entre la capacidad de adsorción, C^∞ , y la concentración total de proteína adsorbida, $\sum_{i=1}^N C_{pi}^*$. Las constantes cinéticas de adsorción y desorción son k_{ai} ($mg/(mL \cdot s)$) y k_{di} ($1/s$), respectivamente. De acuerdo con ello, la siguiente relación describe los cambios en la concentración de las proteínas adsorbidas:

$$\frac{\partial C_{pi}^*}{\partial t} = k_{ai} C_{pi} \left(C^\infty - \sum_{j=1}^N C_{pj}^* \right) - k_{di} C_{pi}^* \quad (1.2)$$

donde C_{pi}^* es la concentración la proteína i adsorbida en la matriz (mg/mL) y C_{pi} es la concentración de la proteína i en el líquido estancado al interior de la partícula de adsorbente (mg/mL).

La ecuación diferencial parcial (EDP) para cada proteína ($i = 1 \dots N$) en la fase móvil corresponde a:

$$-D_{bi} \frac{\partial^2 C_{bi}}{\partial Z^2} + v \frac{\partial C_{bi}}{\partial Z} + \frac{\partial C_{bi}}{\partial t} + \frac{3k_i (1 - \varepsilon_b)}{R_p \varepsilon_b} (C_{bi} - C_{pi, R=R_p}) = 0, \quad (1.3)$$

donde C_{bi} es la concentración del componente i en la fase móvil (mg/mL), D_{bi} es el coeficiente de dispersión axial (cm^2/s), k_i es el coeficiente de transferencia de masa (cm/s), R_p es el radio de la

partícula de adsorbente (cm), v es la velocidad intersticial (cm/s) y ε_b es la fracción de huecos intrapartícula de la columna. En esta expresión el primer y el segundo término representan el transporte de la proteína i debido a la dispersión axial y el flujo convectivo, respectivamente. El cuarto término, en tanto, corresponde al flujo de transferencia de masa desde la fase móvil hasta la interfase de la partícula de adsorbente. Para el modulador (sal o pH, $i = N + 1$), el cuarto término en esta EDP no fue considerado debido al supuesto de no existencia de un gradiente de concentración al interior de la partícula para estos componentes.

El balance de masa para la proteína en la fase estancada al interior de la partícula de adsorbente está representado por la ecuación (1.4):

$$(1 - \varepsilon_p) \frac{\partial C_{pi}^*}{\partial t} + \varepsilon_p \frac{\partial C_{pi}}{\partial t} - \varepsilon_p D_{pi} \left[\frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} \right) \right] = 0. \quad (1.4)$$

El tercer término de esta expresión representa la difusión de la proteína a través de la fase de fluido estancado al interior de la partícula, la que luego se adsorbe en la superficie de esta última, fenómeno representado por el primer término.

Las condiciones iniciales para las ecuaciones (1.2), (1.3) y (1.4) están dadas por:

$$\begin{aligned} C_{bi}(0, Z) &= 0 & \text{para } i = 1 \dots N & & \text{para } 0 \leq Z \leq L \\ C_{pi}(0, R, Z) &= 0 & \text{para } i = 1 \dots N & & \text{para } 0 \leq Z \leq L \text{ y } 0 \leq R \leq R_p \\ C_i^*(0, R, Z) &= 0 & \text{para } i = 1 \dots N & & \text{para } 0 \leq Z \leq L \text{ y } 0 \leq R \leq R_p \end{aligned} \quad (1.5)$$

Las condiciones de borde para el balance de masa en la fase del seno del líquido (ecuación (1.3)) están dadas por:

$$\frac{\partial C_{bi}(t, 0)}{\partial Z} = \frac{v}{D_{bi}} (C_{bi}(t, 0) - C_{fi}(t)) \quad (1.6)$$

$$\frac{\partial C_{bi}(t, L)}{\partial Z} = 0 \quad (1.7)$$

La primera condición indica que, en la alimentación a la columna, la dispersión axial es igual al flujo de entrada. Por su parte, la segunda condición indica que la dispersión de la proteína a la salida de la columna es nula.

Las condiciones de borde para el balance de masa en la fase de la partícula (ecuación (1.4)) son:

$$\frac{\partial C_{pi}(t, 0, Z)}{\partial R} = 0 \quad (1.8)$$

$$\frac{\partial C_{pi}(t, R_p, Z)}{\partial R} = \frac{k_i}{\varepsilon_p D_{pi}} (C_{bi}(t, Z) - C_{pi}(t, R_p, Z)) \quad (1.9)$$

Estas condiciones igualan el flujo difusional en la superficie de la partícula con el flujo de transferencia de masa desde la fase móvil.

Para su resolución numérica, el modelo puede ser transformado en ecuaciones adimensionales si se definen los siguientes términos adimensionales:

$$c_{bi} = \frac{C_{bi}}{C_{0i}} \quad (1.10)$$

$$c_{pi} = \frac{C_{pi}}{C_{0i}} \quad (1.11)$$

$$c_{pi}^* = \frac{C_{pi}^*}{C_{0i}} \quad (1.12)$$

$$c_i^\infty = \frac{C_i^\infty}{C_{0i}} \quad (1.13)$$

$$\tau = \frac{vt}{L} \quad (1.14)$$

$$r = \frac{R}{R_p} \quad (1.15)$$

$$z = \frac{Z}{L} \quad (1.16)$$

$$Pe_{Li} = \frac{vL}{D_{bi}} \quad (1.17)$$

$$Bi_i = \frac{k_i R_p}{\varepsilon_p D_{pi}} \quad (1.18)$$

$$\eta_i = \frac{\varepsilon_p D_{pi} L}{R_p^2} \quad (1.19)$$

$$\xi_i = \frac{3Bi_i \eta_i (1 - \varepsilon_b)}{\varepsilon_b} \quad (1.20)$$

$$Da_i^a = \frac{Lk_{ai}C_{0i}}{v} \quad (1.21)$$

$$Da_i^d = \frac{Lk_{di}}{v} \quad (1.22)$$

donde el número de Peclet para la transferencia de masa (Pe_{Li}) refleja la razón entre la tasa de convección y la tasa de dispersión, mientras que el número de Biot para la transferencia de masa (Bi_i) refleja la razón entre la velocidad de transferencia de masa y la difusión en la partícula. Da_i^a y Da_i^d corresponden a los números de Damköhler para adsorción y desorción, respectivamente y C_{0i} es la concentración utilizada para adimensionalizar las concentraciones de los componentes en los distintos lugares de la columna. Esta concentración es escogida como la mayor concentración de

alimentación del componente i , $C_{oi} = \max(C_{fi}(t))$. Con esto, el modelo de balances de masa queda de la siguiente forma:

Fase seno del líquido:

Para las proteínas:

$$-\frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial^2 c_{bi}}{\partial z^2} + \frac{\partial c_{bi}}{\partial z} + \frac{\partial c_{bi}}{\partial \tau} + \xi_i(c_{bi} - c_{pi,r=1}) = 0 \quad (1.23)$$

Para la fuerza iónica o el pH:

$$-\frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial^2 c_{b,N+1}}{\partial z^2} + \frac{\partial c_{b,N+1}}{\partial z} + \frac{\partial c_{b,N+1}}{\partial \tau} = 0 \quad (1.24)$$

Fase partícula:

$$(1 - \varepsilon_p) \frac{\partial c_{pi}^*}{\partial \tau} + \varepsilon_p \frac{\partial c_{pi}}{\partial \tau} - \eta_i \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_{pi}}{\partial r} \right) \right] = 0 \quad (1.25)$$

Cinética de adsorción:

$$\frac{\partial c_{pi}^*}{\partial \tau} = Da_i^a c_{pi} \left(c_i^\infty - \sum_{j=1}^N \frac{C_{0j}}{C_{0i}} c_{pj}^* \right) - Da_i^d c_{pi}^* \quad (1.26)$$

Las condiciones iniciales y de borde adimensionales están dadas por:

$$\left. \begin{aligned} c_{bi}(0, z) &= 0 \\ \frac{\partial c_{bi}(\tau, 0)}{\partial z} &= Pe_{Li} \left[c_{bi}(\tau, 0) - \frac{C_{fi}(\tau)}{C_{0i}} \right] \\ \frac{\partial c_{bi}(\tau, 1)}{\partial z} &= 0 \end{aligned} \right\} i = 1 \dots N + 1 \quad (1.27)$$

$$\left. \begin{aligned} c_{pi}(0, z, r) &= 0, \quad c_{pi}^*(0, z, r) = 0 \\ \frac{\partial c_{pi}(\tau, 0, z)}{\partial r} &= 0 \\ \frac{\partial c_{pi}(\tau, 1, z)}{\partial r} &= Bi_i [c_{bi}(\tau, z) - c_{pi}(\tau, z, 1)] \end{aligned} \right\} i = 1 \dots N \quad (1.28)$$

La concentración de la proteína i en la fase móvil que entra en la columna está dada por:

$$\frac{C_{fi}(\tau)}{C_{0i}} = \begin{cases} 1 & 0 \leq \tau \leq \tau_{inyección} \\ 0 & \tau > \tau_{inyección} \end{cases} i = 1 \dots N \quad (1.29)$$

donde $\tau_{inyección}$ es el tiempo adimensional que toma inyectar la muestra como un pulso rectangular. Durante el intervalo $[\tau_{inyección}, \tau_{lavado}]$ los componentes no adsorbidos a la resina son eluidos,

luego de esto y durante el intervalo $[\tau_{lavado}, \tau_{elución}]$ ocurre la elución de las proteínas debido al cambio en alguna propiedad (pH o fuerza iónica) de la fase móvil:

$$\frac{C_{f,N+1}(\tau)}{C_{0,N+1}} = \begin{cases} a & \tau \leq \tau_{lavado} \\ a + b(\tau - \tau_{lavado}) & \tau_{lavado} < \tau \leq \tau_{elución} \\ c & \tau > \tau_{elución} \end{cases} \quad (1.30)$$

donde b es el gradiente lineal en términos de las variables adimensionales, y a y c corresponden a las concentraciones adimensionales antes y después del gradiente, las que están dadas por las concentraciones del modulador en los *buffers* de unión y de elución utilizados durante la cromatografía.

1.2.1 RELACIÓN AFINIDAD POR LIGANDO – CONCENTRACIÓN DE MODULADOR

En este trabajo se estudian dos relaciones distintas para la afinidad por el ligando de acuerdo con la concentración de la fase móvil: una relación lineal, basada en la relación propuesta por Melander y colaboradores (1989) y una relación exponencial propuesta en este trabajo como una alternativa a la primera.

Se plantean estas dos alternativas puesto que la primera ha sido utilizada en el modelamiento de curvas de elución de proteínas en cromatografías de intercambio iónico (Truei et al., 1992; Orellana et al., 2009), en cromatografías de fase reversa (Truei et al., 1992) y en cromatografías de interacción hidrofóbica (Lienqueo et al., 2009), pero no se ha reportado su utilización en cromatografías de afinidad.

1.2.1.1 RELACIÓN EXPONENCIAL

Esta relación permite un importante incremento del número de Damkhöler de desorción una vez que la fuerza iónica o el pH en la fase móvil alcanza un valor al cual la afinidad entre la proteína y el ligando comienza a disminuir.

Para el gradiente de pH:

$$Da_i^d = \alpha_i' \left[\exp(\beta_i'(c_{N+1} - c_{A,N+1})) - 1 \right] \quad (1.31)$$

Para el gradiente de fuerza iónica:

$$Da_i^d = \alpha_i' \left[\exp(\beta_i'(c_{A,N+1} - c_{N+1})) - 1 \right] \quad (1.32)$$

Donde α_i' y β_i' son parámetros propios de cada proteína individual, $c_{A,N+1}$ corresponde a la concentración adimensional del modulador al inicio de la cromatografía y c_{N+1} , a la concentración adimensional del modulador en el tiempo.

1.2.1.2 RELACIÓN LINEAL

Si las constantes de adsorción y desorción, en la expresión (1.2), son relativamente grandes en comparación con la tasa de transferencia de masa, se puede asumir un equilibrio de adsorción-desorción lo que conlleva a una isoterma del tipo Langmuir:

$$c_{pi}^* = \frac{a_i c_{pi}}{1 + \sum_{j=1}^N (b_j c_{0j}) c_{pj}} \quad (1.33)$$

con

$$b_i c_{0i} = \frac{D a_i^a}{D a_i^d}, \quad (1.34)$$

$$a_i = C^\infty b_i, \quad (1.35)$$

si las capacidades de adsorción son iguales para todos los componentes de la mezcla de proteínas.

De las relaciones propuestas por Melander y colaboradores (1989) y Gu y Zheng (1999), se tiene la siguiente expresión que relaciona la elución con la concentración de modulador:

$$\log_{10} b_i = \alpha_i - \beta_i \log_{10} C_{p,N+1} + \gamma_i C_{p,N+1} \quad (1.36)$$

donde α_i da cuenta de las características del sistema, β_i de las interacciones electrostáticas y γ_i , de las interacciones hidrofóbicas.

Como en este trabajo se consideró que la concentración del modulador al interior de la partícula es igual a la concentración de la fase móvil, se utilizó la siguiente variación de esta expresión:

$$\log_{10} b_i = \alpha_i + \gamma_i C_{b,N+1} \quad (1.37)$$

donde se despreció el segundo término del lado derecho de la ecuación (1.36) para un ajuste más rápido de la curva calculada a la curva experimental, respondiendo además al hecho de que en el caso particular de las inmunoglobulinas en estudio, las interacciones en los sitios de unión entre la proteína A y el anticuerpo son de carácter principalmente hidrofóbico.

Para asegurar que esta relación funcionaba mejor que la presentada en la ecuación (1.36) se realizó el ajuste de los parámetros α_i , β_i y γ_i para ambos modelos en estudio y el tiempo demandado por la primera expresión fue unas 6 veces superior al demandado por la ecuación (1.37), observándose ajustes similares entre las curvas calculadas computacionalmente y las experimentales.

1.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Para la determinación de los parámetros cinéticos involucrados en las relaciones entre la afinidad por el ligando y la concentración del modulador, se estudian dos metodologías. Una involucra un

algoritmo genético y, la otra, la función *fminsearch* del *software* matemático Matlab®. A continuación se muestra una breve descripción de cada uno de ellos.

1.3.1 ALGORITMO GENÉTICO

Un algoritmo genético es una técnica de búsqueda u optimización basada en la selección natural. A través de sucesivas generaciones los individuos que mejor se adaptan van sobreviviendo basándose en el modelo evolutivo de Darwin. La implementación computacional de este tipo de algoritmos permite la simulación de dicha evolución donde el usuario provee el ambiente, es decir la función, en el cual la población debe evolucionar (Carroll, 1999)

Carroll (1999) recomienda utilizar la técnica micro-GA (implementada en su algoritmo) con un *crossover* uniforme (*iunifrm*=1) o un único punto de *crossover* (*iunifrm*=0) y una pequeña población. El uso de esta técnica particular permite despreocuparse del tamaño de la población a utilizar o de la forma en que se realizan las mutaciones (mutaciones “*creep*” o “*jump*”). El autor de este algoritmo genético ha obtenido buenos resultados utilizando una población de 5 individuos, un *crossover* uniforme y un máximo de 100 generaciones.

1.3.2 FUNCIÓN *FMINSEARCH* DE MATLAB®

Esta función de Matlab® encuentra el mínimo de una función multivariable sin restricciones, usando el algoritmo de *simplex* Nelder-Mead descrito en Lagarias y colaboradores (1998). Éste es un método de búsqueda directa que no utiliza gradientes analíticos ni numéricos, pero para encontrar dicho mínimo necesita un punto inicial de estimación (The MathWorks, Inc. 1994-2010).

Esta función es menos eficiente que *fminunc* para problemas de un orden mayor a 2, pero cuando el problema es altamente discontinuo, puede ser más robusto.

1.3.3 COMPARACIÓN ENTRE AMBOS MÉTODOS

En términos comparativos, la mayor ventaja de utilizar el algoritmo genético desarrollado por Carroll (1999) es que no requiere de un punto inicial para encontrar los parámetros cinéticos de una proteína en particular tal que la diferencia entre la curva de elución calculada por el programa computacional y su curva experimental sea mínima, a diferencia de la función *fminsearch* de Matlab® que requiere un buen punto inicial debido a que encuentra mínimos locales en la función que está minimizando. En este último punto es necesario destacar que el algoritmo genético evita la convergencia a mínimos locales distantes del mínimo global entregando, cada cierto tiempo, valores a los parámetros cinéticos lejanos a aquellos a los que está convergiendo para ver si la función que se está optimizando toma valores menores.

En términos del tiempo que cada uno requiere para minimizar la función en estudio el algoritmo genético utilizado (bajo las condiciones recomendadas por el autor) toma en promedio alrededor de 2 veces el requerido por *fminsearch*, sin embargo, esta última función requiere de un buen punto de partida, haciendo necesaria una cantidad de tiempo extra para su búsqueda, la que puede variar

entre 0.8 y 5 veces el tiempo requerido por el algoritmo genético (alrededor de 7 horas en promedio⁴).

Si bien hasta este punto parece más atractiva la utilización del algoritmo genético, su gran desventaja es que el punto que encuentra no es necesariamente un mínimo local, sino más bien un punto perteneciente a su vecindad, por lo que depende del investigador el número de iteraciones llevadas a cabo para encontrar el óptimo deseado.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue investigar la utilización de un modelo general de balances de masa en la modelación y simulación de curvas de elución de proteínas, a baja concentración, en cromatografías de afinidad.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos trazados para lograr el objetivo general son los siguientes:

- Modelar el proceso cromatográfico de afinidad utilizando dos ligandos distintos: Proteína A recombinante (elución por gradiente de pH) y colorante *Cibacron Blue* (elución por gradiente de fuerza iónica).
- Ajustar curvas simuladas en el *software* matemático Matlab® a curvas experimentales de elución de proteínas individuales con distinta afinidad por los ligandos fijados a la matriz, determinando, para cada una de ellas, los parámetros cinéticos del modelo propuesto.
- Validar el modelo utilizando cromatogramas de mezclas de proteínas obtenidos bajo condiciones de operación distintas de las utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos.

1.4.3 ALCANCES

En este trabajo se implementó un modelo de balances de masa utilizando el *software* matemático Matlab®, que permite predecir el comportamiento de curvas de elución de mezclas de proteínas. Además, se probaron dos relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando y dos metodologías para determinar los parámetros cinéticos de cada proteína individual involucrados en dichas relaciones. Estos resultados entregaron una buena base para el estudio de cromatografías de afinidad con altas concentraciones de proteínas y el posterior diseño de una estrategia de optimización del proceso cromatográfico mediante la resolución computacional del modelo, empleando mucho menos recursos en comparación con los requeridos experimentalmente.

⁴ Estos tiempos corresponden a los utilizados en un computador personal con Windows 7 y un procesador Intel® Core™ con 4 GB de memoria RAM, ejecutando sólo un programa de Matlab®.

2 METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES

Los materiales utilizados durante este trabajo son los siguientes:

2.1.1 PROTEÍNAS

Para la investigación de las curvas para afinidad por la proteína A se utilizaron 3 inmunoglobulinas de ratón comerciales, las que presentan una afinidad baja (IgG1), moderada (IgG2a) y alta (IgG2b) por dicho ligando (GE Healthcare, 2008). Por su parte, para el estudio de la técnica *dye-ligand* (donde el ligando es el colorante *Cibacron-Blue*) se utilizaron 2 proteínas comerciales, las que fueron escogidas dadas sus características de presentar *peaks* de absorbancia a distintas longitudes de onda (Li et al., 2004). En la Tabla 2.1 se detalla la información comercial de cada una de las proteínas utilizadas.

Tabla 2.1 Proteínas utilizadas en este trabajo.

Ligando	Proteína	Código
Proteína A	Inmunoglobulina de ratón, IgG1	Sigma M5284
	Inmunoglobulina de ratón, IgG2a	Sigma M5409
	Inmunoglobulina de ratón, IgG2b	Sigma M5534
<i>Cibacron-Blue</i>	Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Sigma A7030
	Hemoglobina de conejo (Hb)	Sigma H7255

2.1.2 COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS

Se utilizaron dos columnas de afinidad con distinto ligando: *rProtein A* y *Cibacron-Blue*.

La afinidad a proteína A se estudió utilizando una columna *rProtein A FF* de 1 mL de GE Healthcare (GE Healthcare 17-5079-02), de 2.5 cm de altura y 7 mm de diámetro interno, pre-empacada y la elución de las proteína unidas al ligando se llevó a cabo por medio de un gradiente no lineal de pH.

Por su parte, para la técnica *dye-ligand* se utilizó una matriz *Blue Sepharose CL-6B* de Sigma (Sigma R9903), empacada en una columna de 1 mL, HR 5/5 de Pharmacia Biotech, de 5 cm de altura y 5 mm de diámetro interno. En este caso la elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de sal.

2.1.3 REACTIVOS

Para el desarrollo experimental y preparación de los distintos solventes se utilizaron los siguientes reactivos:

- Ácido Clorhídrico para análisis de Merck.
- Agua desionizada Milli Q grado HPLC.
- Citrato de sodio de Merck.
- Cloruro de Sodio grado HPLC de J.T. Baker.

- Etanol al 20% grado HPLC de Merck.
- Helio de Indura.
- Hidróxido de Sodio para análisis de Merck.
- Nitrato de sodio de Merck.
- Trizma de Sigma.

2.1.4 SOLVENTES

En la Tabla 2.2 se listan los *buffers* utilizados como fase móvil de las distintas cromatografías (*buffers* A y B), los que fueron filtrados y desgasificados previo a su utilización.

Tabla 2.2 *Buffers* de unión (A) y de elución (B) utilizados en las cromatografías estudiadas.

Columna	Buffer A	Buffer B
<i>rProtein A</i>	Fosfato de sodio 20 mM pH 7.0	Citrato de sodio 0.1 M pH 3.0
<i>Blue Sepharose</i>	Tris-HCl 10 mM + NaCl 0,05 M pH 7.5	Tris-HCl 10 mM + NaCl 1 M pH 7.5

Debido al bajo pH al que eluyen las proteínas en el caso de la columna *rProtein A*, las fracciones fueron colectadas en tubos con 100 μ L de *Buffer* Tris-HCl 1 M a pH 9.0, por mL de fracción colectada.

Para la regeneración de la matriz *Blue Sepharose* se utilizó *buffer* Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M a pH 8.5 y *buffer* acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M a pH 4.5.

2.1.5 EQUIPOS

2.1.5.1 CROMATOGRAFÍA

Todas las cromatografías fueron llevadas a cabo en un sistema ÄKTA Purfier 10, controlado por el *software* UNICORN 5.11 de GE Healthcare. Éste, es un cromatógrafo líquido de presión media, compatible con detector UV a 280 y 405 nm, con monitores de UV, conductividad y pH, además de un colector de fracciones.

2.1.5.2 SIMULACIONES

Las simulaciones fueron llevadas a cabo en un computador con Windows 7 y un procesador Intel® Core™ i3 con 4 GB de memoria RAM. Por su parte, el ajuste de los parámetros fue llevado a cabo en el Cluster del CIByB, que posee 5 nodos de cálculo, cada uno con 2 procesadores de 4 cores, todos con el sistema operativo Debian Linux.

2.1.6 SOFTWARES

Para la determinación de los parámetros cinéticos, llevada a cabo íntegramente en el Cluster, y para el cálculo de curvas de elución de proteínas y análisis de datos, llevada a cabo en un computador personal, se utilizaron los siguientes *softwares*:

Cluster

Condor Para el manejo de la cola de tareas. (Los comandos y el formato de los archivos necesario para interactuar con Condor se presentan en el Anexo A)

Computador Personal

Matlab 7.9 de Math Works Inc. Para la programación y resolución del modelo de ecuaciones diferenciales.

Microsoft Excel 2007 Para el análisis de datos experimentales y calculados.

WinSCP Para copiar archivos en Condor.

Kitty_portable Para enviar tareas a Condor.

Cisco VPN Client Para la conexión a la red de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile y tener acceso a Condor desde el domicilio particular.

2.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.2.1 CROMATOGRAFÍA

Para la determinación de los parámetros cinéticos de las proteínas, en cada uno de los sistemas estudiados, se realizaron cromatografías de proteínas individuales utilizando como fase móvil los *buffers* A (para la unión de las proteínas) y B (para la elución), mencionados en la sección anterior (Tabla 2.2) y trabajando a temperatura ambiente. El procedimiento detallado, desde la preparación de los *buffers* hasta la utilización del cromatógrafo, se presenta en el Anexo B.

Las condiciones de operación utilizadas en cada uno de los sistemas se presentan en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3 Condiciones de operación utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos.

Parámetro	<i>rProtein A</i>	<i>Blue Sepharose</i>
Alimentación (mL)	0.1	0.5
Concentración (mg/mL)	0.15	1
Flujo (mL/min)	1	0.1
Lavado de la columna (vc)	5	2
Longitud del gradiente (vc)	10	5.5
Concentración inicial de modulador (pH o M)	7.0	0.05
Concentración final de modulador (pH o M)	3.0	1
Pendiente de gradiente (min ⁻¹ o M/min) ⁵	-0.4	0.17

Para probar la utilidad del modelo, se realizó una serie de experimentos variando la concentración inicial de las proteínas, el volumen de inyección o alimentación (*vm*), el flujo (*F*) y la duración del gradiente manteniendo la composición de los *buffer* A y B. Debido a que se contaba con una baja

⁵ La pendiente del gradiente se calcula como la razón entre diferencia de las concentraciones inicial y final del modulador y el tiempo de duración del gradiente. Debido a que en el caso del gradiente de pH, éste no es lineal, la pendiente del gradiente se determina utilizando la variación del *buffer* B en la alimentación, que sí se realiza de manera lineal.

cantidad de proteína y a la dificultad de medir la concentración de inyección⁶, se varió más de una condición de operación en cada experimento. Dichas condiciones se presentan en las Tablas 2.4 y 2.5, donde los experimentos han sido nombrados de acuerdo con el ligando utilizado en cada corrida: PA (proteína A) en el caso en que se utilizó la columna *HiTrap rProtein A FF* y CB (*Cibacron-Blue*) en el caso en que se utilizó la resina *Blue Sepharose*. El número asociado a cada sigla sólo corresponde al orden en que se realizó cada uno de los experimentos, siendo los primeros 2 (en el caso de CB) ó 3 (en el caso de PA) los experimentos utilizados para la determinación de los parámetros cinéticos de las proteínas individuales cuyas condiciones de operación fueron presentadas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.4 Condiciones de operación de experimentos de afinidad por proteína A para comparación con resultados experimentales.

Exp.	Concentración (mg/mL)			Alimentación (mL)	Flujo (mL/min)	Lavado (vc)	Duración del gradiente (vc)
	IgG1	IgG2a	IgG2b				
PA4	0.008	0.008	-	0.5	1.0	5	20
PA5	-	0.017	0.013	0.2	1.0	5	20
PA6	0.090	-	0.130	0.1	1.3	5	10
PA7	0.090	0.090	-	0.1	0.7	5	10
PA8		0.050	0.064	0.2	1.0	5	10
PA9	0.065	0.065	0.065	0.2	1.0	5	10
PA10	0.016	-	0.016	0.1	1.0	5	20
PA11	0.004	-	0.006	0.1	1.0	5	13

Tabla 2.5 Condiciones de operación de experimentos en *Blue Sepharose* para comparación con resultados experimentales.

Exp.	Concentración (mg/mL)		Alimentación (mL)	Flujo (mL/min)	Lavado (vc)	Duración del gradiente (vc)
	BSA	Hb				
CB3	0.75	0.75	0.5	0.10	5	7.0
CB4	0.75	0.95	0.5	0.13	5	5.5
CB5	1.30	1.30	0.5	0.13	5	5.5
CB6	0.70	0.70	0.5	0.13	5	5.5
CB7	0.90	1.20	0.5	0.10	2	5.5
CB8	0.75	0.75	0.5	0.10	2	10.0
CB9	0.90	0.90	0.5	0.50	2	10.0
CB10	1.00	1.00	0.5	0.10	2	20.0

⁶ En el caso de la BSA y la Hb ocurrieron errores en la medición de la masa previo a su disolución en el *buffer* de unión y en el caso de las inmunoglobulinas, hubo un error asociado a su concentración a partir del efluente de la columna. Sin embargo, debido a que se trata de bajas concentraciones de proteína, esto no debiera influir en el tiempo de retención de la proteína, sólo debiera desplazar la curva en el eje vertical.

2.2.2 RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ABSORBANCIA

Para cada una de las proteínas estudiadas se calculó un factor de correlación, FC , entre su absorbancia a 280 ó 405 nm (mAU) y su concentración, en mg/mL. Debido a que esta relación es equivalente a la que existe entre la cantidad de proteína inyectada a la columna cromatográfica (mg) y el área bajo la curva de elución de dicha proteína (mAU·mL), el factor FC se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$m_{proteína}(mg) = FC \left(\frac{mg}{mAU \cdot mL} \right) \cdot A_{peak}(mAU \cdot mL) \quad (2.1)$$

Donde $m_{proteína}$ es la masa de proteína inyectada a la columna, A_{peak} es el área bajo el *peak* de absorbancia de la proteína y FC la constante de proporcionalidad entre ambas.

Si se considera la masa de proteína inyectada y el área bajo la curva de elución, por unidad de volumen, se obtiene la relación utilizada para determinar la concentración de proteína a partir de la absorbancia medida en el cromatógrafo.

$$C \left(\frac{mg}{mL} \right) = FC \left(\frac{mg}{mAU \cdot mL} \right) \cdot Abs(mAU) \quad (2.2)$$

Donde C corresponde a la concentración de proteína y Abs a la absorbancia medida por el cromatógrafo.

2.3 METODOLOGÍA DE SIMULACIÓN

Para obtener las curvas de elución de proteínas fue necesario implementar el modelo descrito por las ecuaciones (1.23)-(1.31), con las condiciones iniciales y de borde (1.27) y (1.28), en código Matlab, discretizando las ecuaciones en derivadas parciales. Una vez implementado y con el fin de resolver el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias obtenidas, se definieron los parámetros físicos de la columna –como largo de la columna y tamaño de los poros– y de la muestra de proteínas inyectada en la misma, como concentración y volumen de muestra. Por su parte, los números adimensionales presentes en el modelo –como los números de Peclet y de Biot para la transferencia de masa– fueron determinados a través de correlaciones encontradas en la bibliografía. Con todo esto fue posible simular las curvas obtenidas en los procedimientos experimentales, sin embargo, los parámetros cinéticos: α' , β' y Da^a ó α , γ y Da^d , son propios de cada proteína en particular, por lo que antes de poder simular distintas condiciones de operación de cromatografías fue necesario, con muestras de proteínas puras con concentración conocida, definir dichos parámetros. Para esto último se procedió de dos formas alternativas: se utilizó un algoritmo genético (Carroll, 1999) y la función de Matlab *fminsearch*, para encontrar los valores minimizando la suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y simulados.

A continuación se detalla el procedimiento seguido en este trabajo.

2.3.1 DISCRETIZACIÓN ESPACIAL DEL MODELO DE BALANCES DE MASA

Gu y colaboradores (1990) desarrollaron un procedimiento eficiente y robusto para la solución del sistema de ecuaciones en derivadas parciales contenidas en el modelo de balances de masa utilizado en este trabajo. El procedimiento involucra dos partes: primero, los ejes axiales y radiales $-z$ y r , son discretizados, de manera de obtener un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, luego, este sistema (con condiciones iniciales) es resuelto utilizando un *solver*, que en este caso corresponderá a la herramienta *ode15s* del programa Matlab. Esta herramienta es recomendada para la resolución de problemas robustos (*"stiff"*) o cuando se tiene un problema diferencial-algebraico. Es un *solver* multipaso de orden variable que se basa en fórmulas de diferenciación numérica y opcionalmente utiliza el método de Gear (The Mathworks Inc., 1994-2010).

Para el balance de masa en la fase del seno del líquido se utilizó el método numérico de elementos finitos con 5 elementos cuadráticos (N_e), es decir, 11 nodos ($N_z = 2N_e + 1$). Un mayor número de nodos utiliza una mayor cantidad de recursos y el resultado es el mismo, de acuerdo con lo observado en ensayos previos. Por otro lado, para el balance de masa en la partícula se utilizó el método de colocación ortogonal con 2 ó 3 nodos internos (N_r). Usualmente se utiliza un valor igual a 2 (Gu et al., 1993), pero se probará también con $N_r = 3$, en caso de no obtener los resultados deseados con el valor anterior.

La estrategia de solución se presenta en el siguiente diagrama:

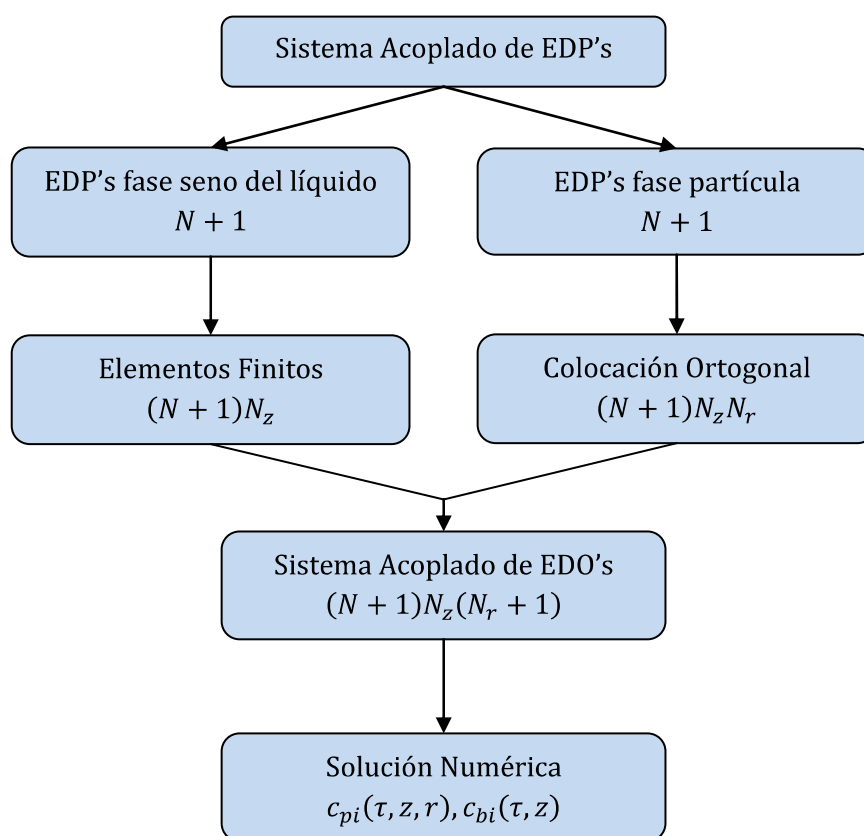


Figura 2.1 Estrategia de solución para el modelo de balances de masa multicomponente general. Fuente: Gu, 1995.

2.3.2 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ADIMENSIONALES

2.3.2.1 NÚMERO DE PECLET PARA LA TRANSFERENCIA DE MASA

El número de Peclet (Pe_{Li}), que refleja la razón entre las tasas de convección y dispersión axial, se estimó utilizando la correlación propuesta por Chung y Wen (1968), que es válida para Re entre 10^{-3} y 10^3 (Li, Gu y Gu 1998):

$$Pe_{Li} = \frac{L}{2R_p \varepsilon_b} (0.2 + 0.011 Re^{0.48}), \quad (2.3)$$

donde Re corresponde al número de Reynolds:

$$Re = \frac{2\rho_l v R_p}{\mu_l}, \quad (2.4)$$

con L largo de la columna (cm), R_p radio de la partícula de adsorbente (cm), ε_b fracción de huecos de la columna, v velocidad intersticial de la fase móvil (cm/s) definida en la ecuación (2.5), ρ_l la densidad de la fase móvil (g/cm³) y μ_l la viscosidad de la fase móvil (g/(cm·s)).

$$v = \frac{4F}{\pi d^2 \varepsilon_b}, \quad (2.5)$$

donde d es el diámetro interno de la columna (cm) y F es el flujo volumétrico de la fase móvil (mL/s).

2.3.2.2 CONSTANTE ADIMENSIONAL η_i

Esta constante está definida como:

$$\eta_i = \frac{\varepsilon_{pi} D_{pi} L}{R_p^2 v}, \quad (2.6)$$

donde ε_{pi} corresponde a la porosidad de la partícula para el componente i , L al largo de la columna (cm) y D_{pi} a la difusividad intrapartícula efectiva (cm²/s), la que puede determinarse mediante la correlación de Satterfield y Colton (1973) (Li et al., 1998):

$$D_{pi} = \frac{D_{mi}}{\tau_{tor}} (1 - 2.104\lambda_i + 2.09\lambda_i^3 - 0.95\lambda_i^5), \quad (2.7)$$

donde τ_{tor} corresponde al factor de tortuosidad, que para sólidos porosos comerciales varía entre 2 y 6 (Gu et al., 2003). D_{mi} corresponde a la difusividad molecular (cm²/s) y λ_i a la razón entre el diámetro de la molécula de soluto (d_{mi}) y el diámetro del macroporo de la partícula (d_{poro}).

Si se asume que las moléculas de soluto son esféricas, entonces d_{mi} puede calcularse con la relación empírica de Marshall (1978) para proteínas hidratadas (Gu y Zheng, 1999):

$$d_{mi} = 1.44PM_i^{1/3} \quad (2.8)$$

Por su parte, la difusividad molecular puede ser determinada usando la correlación semiempírica de Polson (1950) válida para sustancias orgánicas de peso molecular mayor a 1000 (Gu y Zheng, 1999):

$$D_{mi} = 2.74 \cdot 10^{-5} PM_i^{-1/3} \quad (2.9)$$

2.3.2.3 NÚMERO DE BIOT PARA LA TRANSFERENCIA DE MASA

El número de Biot se define como:

$$Bi_i = \frac{k_i R_p}{\varepsilon_{pi} D_{pi}}, \quad (2.10)$$

donde k_i corresponde al coeficiente de transferencia de masa en el film (cm/s). Este número adimensional representa la razón entre la transferencia de masa en el film externo de la partícula y la tasa de difusión en su interior.

De acuerdo con la correlación presentada por Wilson y Geankoplis en 1966, el coeficiente de transferencia de masa en el film puede ser determinado utilizando la siguiente expresión (Gu et al., 2003):

$$k_i = 0.687 v^{1/3} \left(\frac{\varepsilon_b R_p}{D_{mi}} \right)^{-2/3} \quad (2.11)$$

2.3.2.4 CONSTANTE ADIMENSIONAL ξ_i

Esta constante se define como:

$$\xi_i = 3Bi_i \eta_i \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \quad (2.12)$$

donde los valores Bi_i y η_i corresponden a los calculados previamente.

2.3.3 ALGORITMO DE SIMULACIÓN

Para simular las curvas de elución de proteínas, en los dos tipos de cromatografías de afinidad estudiados, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se fijaron los valores de los parámetros del modelo⁷:
 - ✓ Capacidad máxima de la columna, C^∞ .

⁷ Los criterios tomados en cuenta para elegir los valores de cada uno de estos parámetros se presentan en la sección 3.2.2.

- ✓ Diámetro y largo de la columna, d y L .
 - ✓ Factor de tortuosidad, τ_{tor} .
 - ✓ Fracción de huecos de la columna, ε_b .
 - ✓ Número de proteínas en la muestra, N .
 - ✓ Número de elementos cuadráticos, N_e .
 - ✓ Número de nodos de colocación ortogonal, N_r .
 - ✓ Peso molecular de los componentes, PM_i .
 - ✓ Porosidad de la partícula por el componente i , ε_{pi} .
 - ✓ Radio de la partícula de adsorbente, R_p .
 - ✓ Tamaño de macroporo de la partícula, d_{poro} .
2. Se fijaron las condiciones de operación para cada proteína o mezcla de proteínas:
 - ✓ Concentración inicial y final del modulador, $C_{A,N+1}$ y $C_{B,N+1}$.
 - ✓ Concentración y volumen de muestra, C_{0i} y vm .
 - ✓ Flujo volumétrico de la fase móvil, F .
 - ✓ Longitud del gradiente.
 3. Se calcularon las constantes adimensionales Pe_{Li} , Bi_i , η_i , ξ_i y se crearon las variables adimensionales de concentración y tiempo.
 4. Se discretizaron las ecuaciones en derivadas parciales.
 5. Se resolvió el sistema adimensional de EDO's, con las condiciones iniciales y de borde, en un intervalo de tiempo adimensional, utilizando la herramienta *ode15s* de Matlab.
 6. Se volvió a dimensionalizar los valores de concentración y tiempo, obteniendo los perfiles de elución simulados.

El cálculo de las curvas de elución de proteínas, utilizando Matlab®, para su comparación con datos experimentales fue llevado a cabo en un computador personal como el descrito en la sección 2.1.5.2.

2.3.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Para determinar los parámetros cinéticos primero se implementó el modelo en código Matlab. Estos parámetros son los únicos valores extra que necesitó el programa para calcular las curvas de elución de las proteínas.

La idea tanto del algoritmo genético, como de *fminsearch*, es generar distintos valores de los parámetros cinéticos y encontrar aquellos para los que se cumpla que la suma de las diferencias al cuadrado entre cada punto obtenido por la simulación y su correspondiente dato experimental más cercano, sea mínima.

Para el algoritmo genético, se buscaron valores entre $1 \cdot 10^{-5}$ y 100, utilizando poblaciones de tamaño 10 por un máximo de 100 generaciones. En el caso de *fminsearch*, el punto de partida se generó simulando curvas de elución con valores de los parámetros cinéticos entre 1 y 50, calculando la misma función descrita previamente. Luego se eligió aquella combinación para la cual la función adquiere su valor mínimo. Estos rangos se escogieron de esta forma, pues engloban los valores obtenidos previamente por modelamientos similares a los estudiados en este trabajo (Lienqueo et

al., 2009; Orellana et al., 2009), en los que se usó la relación afinidad por el ligando - concentración de modulador, propuesta por Melander y otros (1989) .

Una vez determinados los valores de α' y β' para cada proteína (en el caso de la relación exponencial), el Da^d , como función de la concentración de modulador, se calculó utilizando las ecuaciones (1.31) ó (1.32), de acuerdo con el tipo de elución utilizado. Para el caso de la relación lineal, el Da^a se calculó como función de la concentración de modulador utilizando la expresión (1.34), con los valores de α y γ también determinados previamente.

La determinación de los parámetros cinéticos de las 5 proteínas estudiadas en este trabajo fue llevado a cabo íntegramente en el Cluster ubicado en las dependencias del CIByB. Esto debido a la gran cantidad de tiempo y recursos computacionales que requirió la determinación de dichos parámetros en ensayos previos.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este trabajo se estudiaron dos técnicas de cromatografías de afinidad: *dye-ligand* y afinidad a proteína A recombinante, donde la elución se llevó a cabo mediante un gradiente creciente lineal de fuerza iónica (dado por la concentración de cloruro de sodio en la fase móvil) y un gradiente decreciente no lineal de pH, respectivamente.

Las curvas de elución de proteínas obtenidas de los datos de absorbancia entregados por el Äkta no pueden ser utilizadas directamente para su estudio puesto que los *buffers* de unión y elución presentan distinta absorbancia a 280 y 405 nm. Para corregir esto fue necesario realizar, por cada condición estudiada, una línea base que corresponde a la realización del método, pero alimentando *buffer* de unión en lugar de una muestra. De esta forma, los datos de absorbancia tienen relación únicamente con la cantidad de proteína que abandona la columna en el tiempo.

Con los datos corregidos para las proteínas individuales fue posible obtener una relación entre concentración de proteína y absorbancia y determinar los parámetros cinéticos de cada una de ellas.

3.1.1 CURVAS DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS PURAS

Los cromatogramas de las proteínas puras se presentan en las Figuras 3.1 y 3.2, donde se graficaron juntas las 3 Inmunoglobulinas con afinidad por la proteína A recombinante (Figura 3.1) y las 2 proteínas que se unen a la *Blue Sepharose* (Figura 3.2). En estas curvas no se muestran los contaminantes, que eluyen antes de iniciado el gradiente.

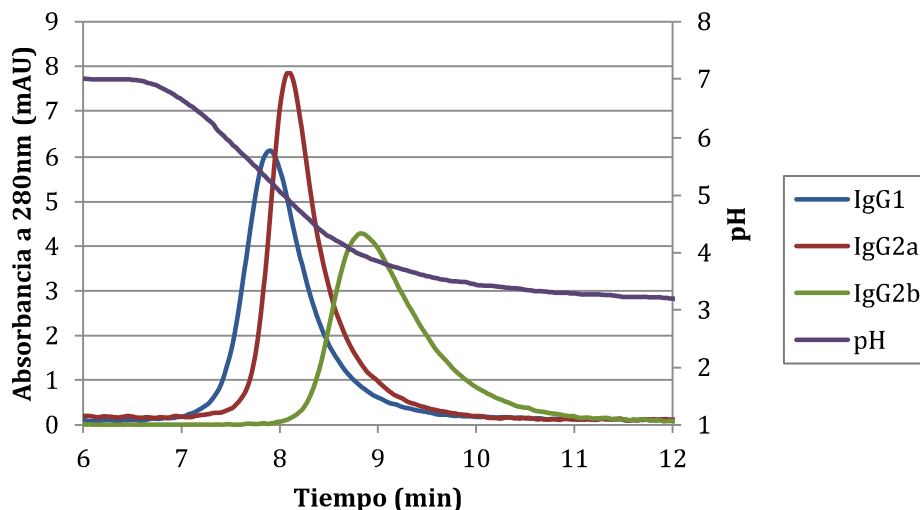


Figura 3.1 Cromatogramas de las Inmunoglobulinas puras estudiadas en este trabajo.

Para cada cromatografía el volumen de la alimentación fue de 0.1 mL con una concentración de proteína de 0.15 mg/mL. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min, con un pH inicial de 7.0 y una pendiente de gradiente equivalente a -0.4 min^{-1} .

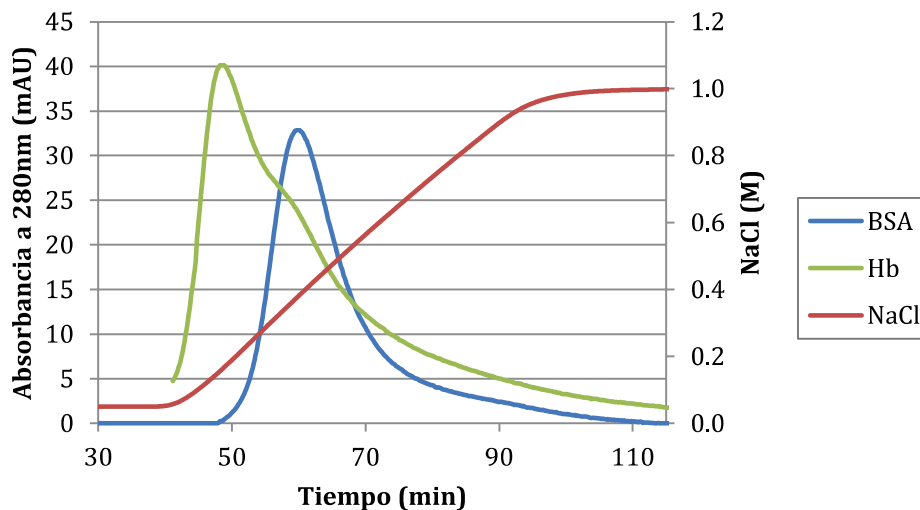


Figura 3.2 Cromatogramas de las proteínas con afinidad por Blue Sepharose estudiadas en este trabajo.

Para cada cromatografía el volumen de la alimentación fue de 0.5 mL con una concentración de proteína de 1 mg/mL. El flujo de la fase móvil fue de 0.1 mL/min, con una concentración de NaCl igual a 0.05 M y una pendiente de gradiente equivalente a 0.017M/min.

En la Figura 3.1 se puede observar que el gradiente de pH es no lineal, debido a que la forma en que se mezclan los *buffer* de unión y elución utilizados en estos experimentos no entregan una variación de pH en la misma proporción. El gradiente de fuerza iónica, en cambio, sí lo es, salvo al inicio y al término del mismo. Esto último se debe, como explican Truei y colaboradores (1992), a la forma en que el equipo mezcla los *buffers* para producir la fuerza iónica o el pH deseado.

En cuanto a la forma de las curvas obtenidas, en el caso de las Inmunoglobulinas, se observan *peaks* más bien simétricos, salvo por la IgG2b, la cual presenta una cola de desorción menos simétrica, probablemente debido a la región del gradiente en la cual eluye. En el caso de las proteínas eluidas con un gradiente de fuerza iónica, los *peaks* son bastante menos simétricos lo que puede deberse, en parte, al ajuste realizado con la línea base. Por lo general este tipo de *peaks* (asimétricos) se observa en situaciones en que la alimentación a la columna y la concentración de la muestra son muy grandes, como ocurre en separaciones de escala industrial según lo ha reportado previamente Orellana y colaboradores (2009). Sin embargo, este mismo comportamiento se ha visto en cromatografías de afinidad, siendo atribuido a bajas tasas de desorción debido a la dificultad de disociar simultáneamente los múltiples sitios de unión de las proteínas durante la elución (Truei et al., 1992). Otra razón que ha sido reportada previamente también por Truei y colaboradores (1992), consiste en la heterogeneidad del tamaño de los poros de las partículas de la resina, esto debido a que al entrar las moléculas proteicas en poros más pequeños, la difusión es aún más lenta en ellos, causando curvas más asimétricas.

3.1.2 RELACIÓN ENTRE ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Una vez ajustados los datos para cada una de las proteínas puras, se calculó el área bajo el *peak* de absorbancia obtenido, relacionándolo con la cantidad de proteína pura inyectada a la columna. Los valores de los factores *FC* calculados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3.1 Valores del factor FC que relaciona la absorbancia medida por el cromatógrafo con la concentración de proteína.

Proteína	$FC \left(\frac{mg}{mAU \cdot mL} \right)$	
	280 nm	405 nm
IgG1	0.0030	
IgG2a	0.0029	
IgG2b	0.0030	
BSA	0.0098	
Hb	0.0052	0.0012

Estos valores fueron utilizados para transformar los datos de concentración, entregados por el programa, en datos de absorbancia para ser comparados con los resultados experimentales. En todos los casos se comparó la absorbancia de las mezclas a 280 nm. En el caso de la Hb, el valor del FC para 405 nm, permitió comparar directamente la masa de esta proteína presente en las mezclas, a través de la absorbancia de ellas a 405 nm.

3.2 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO EN CÓDIGO MATLAB

3.2.1 DETERMINACIÓN DEL GRADIENTE DE pH Y SU EFECTO EN EL TIEMPO QUE DURA LA SIMULACIÓN

Como se observa en la Figura 3.3, el pH no presenta una relación lineal con la concentración del *buffer* de elución, como lo hace la concentración de sal. Más aún, para los distintos gradientes estudiados el pH no se comportó de la misma forma, lo que dificultó su simulación utilizando el modelo computacional. Para solucionar esta situación, el programa recibe los datos experimentales del pH de la cromatografía a simular y realiza interpolaciones, utilizando el método de *Spline*, para estimar la curva de pH en cada punto utilizado por el programa para la solución del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias.

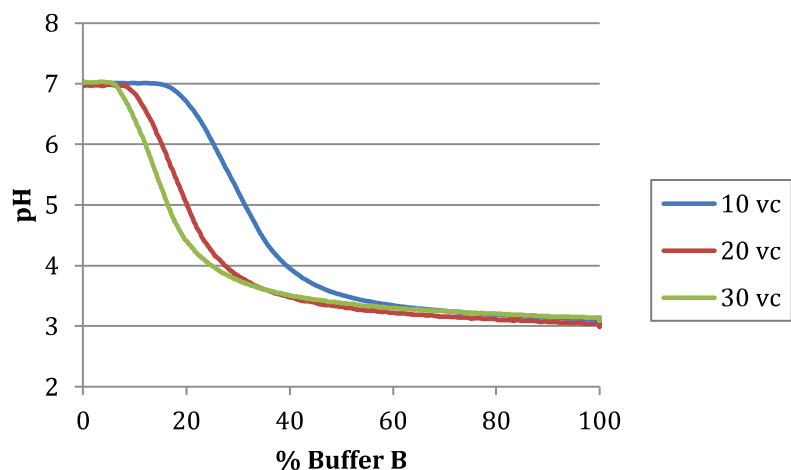


Figura 3.3 Relación entre el pH y la concentración del *buffer* de elución, para distintos largos de gradiente utilizados para la elución de las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante.

Debido a que el programa está obligado a leer los datos experimentales del pH cada vez que realiza el cálculo de una curva de elución, el tiempo empleado en la simulación es alrededor de 5 veces mayor al empleado por las simulaciones de las proteínas que eluyen por un gradiente de fuerza iónica (que demoran alrededor de 6 segundos). Esto afecta directamente la determinación de los parámetros cinéticos, demandando también 5 veces el tiempo requerido por el sistema de *Blue Sepharose*.

3.2.2 PARÁMETROS FÍSICOS UTILIZADOS

Los valores de los distintos parámetros físicos utilizados en la implementación del programa computacional que determina los perfiles de elución de las proteínas se presentan en la Tabla 3.2. La justificación del uso de cada uno de ellos se describe a continuación.

Tabla 3.2 Parámetros físicos utilizados para la determinación de los parámetros adimensionales.

Parámetro	Valor o rango de valores	
	<i>Blue Sepharose</i>	<i>rProtein A</i>
Capacidad de la columna, C^∞ (mg/mL)	11 ^a	50 ^a
Densidad de la fase móvil, ρ (g/cm ³)	0.99823 ^b	0.99823 ^b
Diámetro interno de la columna (cm)	0.5 ^c	0.7 ^c
Diámetro de macroporo de la partícula, d_{poro} (Å)	300 ^d	700 ^d
Fracción de huecos intrapartícula de la columna, ε_b	0.4 ^e	0.4 ^e
Largo de columna, L (cm)	5 ^c	2.5 ^c
Peso molecular, PM (kDa)	BSA 66.0 ^a	150 ^a
	Hb 64.5 ^a	
Porosidad de la partícula, ε_p	BSA 0.55 ^f	0.55
	Hb 0.58 ^f	
Radio de partícula, R_p (cm)	0.0045 ^c	0.0045 ^c
Tortuosidad, τ_{tor}	[2-6] ^e	[2-6] ^e
Viscosidad de la fase móvil, μ (g/(cm·s))	0.01005 ^b	0.01005 ^b

^a Sigma-Aldrich Co., 2010

^b Geankoplis, 1998

^c GE Healthcare, 2008 y Sigma-Aldrich Co., 2010

^d Gustavsson y Larsson, 2006

^e Gu et al., 2003 y Li et al., 2004

^f Li et al., 2004

3.2.2.1 DENSIDAD Y VISCOSIDAD DE LA FASE MÓVIL

Debido a que no se contaba con datos de densidad o de viscosidad de la fase móvil utilizada en los dos sistemas estudiados, ya sea experimentales o reportados en la literatura, se utilizaron datos para el agua a 20°C y 1 atm entregados por Geankoplis (1998).

3.2.2.2 PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS

El peso molecular de las proteínas estudiadas fue obtenido a partir de la información que entrega el proveedor, y que está disponible en la web (Sigma-Aldrich Co., 2010) Estos valores son necesarios principalmente para la determinación de los adimensionales Bi_i , η_i y ξ_i , y una pequeña variación de

ellos, afecta muy levemente el resultado final de la simulación. Debido a que su determinación experimental puede conllevar un error inferior al 1% al en comparación con los datos obtenidos desde la literatura (de acuerdo a lo expuesto por Orellana, 2010), no se consideró estrictamente necesario determinar estos valores en el laboratorio.

3.2.2.3 DIMENSIONES DE LA COLUMNA Y PROPIEDADES DE LA MATRIZ

Las dimensiones de las columnas utilizadas fueron obtenidas desde información entregada por el fabricante (GE Healthcare, 2008) y el proveedor (Sigma-Aldrich Co., 2010), así como el radio de la partícula de adsorbente y la capacidad máxima de la columna. Esta última corresponde a la capacidad total de unión de 1 mL de medio de adsorbente y los valores reportados son para Albúmina de suero humano, en el caso de la matriz *Blue Sepharose*, y para IgG humano, en el caso de la proteína A recombinante. En el modelo se utilizaron concentraciones molares de proteína, para lo cual se consideró que el peso molecular de la albúmina de suero humano es 66.5 kDa (Sigma-Aldrich Co., 2010) y el de la IgG humana, 152 kDa (Sigma-Aldrich Co., 2010). Se utilizaron estas capacidades máximas de unión debido a que no se contaba con una cantidad suficiente de proteína o adsorbente para realizar experimentos de adsorción batch o de análisis frontal (T. Gu 1995), que permitieran su determinación experimental. Esto último no debiera significar mayores errores en las simulaciones debido a que se trabajó con proteínas de un peso molecular muy similar, por lo que la capacidad máxima de la matriz para cada proteína, debiera ser también, similar.

El tamaño de macroporo utilizado en este trabajo corresponde al reportado por Gustavsson y Larsson (2006) para soportes basados en 6 y 4% de agarosa, como es el caso de la matriz *Blue Sepharose* y de la columna *HiTrap*, respectivamente. Por su parte, a la fracción de huecos intrapartícula se le asignó el valor utilizado por otros autores que han trabajado modelando cromatografías de afinidad previamente (Gu et al., 2003; Li et al., 2004).

En cuanto a la fracción de volumen del macroporo accesible para cada proteína, ε_p , se utilizaron valores muy parecidos para el caso de la BSA y la Hb reportadas previamente (Li et al., 2004). Sus valores están relacionados con el tamaño de cada una de las proteínas. La BSA, al ser más grande, tiene un menor acceso al macroporo, y por lo tanto, la porosidad de la partícula para esta proteína es menor. Para el caso de las IgG's se utilizó el mismo valor para cada una de las proteínas, puesto que todas ellas tienen el mismo peso molecular. Dado que no se contaba con referencias para estas moléculas en particular, se decidió utilizar el mismo valor que para la BSA.

Por último, debido a que se trabajó con grupos de proteínas de tamaño similar, el efecto de exclusión por tamaño es semejante, por lo que no es necesario incluir en el modelo desarrollado en este trabajo efectos de exclusión por tamaño o capacidades de saturación desiguales, como las descritas por Gu (1995).

3.2.2.4 FACTOR DE TORTUOSIDAD

El factor de tortuosidad tiene relación con la longitud de los canales internos de los macroporos de la partícula de adsorbente, siendo un valor razonable para sólidos porosos comerciales entre 2 y 6 (Gu et al., 2003). En la bibliografía consultada, para distintos tipos de cromatografía incluyendo

afinidad, intercambio iónico e interacción hidrofóbica, se utilizan valores de tortuosidad entre 2 (Orellana et al., 2009) y 4 (Gu et al., 2003). Siendo este un valor arbitrario y dada la falta de información al respecto, se decidió probar con valores de tortuosidad iguales 2, 4 y 6, y ver con cuál de ellos se obtiene un mejor ajuste.

3.2.3 PARÁMETROS CINÉTICOS

La estimación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo utilizando un algoritmo genético (Carroll, 1999) y la función *fminsearch* de Matlab®, minimizando la razón entre el cuadrado de la diferencia punto a punto entre los datos experimentales y los valores calculados por el programa y el número total de datos comparados. Esta estimación se llevó a cabo íntegramente el Cluster del CIByB.

A continuación se realiza una comparación entre ambos métodos, y entre las dos relaciones de elución estudiadas en este trabajo.

3.2.3.1 COMPARACIÓN ENTRE EL ALGORITMO GENÉTICO Y LA FUNCIÓN *FMINSEARCH*

Se procedió a comparar los dos métodos propuestos para la determinación de los parámetros cinéticos, utilizando los datos experimentales obtenidos para las eluciones con gradiente de pH y la relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.

Utilizando el algoritmo genético se determinaron los parámetros cinéticos para cada proteína, con 2 y 3 nodos de colocación ortogonal y un factor de tortuosidad igual a 2 y 4. En todos los casos se usó una población de 10 individuos y un máximo de 200 generaciones, debido a que se observó que 100 generaciones eran insuficientes para lograr el ajuste deseado. Con ello, el tiempo invertido en determinar cada conjunto de parámetros cinéticos varió entre 7 (para $N_r = 2$) y 10 horas (para $N_r = 3$). Si el número encontrado luego de las 200 iteraciones no se consideraba satisfactorio, se repetía el procedimiento partiendo de la última generación calculada.

Al realizar el ajuste se observó que un mayor Da^a desplaza la curva hacia la derecha, lo cual es consistente con el hecho de que dicho número esté relacionado con la adsorción de la proteína en la matriz: al ser éste mayor, la proteína presenta mayor afinidad por el ligando fijado a la matriz, y por ende, eluye más tarde. Por su parte, el parámetro β' afecta la simetría del *peak*, al ser mayor este valor, el *peak* es más agudo y la cola de desorción menos distorcionada. Por último, el parámetro α' afecta levemente el tiempo en el cual eluye la proteína. Una variación en su valor se refleja en un desplazamiento de la curva hacia la izquierda (si α' es mayor) o derecha (si α' es menor).

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la IgG1 se presentan en la Tabla 3.3:

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos de la IgG1 estimados para distintos valores de tortuosidad y número de nodos de colocación ortogonal, obtenidos mediante el algoritmo genético para la relación de elución exponencial.

Parámetro	$\tau_{tor} = 2$		$\tau_{tor} = 4$	
	$N_r = 2$	$N_r = 3$	$N_r = 2$	$N_r = 3$
Da^a	1.32	4.55	29.56	11.88
β'	20.45	19.16	29.22	22.50
α'	4.22	15.78	13.60	13.68
$Error_p^a$	0.0019	0.0023	0.0175	0.0015
Tiempo de ejecución ^b (s)	31	40	45	50

^a Suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los datos calculados por el programa computacional, dividido por el número de datos que se compararon.

^b Corresponde al tiempo promedio que demora el programa computacional en calcular la curva de elución y compararla con los correspondientes datos experimentales.

En la Tabla 3.3 se observa que el menor error se obtiene para una tortuosidad igual a 4, utilizando 3 nodos de colocación ortogonal. Situación que se repite para el caso de las otras dos inmunoglobulinas (ver Anexo D). Sin embargo, en dichas situaciones, tal y como se observa en la Figura 3.4 y en las Figuras 6.5-6.7 del Anexo D, ocurre una pequeña elución antes del comienzo del gradiente, la cual puede deberse o bien a que la proteína efectivamente eluye antes (exigiendo que el valor de la tortuosidad deba ser menor) o a que el número de nodos de colocación ortogonal es insuficiente (error del método numérico). Para evitar este pequeño *peak*, debido a que aumentar el número de nodos de colocación ortogonal resulta contraproducente para la rapidez con la que se calcula la curva de elución (ver tiempos de ejecución en la Tabla 3.3), al trabajar con esta relación de elución, se deben utilizar 3 nodos de colocación ortogonal, obteniéndose para este sistema un valor de tortuosidad igual a 2.

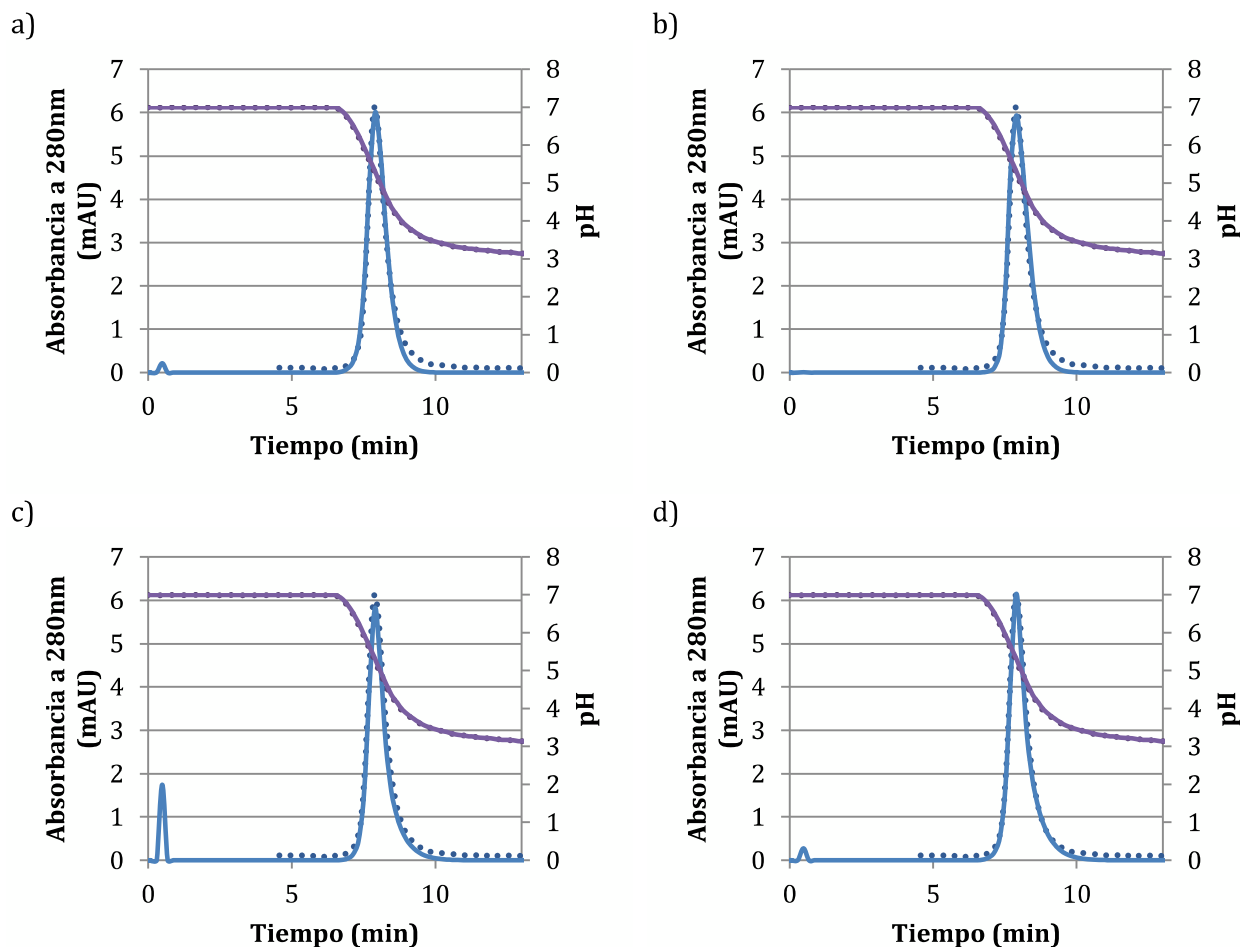


Figura 3.4 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de la proteína IgG1 utilizando un algoritmo genético y una relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.

Las líneas punteadas corresponden a los datos experimentales, mientras que las continuas, a los datos calculados por el programa. La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min^{-1} . En los primeros dos gráficos se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2. En a) se utilizaron 2 nodos de colocación ortogonal, y en b) se utilizaron 3. En los últimos dos gráficos, el factor de tortuosidad tomó un valor de 4 y se utilizaron 2 (c) y 3 (d) nodos de colocación ortogonal.

Habiendo definido que el número de nodos de colocación ortogonal es igual a 3 y que el factor de tortuosidad para este sistema es igual a 2, se procedió a la determinar los parámetros cinéticos utilizando la función *fminsearch*, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Parámetros cinéticos de las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante, para la relación de elución exponencial, determinados utilizando *fminsearch* ($N_r=3$ y $\tau_{\text{tor}}=2$).

Proteína	Da^a	β'	α'	$Error_p^a$
IgG1	4.11	18.86	15.04	0.0022
IgG2a	21.21	28.35	3.03	0.0030
IgG2b	25.46	17.48	2.09	0.0020

^a Suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los datos calculados por el programa computacional, dividido por el número de datos que se compararon.

En este caso, la determinación de los parámetros llevó entre 12 minutos y 2.5 horas, sin considerar el tiempo que demoró el encontrar el punto de partida que necesita la función para encontrar el mínimo (que varió entre 6 y 34 horas). Estos resultados entregaron un menor $Error_p$ que el algoritmo genético por sí solo (que en promedio demora alrededor de 8 horas) y aunque esta diferencia fue pequeña (en promedio un 8.4%), no fue necesario volver a iterar una vez que se encontró el mínimo. Debido a que encontrar un valor final satisfactorio utilizando el algoritmo genético depende totalmente de la visión del investigador, llegando a tomar 20 horas si se desea ejecutar el algoritmo genético con 10 individuos y por 400 generaciones, se decidió utilizar la función *fminsearch* para encontrar los parámetros cinéticos del sistema de afinidad a *Cibacron blue* y para el estudio de la relación lineal entre la concentración de modulador y el logaritmo de la constante de equilibrio de adsorción de cada proteína, puesto que en promedio requiere de un menor tiempo de ejecución.

Cabe destacar que el conjunto de puntos estudiados para encontrar el punto de partida para *fminsearch* consideró sólo algunas combinaciones entre 1 y 50 para cada parámetro (equiespaciadas en 4 o en 5), debido a que tomar cada una de las combinaciones posibles en este intervalo, equiespaciadas en 1, requería más de 30 días de trabajo continuo. En esta situación el algoritmo genético, que demora alrededor de 4 horas utilizando 5 individuos y un máximo de 100 generaciones, puede entregar un mejor punto de partida para la función *fminsearch* que el entregado por el *script* implementado en este trabajo (ver en el Anexo G el *script* encontrar.m). Sin embargo, la implementación del algoritmo genético requiere de un código extenso y su comprensión a cabalidad no es trivial, por lo que no se recomienda su utilización sólo como una herramienta para encontrar el punto de partida mencionado anteriormente. Si ya se cuenta con la implementación de dicho algoritmo, definitivamente es una muy buena alternativa de acuerdo a lo que se pudo observar en la realización de este trabajo, puesto que puede acortar el tiempo total requerido para encontrar los parámetros cinéticos deseados en un 33% en comparación con el empleado utilizando el *script* encontrar.m.

3.2.3.2 COMPARACIÓN ENTRE LAS RELACIONES DE ELUCIÓN LINEAL Y EXPONENCIAL

Para comparar las relaciones de elución, se ajustaron los parámetros cinéticos de las 5 proteínas en estudio, utilizando 3 relaciones distintas: la relación exponencial, la relación lineal y una modificación de esta última dada la dificultad de simular correctamente la curva para la Hemoglobina, puesto que ésta eluye al principio del gradiente. Para los ajustes se utilizaron 3 nodos de colocación ortogonal en el caso de la relación exponencial, y 2 en el caso de las relaciones lineales. Además, se probaron factores de tortuosidad de 2, 4 y 6 en el caso de las curvas eluidas con un gradiente de fuerza iónica, puesto que se observó en los ajustes realizados previamente, que un mayor factor de tortuosidad permitía predecir de mejor manera la cola de desorción.

Las curvas obtenidas para los mejores ajustes de las proteínas con afinidad por *Cibacron blue* se presentan en la Figura 3.5, en la que se observa que la relación exponencial sólo es capaz de entregar curvas más bien simétricas, haciendo imposible un buen ajuste para la Hb. La relación lineal, en cambio, permitió un muy buen ajuste para ambas proteínas.

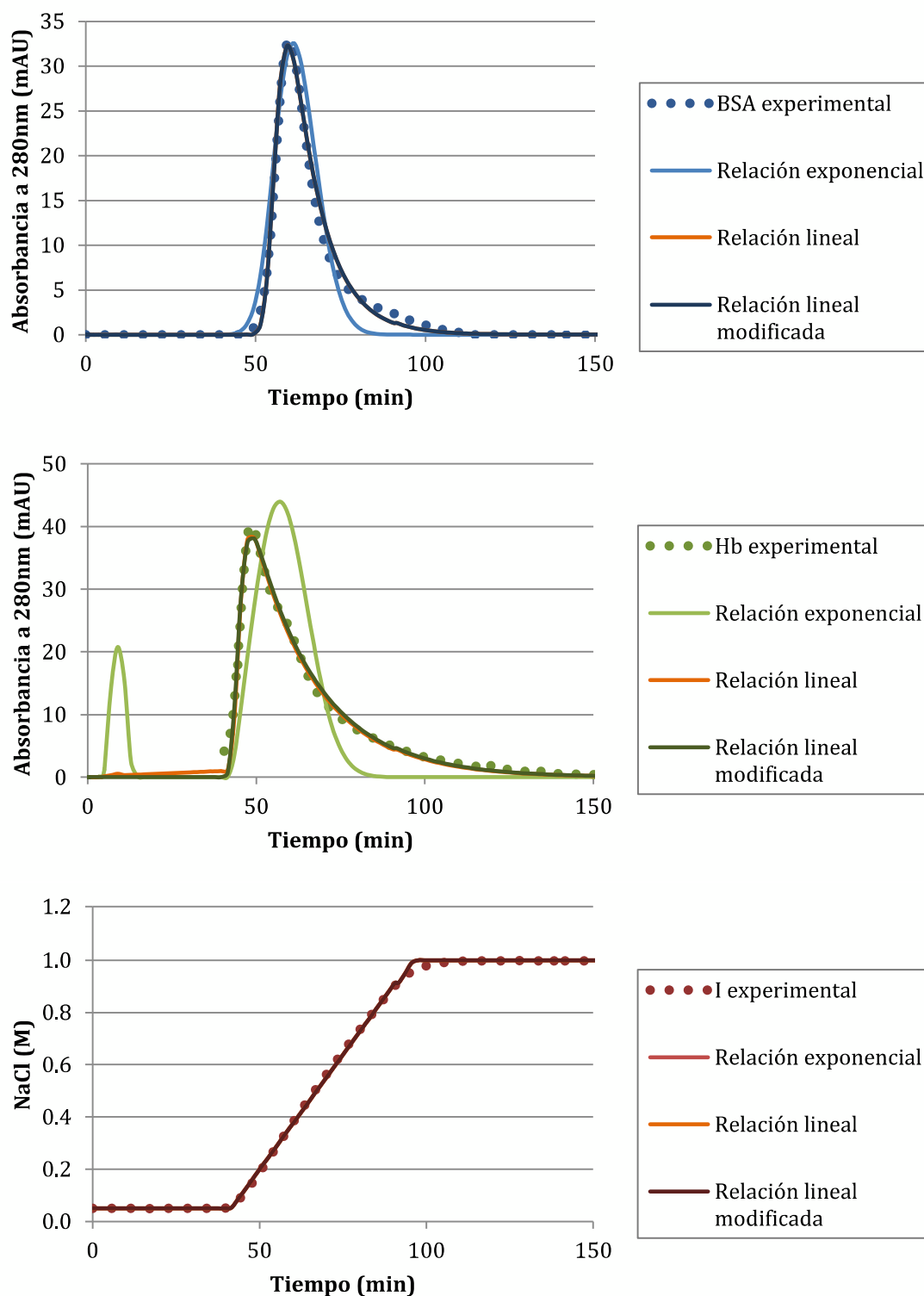


Figura 3.5 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de BSA y Hb utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.

La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=1$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y una pendiente de gradiente igual a 0.017 M/min. Para el cálculo de las curvas con la relación exponencial se utilizó un factor de tortuosidad igual a 4 y $N_r=3$ y para las relaciones lineales se utilizó un factor de tortuosidad igual a 6 y $N_r=2$.

En este caso, al igual que en el trabajo realizado por Orellana (2009) en el que se estudiaron curvas asimétricas de elución de proteínas, se ajustó el valor del Damköhler de desorción para poder simular correctamente la cola de desorción. El valor de α permitió ajustar el tiempo de retención de la proteína y el γ , el ancho y el alto del *peak*. Los valores cinéticos determinados para las distintas relaciones, y su respectivo $Error_p$, se presentan en el Anexo D.

Pese a que se logró un buen ajuste general de las curvas de elución de ambas proteínas (BSA y Hb) utilizando la relación lineal, los valores de los parámetros cinéticos determinados para la Hb producen un pequeño *peak* de elución de la proteína (ancho y bajo en su forma) antes del inicio del gradiente que parte en el minuto 45 aproximadamente. Para evitar esto, se fijó el valor del Da^a , en el rango anterior del gradiente, igual a 1000, dando origen a la relación lineal modificada. Esto permitió un alto valor de la constante b_i que relaciona la constante cinética de adsorción con la de desorción. Un alto valor de ella indica que la tasa de adsorción es mayor a la de desorción, impidiendo que la proteína eluya antes del gradiente. De esta forma, se logró un muy buen ajuste para ambas proteínas, presentándose gráficamente la principal diferencia con el método lineal antes del inicio del gradiente y sólo para el caso de la Hb. En el caso de la BSA, el ajuste logrado por las dos relaciones lineales entrega virtualmente la misma curva, tal y como ocurre para la fuerza iónica, que presenta además la misma curva en la relación exponencial.

En el caso de las inmunoglobulinas todas se ajustan de manera similar, obteniéndose para la IgG2a el mismo pequeño *peak* antes del gradiente presentado por la IgG1 de la Figura 3.6 para la relación lineal modificada (las curvas obtenidas para la IgG2a y la IgG2b se presentan en el Anexo D).

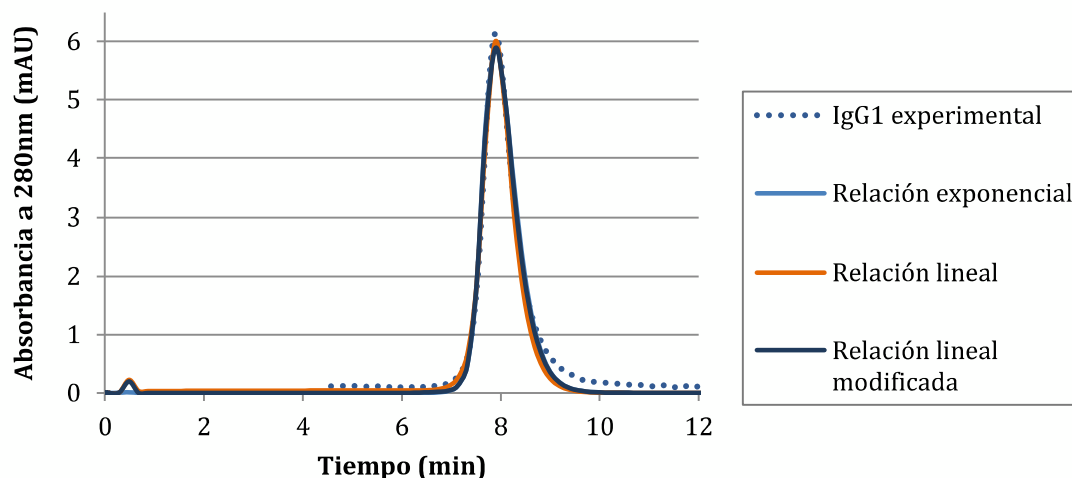


Figura 3.6 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de los parámetros cinéticos de la IgG1 utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.

La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min⁻¹. Para el cálculo de las curvas con la relación exponencial se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2 y $N_r=3$ y para las relaciones lineales se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2 y $N_r=2$.

Pese a que con la relación lineal se obtuvo gráficamente un mejor ajuste, se optó por utilizar los parámetros obtenidos por la relación lineal modificada debido a que esta relación permitió ajustar de mejor manera las curvas de proteínas eluidas con el gradiente de sal. Al igual que en el caso

discutido en la sección 3.2.3.1, el pequeño *peak* observado en esta figura (antes del primer minuto del cromatograma) puede ser producto del método numérico o del factor de tortuosidad utilizado. Debido a que aumentar el número de nodos de colocación ortogonal afecta de manera directa el tiempo empleado en las simulaciones, y a que determinar nuevamente el conjunto de parámetros para cada una de las inmunoglobulinas -además de la BSA y la Hb- demanda una alta cantidad de tiempo (al menos 10 horas), se decidió utilizar estos parámetros puesto que con esta relación se obtuvieron los mejores ajustes para las distintas proteínas estudiadas en este trabajo.

3.2.3.3 PARÁMETROS CINÉTICOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

Los parámetros cinéticos que se utilizaron en las simulaciones de las curvas de elución de mezclas de proteínas bajo condiciones de operación distintas de las empleadas para su determinación se listan en la Tabla 3.5:

Tabla 3.5 Parámetros cinéticos utilizados en este trabajo.

Estos parámetros corresponden a los involucrados en una relación de elución lineal entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando y fueron determinados utilizando la función *fminsearch* de Matlab®.

Proteína	C_0 (mg/mL)	Tipo de elución	τ_{tor}	N_r	$D\alpha^d$	γ	α	$Error_p^a$	R^2^b
IgG1	0.15	pH	2	2	2.375	2.146	-8.67	0.002	0.996
IgG2a	0.15				10.067	2.282	-8.40	0.003	0.995
IgG2b	0.15				0.750	3.848	-13.17	0.001	0.997
BSA	1	Fuerza iónica	6	2	0.437	-13.77	8.20	0.11	0.993
Hb	1				0.205	-20.01	5.98	0.64	0.989

^a Suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los datos calculados por el programa computacional, dividido por el número de datos que se compararon.

^b Coeficiente de correlación para una relación lineal entre los datos de absorbancia calculada y experimental.

Como se observa en esta tabla, el $Error_p$ asociado a las proteínas eluidas con un gradiente de fuerza iónica, es menor al presentado por las proteínas eluidas con un gradiente de pH. Esto se debe principalmente a que la cantidad de proteína utilizada para el segundo caso, es unas 4 veces menor a la utilizada en el primero. Otro punto que no debe llamar la atención, es el hecho de tener valores de α y γ de distinto signo en ambos sistemas, debido a que en un sistema el gradiente es positivo (fuerza iónica) y en el otro, negativo (pH).

Con respecto a los valores obtenidos de los parámetros cinéticos, se observa que para aquellas proteínas que eluyen presentando un *peak* más asimétrico, el valor del Damköhler de desorción es comparativamente más pequeño, es decir, la presencia de una cola más alargada respondería a una menor tasa de desorción la cual se encuentra en el orden de 10^{-1} y 10 de acuerdo a lo observado en este trabajo y a lo reportado por Orellana (2009). Con respecto a los valores de α y γ , sólo se cumple lo esperado para las proteínas BSA y Hb, no encontrándose el mismo comportamiento para las inmunoglobulinas, probablemente debido a la forma no lineal del gradiente de elución. Pese a esto último, como se observa numéricamente en la Tabla 3.5, la relación entre los datos calculados y los experimentales es altamente lineal (los coeficientes de correlación son superiores a 0.989), permitiendo predecir muy bien los datos experimentales para las condiciones de operación

utilizadas para el ajuste de los parámetros cinéticos. De esta forma, tal y como se observa en la Tabla 3.6, el modelo es capaz de determinar exitosamente el tiempo de retención de las proteínas presentando error relativo menor al 3% y el máximo de absorbancia, con un error relativo inferior al 6%.

Tabla 3.6 Comparación entre la absorbancia máxima y el tiempo de retención de las curvas de elución de proteínas experimentales y calculadas estudiadas en este trabajo, utilizadas para el ajuste de los parámetros cinéticos de una relación de elución lineal.

Experimento	Absorbancia Máxima (mAU)			Tiempo de retención (min)		
	Experimental	Calculada	ER (%)	Experimental	Calculada	ER (%)
CB1 (BSA)	32.89	32.22	2.0	59.90	59.22	1.1
CB2 (Hb)	40.21	38.10	5.2	48.38	49.40	-2.1
PA1 (IgG1)	6.14	5.88	4.1	7.91	7.91	0.0
PA2 (IgG2a)	7.87	7.70	2.1	8.09	8.09	0.0
PA3 (IgG2b)	4.28	4.25	0.7	8.84	8.84	0.0

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental} - \text{dato calculado}}{\text{dato experimental}} \right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

3.3 SIMULACIONES

Una vez determinados los valores de los parámetros cinéticos fue necesario verificar si el modelo predice correctamente el comportamiento de las proteínas bajo condiciones distintas a las utilizadas en su determinación. Estas situaciones se revisan a continuación, considerando primero los resultados para la afinidad por la proteína A recombinante, y luego, para la técnica *dye-ligand*.

3.3.1 AFINIDAD POR PROTEÍNA A RECOMBINANTE

Los números adimensionales Pe_{Li} , Bi y η , determinados según las correlaciones indicadas en la sección 2.3.2, para las distintas condiciones de operación estudiadas, se listan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Números adimensionales relacionados con la transferencia de masa al interior de la columna, determinados para las cromatografías llevadas a cabo en la columna HiTrap rProtein A FF.

Proteína	Flujo	Re	Pe_{Li}	D_p (cm^2/s)	Bi	η
IgG1	0.7	0.068	141.0	$1.99 \cdot 10^{-7}$	51.9	0.179
IgG2a						
IgG2b						
IgG1	1	0.097	141.4	$1.99 \cdot 10^{-7}$	58.4	0.125
IgG2a						
IgG2b						
IgG1	1.3	0.126	141.7	$1.99 \cdot 10^{-7}$	63.8	0.096
IgG2a						
IgG2b						

Aquí se ha incluido el valor del coeficiente de difusión intrapartícula (D_p), utilizado para la determinación de Bi y η , para mostrar que su valor se encuentra dentro del rango de magnitud reportado en la literatura para las proteínas, de 10^{-7} cm²/s (Geankoplis, 1998). Su valor es independiente de la velocidad intersticial de la fase móvil.

En Tabla 3.7 no debe llamar la atención el hecho de que tanto la difusividad intrapartícula, como el Bi y el η sean iguales para las tres proteínas estudiadas, esto pues las correlaciones y definiciones utilizadas para su determinación dependen principalmente del peso molecular de los componentes. Dado que las tres proteínas poseen el mismo tamaño, evidentemente dichos parámetros deben ser iguales para las tres.

En las cromatografías realizadas para el estudio de esta técnica, el número de Reynolds fue muy pequeño (menor a 0.13), condición bajo la cual el número de Peclet es básicamente independiente del flujo, como se observa en la Tabla 3.7. Asimismo, su alto valor indica que la dispersión axial a lo largo de la columna es despreciable. Por su parte, el número de Biot presenta valores muchísimo más grandes que uno (50 veces), lo cual indica que el proceso de adsorción está gobernado por la difusión al interior de la partícula. En esta tabla se puede observar, además, que al disminuir el flujo en un 30% (considerando que en el caso base el flujo es igual a 1 mL/min), el Bi disminuye en un 11%, mientras que el η aumenta en un 43% y que al aumentar el flujo en un 30%, el Bi aumenta en un 9%, mientras que el η disminuye en un 23%. En ambos casos, ya sea al aumentar o disminuir el flujo de la fase móvil, el η se ve más afectado que el Bi , lo que se traduce en un perfil de concentración más achatado cuando su valor disminuye, tal y como ha sido discutido por Gu (1995).

A continuación se muestra el efecto que tuvo en las simulaciones la variación del flujo de la fase móvil, la longitud del gradiente utilizado, la concentración de las proteínas en la muestra y el volumen de la misma. Debido a la baja masa de proteína con que se contaba, no fue posible cambiar sólo una de las condiciones a la vez, cambiándose por los menos 2 en cada cromatografía.

3.3.1.1 EFECTO DEL CAMBIO DE FLUJO Y CONCENTRACIÓN EN LA SIMULACIÓN

Este efecto se estudió realizando cromatografías de distintas mezclas de proteínas con una concentración en la muestra de aproximadamente 0.1 mg/mL, bajo un flujo igual a 0.7 y 1.3, obteniéndose los gráficos de la Figura 3.7 y 3.8. A continuación, en la Tabla 3.8, se comparan los tiempos de retención y la absorbancia máxima, experimentales y calculadas, de los *peaks* de elución de cada una de las mezclas de proteínas.

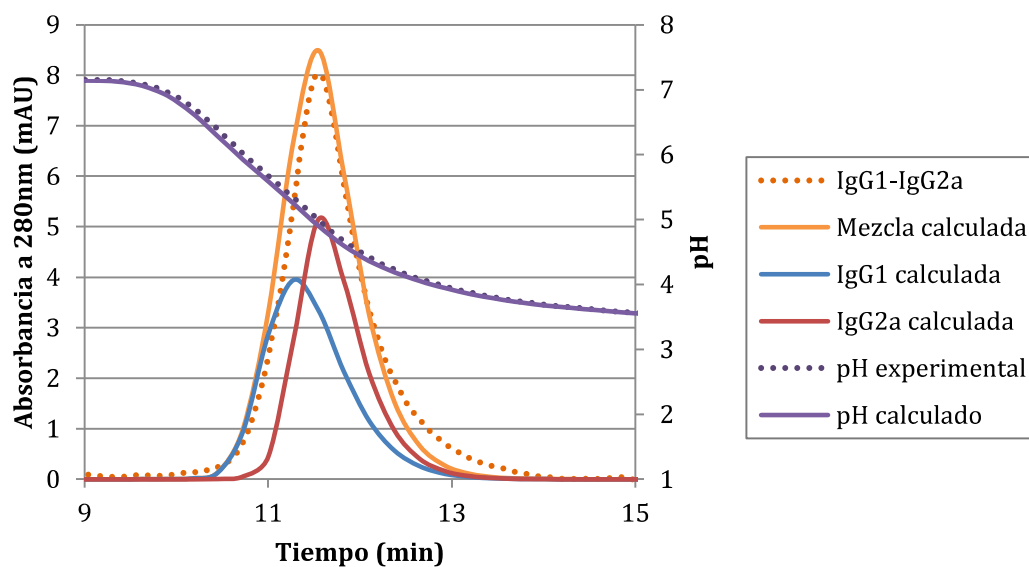


Figura 3.7 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2a con un flujo de 0.7 mL/min, $C_0=0.1$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.28 min $^{-1}$ (Experimento PA7).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.985.

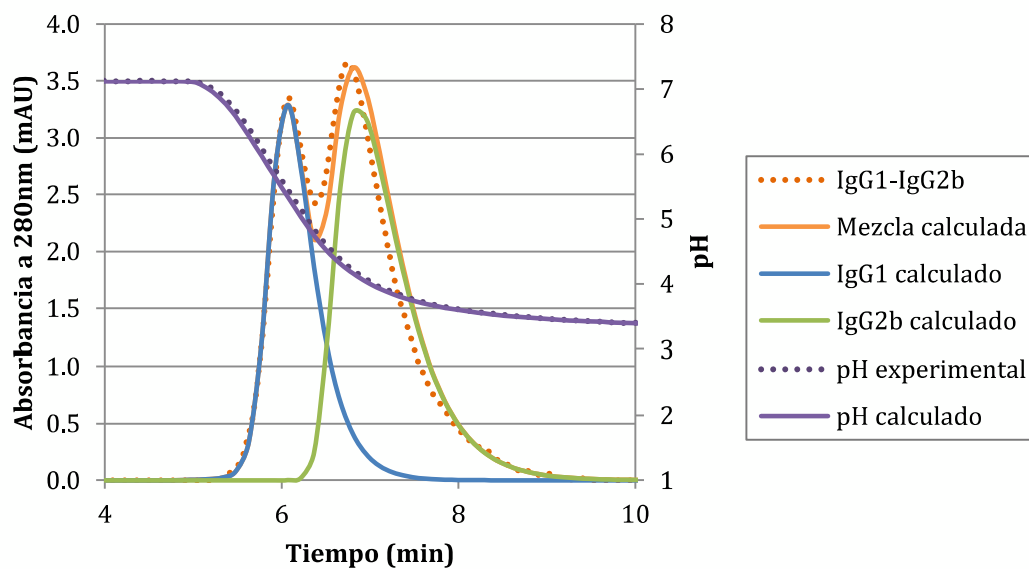


Figura 3.8 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2b con un flujo de 1.3 mL/min, $C_0=0.1$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.52 min $^{-1}$ (Experimento PA6).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.979.

Tabla 3.8 Comparación entre los *peaks* de elución experimentales y calculados para las mezclas PA7 y PA6.

Exp.	Absorbancia máxima (mAU)						Tiempo de retención (min)					
	abs_{e_1}	abs_{c_1}	ER (%)	abs_{e_2}	abs_{c_2}	ER (%)	t_{e_1}	t_{c_1}	ER (%)	t_{e_2}	t_{c_2}	ER (%)
PA7	8.03	8.49	-5.7				11.54	11.55	-0.1			
PA6	3.35	3.29	1.8	3.67	3.62	1.3	6.07	6.07	0.0	6.74	6.81	-1.0

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental}-\text{dato calculado}}{\text{dato experimental}}\right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

En los gráficos de las figuras 3.7 y 3.8, así como en las siguientes comparaciones entre los datos experimentales y los simulados, la curva de la “Mezcla calculada” se determinó sumando las absorbancias de cada una de las proteínas individuales presentes en la mezcla estudiada. En ambos gráficos se observa una buena estimación, tanto de los tiempos de retención (con errores relativos entre 0 y 1% en módulo), como de las absorbancias máximas de la mezcla de proteínas (con errores relativos entre 1.3 y 5.7% en módulo), los que no necesariamente coinciden con los tiempos de retención o absorbancias máximas de las proteínas individuales debido a una superposición de las curvas. Esto se observa claramente en el gráfico de la Figura 3.7 y en la Tabla 3.8. Además, los perfiles de elución presentados en ambos cromatogramas resultan ser predichos de muy buena manera, existiendo en ambos casos un alto coeficiente de correlación entre los datos calculados y experimentales ($R^2=0.985$ para el caso de la curva de PA7 y $R^2=0.979$ para PA6). De esta forma, el modelo es capaz de predecir correctamente curvas con variaciones de un 30% en el flujo de la fase móvil y para concentraciones de proteína entre un 13 y un 40% menores al caso base.

3.3.1.2 EFECTO DEL CAMBIO DE VOLUMEN Y CONCENTRACIÓN EN LA SIMULACIÓN

Este efecto se estudió alimentando un volumen de 0.2 mL de mezclas de proteínas con una concentración de cada una de las proteínas de 0.065 mg/mL. Las curvas obtenidas se presentan a en las figuras 3.9 y 3.10. Una comparación entre los tiempos de retención y las absorbancias máximas se presenta en la Tabla 3.9.

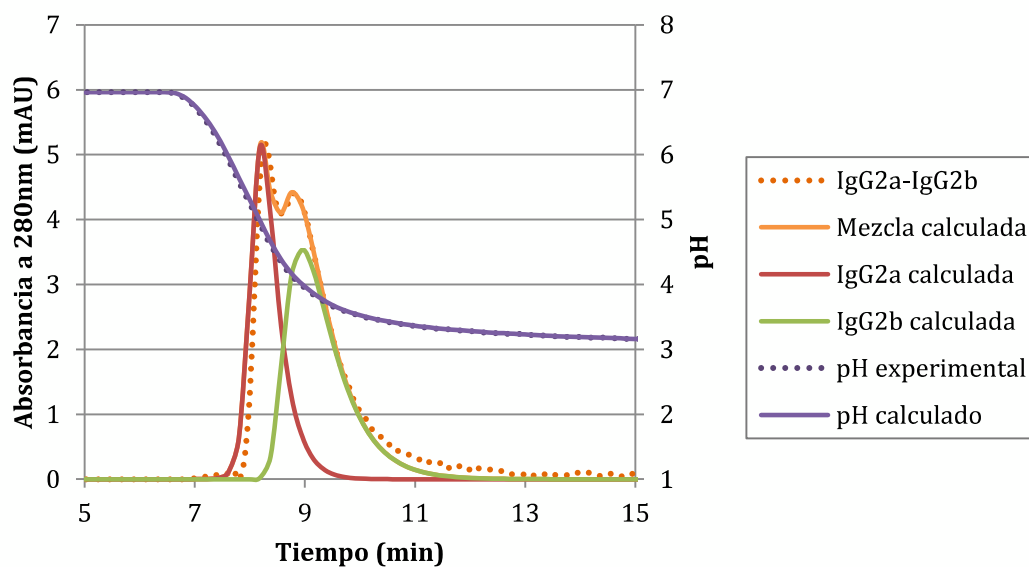


Figura 3.9 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG2a e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $C_0=0.065$ mg/mL, $v_m=0.2$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min $^{-1}$ (Experimento PA8). El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.968.

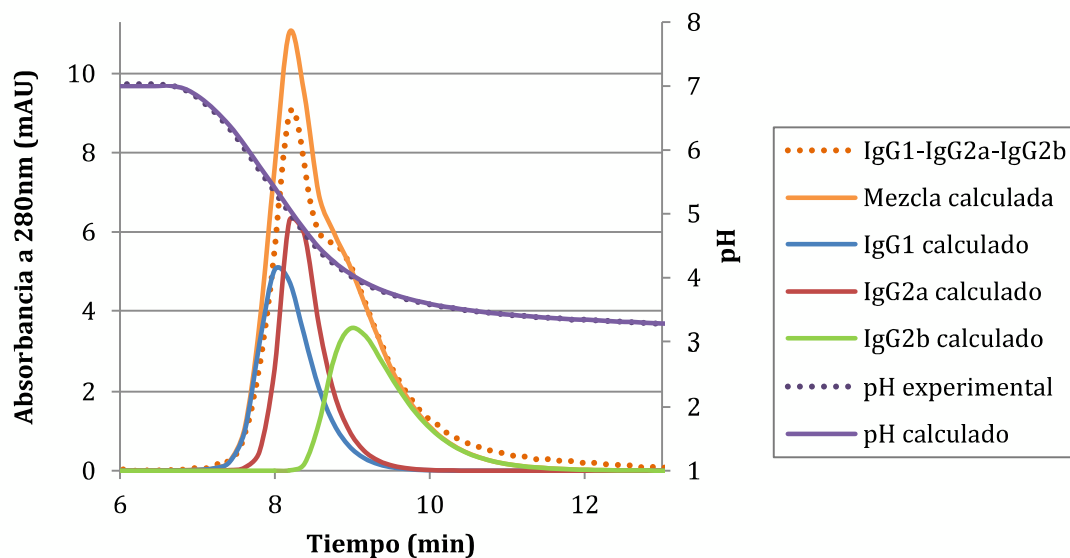


Figura 3.10 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de las tres proteínas, con un flujo de 1 mL/min, $C_0=0.065$ mg/mL, $v_m=0.2$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min $^{-1}$ (Experimento PA9). El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.984.

Tabla 3.9 Comparación entre los *peaks* de elución experimentales y calculados para las mezclas PA8 y PA9.

Exp.	Absorbancia máxima (mAU)						Tiempo de retención (min)					
	abs_{e1}	abs_{c1}	ER (%)	abs_{e2}	abs_{c2}	ER (%)	t_{e1}	t_{c1}	ER (%)	t_{e2}	t_{c2}	ER (%)
PA8	5.18	5.14	0.8	4.40	4.42	-0.4	8.26	8.19	0.9	8.79	8.76	0.4
PA9	9.09	11.03	-21.3	5.73	6.92	-20.8	8.24	8.19	0.6	8.74	8.57	1.9

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental} - \text{dato calculado}}{\text{dato experimental}} \right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

En la Figura 3.9 se observa un buen ajuste entre los datos experimentales y calculados, puesto que se predicen muy bien tanto los tiempos de retención (con errores relativos de 0.9 y 0.4%), como las máximas absorbancias de los *peaks*. (con errores relativos de 0.8 y -0.4%) El resultado no es tan bueno en el caso de la mezcla de los 3 IgG's (Figura 3.10), en la cual las proteínas eluyeron bajo las mismas condiciones de flujo y pendiente de gradiente que en el caso base (en el que se tenía una concentración un 130% mayor a la de este caso). En estas condiciones el modelo es capaz de predecir correctamente el tiempo de retención de ambos *peaks* (con errores relativos de 0.6 y 1.9%), pero no lo logra con las absorbancias (entregando errores relativos superiores a un 20% en módulo). Esta diferencia puede deberse a que la concentración de alguna de las proteínas de la mezcla era en realidad menor, puesto que el programa es capaz de simular exitosamente la mezcla de las tres proteínas como se muestra en el gráfico de la Figura 3.11 y, además, puede simular de buena manera el comportamiento de las proteínas aun disminuyendo su concentración a la mitad con respecto al caso base, como se observa en el gráfico de la Figura 3.9.

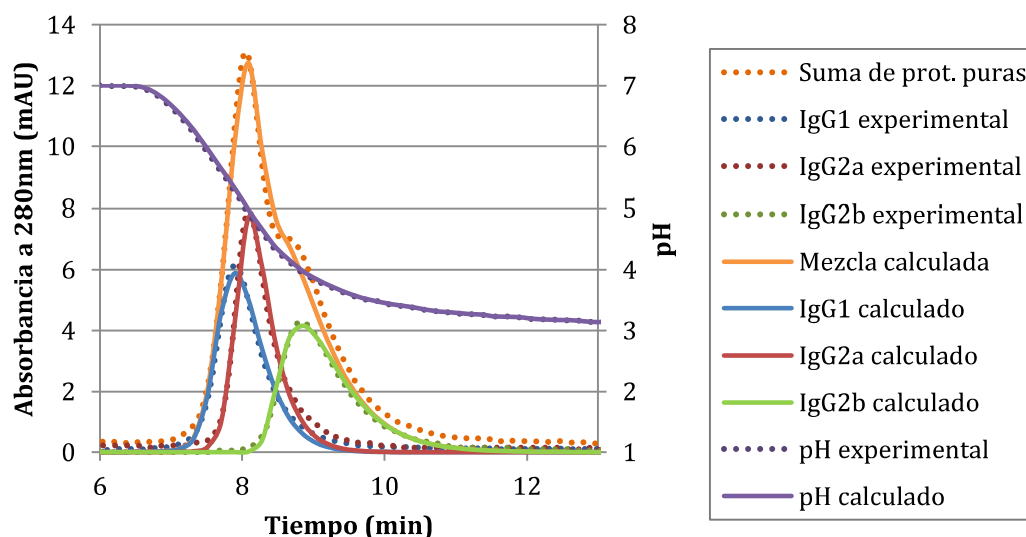


Figura 3.11 Comparación entre la mezcla teórica de las 3 proteínas puras y la curva calculada con el modelo utilizando las siguientes condiciones de operación: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.4 min $^{-1}$.

Si la concentración de alguna de las proteínas fuera menor se esperaría observar una diferencia en las áreas bajo los *peaks* de absorbancia calculado y experimental. Debido a que se observó que dichas áreas son muy similares en este caso (con un error relativo inferior al 1% según se puede ver

en la Tabla 6.8) podrían existir dos alternativas: una es que se hayan cometido errores en el ajuste de la curva experimental utilizando la línea base (situación que puede presentarse en cualquiera de las cromatografías realizadas durante este trabajo) y otra es que en estas condiciones no se logró simular adecuadamente la curva para la IgG2a que presenta un máximo de absorbancia menos agudo que en otras condiciones, necesitándose mejorar el método numérico utilizado por el programa computacional, aumentando por ejemplo el número de nodos de colocación ortogonal o mejorando la malla utilizada para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias. Estas soluciones pueden ser implementadas, pero es importante tener en cuenta que el tiempo requerido para obtener la curva aumentará. En el caso de este trabajo no es estrictamente necesario mejorar la calidad de los resultados obtenidos puesto que el modelo logra predecir bastante bien el comportamiento de las curvas, sin embargo, si se quisiera determinar parámetros importantes para el diseño de procesos de separación, como el rendimiento o la pureza de cada proteína lograda en cada condición de operación, sería recomendable hacerlo puesto que lo que demoraría el programa en realizar el cómputo sería aún mucho menor que el empleado experimentalmente, puesto que el programa demora alrededor de 70 segundos en calcular una curva mientras que su ejecución experimental demora al menos 30 minutos, sin incluir el tiempo de preparación del equipo y los *buffers* necesarios para llevar a cabo la separación (que va desde 1 a 2 horas).

Pese a la diferencia entre los máximos de absorbancia, para una variación entre un -57% (para PA8) y -67% (para PA9) de la concentración de muestra y una variación en el volumen de inyección de un 100%, el modelo es capaz de predecir muy bien la forma global de las curvas de elución entregando coeficientes de correlación iguales a 0.968 en el caso de PA8 y de 0.984 para PA9.

3.3.1.3 EFECTO DEL CAMBIO DE GRADIENTE Y CONCENTRACIÓN EN LA SIMULACIÓN

Este efecto se estudió realizando cromatografías con un largo de gradiente igual a 20 y 13 vc y distintas concentraciones de proteína en la muestra. El volumen de cada muestra y las concentraciones de las proteínas presentes se detallan en la Tabla 2.5.

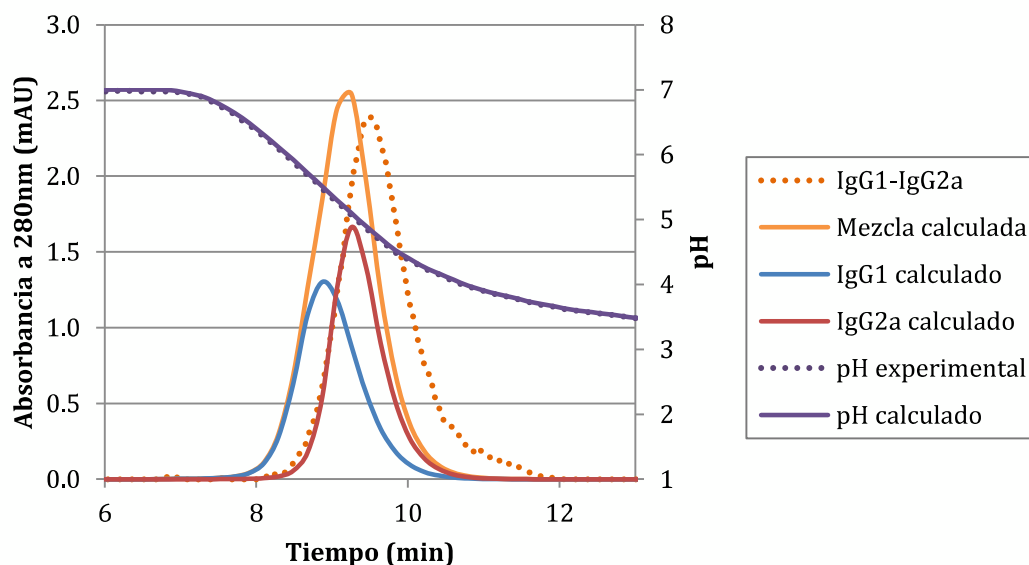


Figura 3.12 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2a con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual -0.2 min^{-1} (Experimento PA4).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.653.

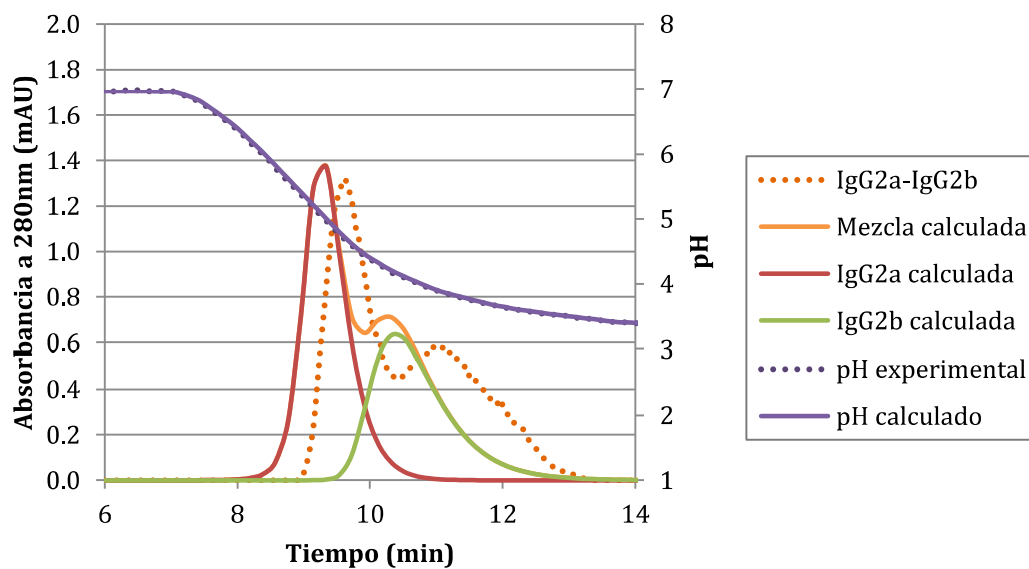


Figura 3.13 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG2a e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.2$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.2 min^{-1} (Experimento PA5).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.639.

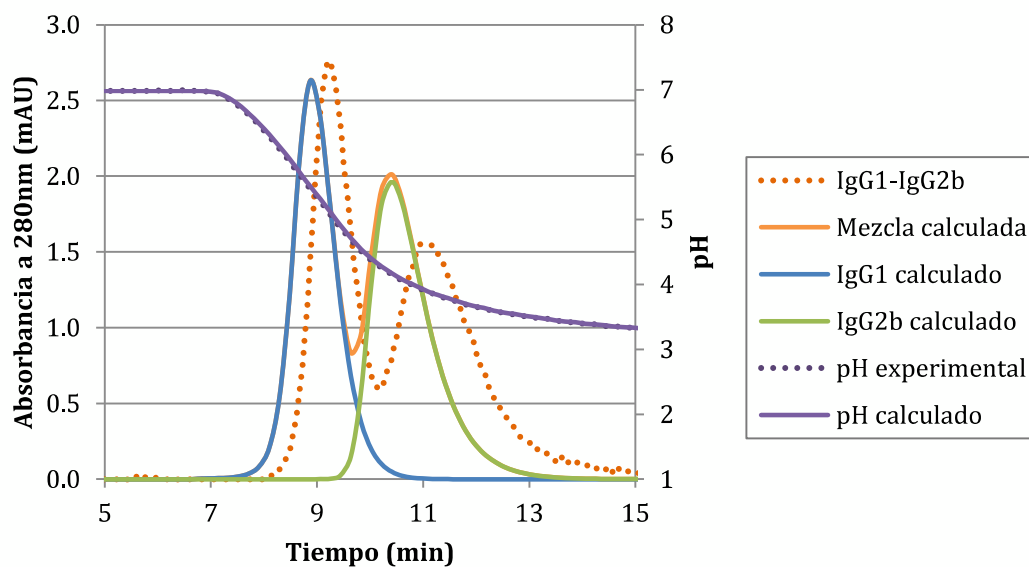


Figura 3.14 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.1$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.2 min^{-1} (Experimento PA10).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.630.

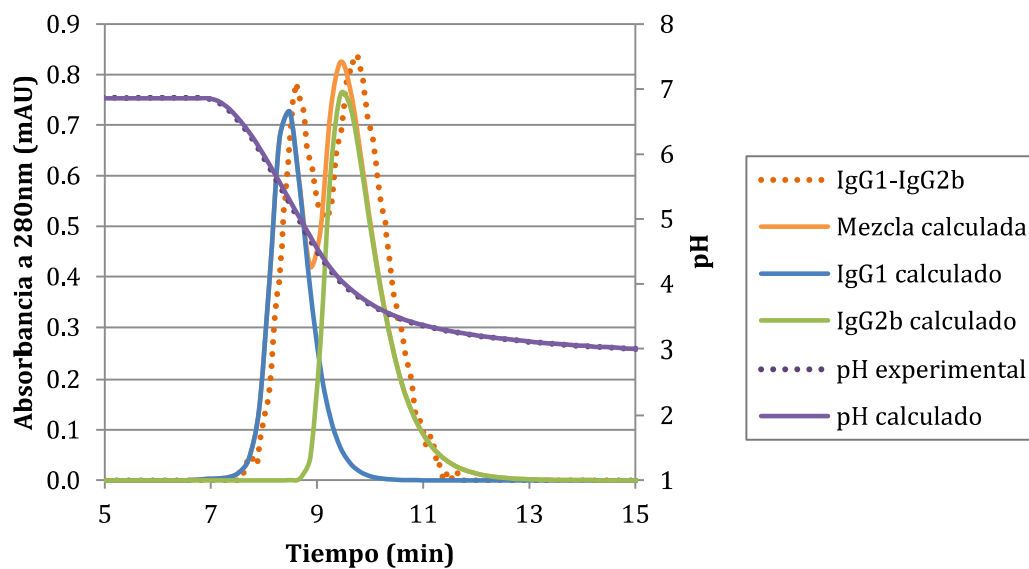


Figura 3.15 Comparación entre la curva de elución experimental y la calculada para una mezcla de IgG1 e IgG2b con un flujo de 1 mL/min, $v_m=0.1$ mL y pendiente de gradiente igual a -0.31 min^{-1} (Experimento PA11).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.916.

Tabla 3.10 Comparación entre los *peaks* de elución experimentales y calculados para las mezclas PA4, PA5, PA10 y PA11.

Exp.	Absorbancia máxima (mAU)						Tiempo de retención (min)					
	abs_{e1}	abs_{c1}	ER (%)	abs_{e2}	abs_{c2}	ER (%)	t_{e1}	t_{c1}	ER (%)	t_{e2}	t_{c2}	ER (%)
PA4	2.39	2.54	-6.4				9.47	9.26	2.3			
PA5	1.32	1.38	-4.1	0.58	0.71	-22.6	9.61	9.34	2.8	11.15	10.30	7.6
PA10	2.76	2.63	4.7	1.55	2.01	-29.8	9.21	8.87	3.7	10.93	10.41	4.8
PA11	0.78	0.73	7.3	0.84	0.83	1.6	8.61	8.49	1.4	9.75	9.45	3.1

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental} - \text{dato calculado}}{\text{dato experimental}} \right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

En las figuras 3.12, 3.13 y 3.14 se observa que el modelo no fue capaz de predecir el tiempo de retención de las proteínas frente a un cambio tan grande en el largo del gradiente, el que aumentó en un 100% (con una respectiva variación de un 50% en la pendiente del gradiente), en conjunto con una variación de alrededor de un -92% en la concentración de la muestra. Todas las curvas de elución de proteínas presentaron un desplazamiento hacia la izquierda con respecto a los datos experimentales, resultando en bajos coeficientes de correlación entre los datos calculados y experimentales (iguales a 0.653, 0.639 y 0.630 para PA4, PA5 y PA10, respectivamente). En la Figura 3.15 se logró un ajuste bastante mejor de los tiempos de retención (con un error relativo de un 1.4 y 3.1%). Aquí el largo del gradiente sólo aumentó en un 30% con respecto al caso base (que se traduce en una variación de la pendiente del gradiente en un 23%) y la variación en la concentración de la muestra fue muy similar a los casos recién mencionados (97% menor al caso base). En este caso el modelo es capaz de predecir de buena forma la curva global de elución de la mezcla de proteínas, entregando un coeficiente de correlación igual a 0.916, que aunque es mucho mejor que los obtenidos variando el gradiente en un 100% es inferior a los obtenidos con variaciones superiores a un 30% en la concentración, el flujo y el volumen de inyección. Debido a que en todos estos experimentos (PA4, PA5, PA10 y PA11) se presentaron grandes cambios tanto del gradiente como de la concentración de las proteínas inyectadas a la columna, no se puede atribuir la dificultad del ajuste a uno de los dos factores en particular. Sin embargo, comparando todas las curvas estudiadas para las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante, sí se puede ver claramente que el factor que más afecta el ajuste de las curvas es el cambio en el largo del gradiente, puesto que sí se logró ajustar bastante bien (con coeficientes de correlación superiores a 0.96) curvas con una variación en la concentración de hasta un 67% (como en PA8) y variaciones en el flujo y volumen de inyección de hasta un 30 (PA7 y PA6) y 100% (PA9 y PA8), respectivamente.

3.3.2 AFINIDAD EN *BLUE SEPHAROSE*

Los números adimensionales Pe_{Li} , Bi y η , determinados según las correlaciones indicadas en la sección 2.3.2, para las distintas condiciones de operación estudiadas, se listan en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11 Números adimensionales relacionados con la transferencia de masa al interior de la columna, determinados para las cromatografías llevadas a cabo en la columna *Blue Sepharose*.

Proteína	Flujo	Re	Pe_{Li}	D_p (cm^2/s)	Bi	η
BSA	0.10	0.019	280.1	6.86E+06	118.4	0.439
Hb				6.94E+06	111.4	0.469
BSA	0.13	0.025	280.4	6.86E+06	129.2	0.338
Hb				6.94E+06	121.6	0.360
BSA	0.50	0.095	282.7	6.86E+06	202.4	0.088
Hb				6.94E+06	190.6	0.094

Nuevamente, se ha incluido el valor del coeficiente de difusión intrapartícula, para mostrar que su valor se encuentra dentro del rango de magnitud encontrado en la literatura para las proteínas.

En esta tabla se muestra que la BSA, de mayor peso molecular, presenta menores valores tanto del coeficiente de difusión intrapartícula, como del η , debido justamente a su mayor tamaño. El número de Biot, en cambio, presenta mayores valores para esta proteína, indicando que la resistencia a la difusión intrapartícula, con respecto a la transferencia de masa en el film, es más significativa que para la Hb. Sin embargo, la diferencia no es tan importante en flujos como los estudiados en este sistema.

En las cromatografías realizadas para el estudio de esta técnica, el número de Reynolds es menor al presentado en las cromatografías de afinidad por proteína A recombinante, observándose también en este caso, que el número de Peclet es básicamente independiente del flujo, indicando su alto valor que la dispersión axial a lo largo de la columna es despreciable. El número de Biot nuevamente presenta valores muchísimo mayores que uno (y aproximadamente 2 veces mayores que los estudiados con la técnica anterior), lo que indica que en este caso la transferencia intrapartícula es aún más lenta, con respecto a la transferencia de masa en el film, que en el caso anterior.

Para este sistema se estudiaron flujos de 0.1 mL/min, uno un 30% mayor y uno 5 veces mayor. No se probó para flujos menores puesto que el tiempo de experimentación hubiese sido muy largo. Al igual que lo observado en la técnica de afinidad por proteína A recombinante, cuando el flujo aumenta en un 30% con respecto al caso base (0.1 mL/min) el Bi aumenta en un 9%, mientras que el η disminuye en un 23%. Cuando el flujo aumenta en un 400%, el Bi aumenta en un 71% y el η disminuye en un 80%. Nuevamente, el η se ve más afectado por la variación, lo que resulta en un *peak* más asimétrico mientras menor es su valor.

A continuación se verá el efecto que tiene en las simulaciones la variación del flujo de la fase móvil, el largo del gradiente utilizado y la concentración de las proteínas en la muestra inyectada a la columna.

3.3.2.1 EFECTO DEL CAMBIO DE FLUJO Y CONCENTRACIÓN EN LA SIMULACIÓN

Para estudiar este efecto se realizaron cromatografías con un flujo de 0.13 mL/min, con un largo de gradiente igual al caso base (5.5 vc) y distintas concentraciones de proteínas en la mezcla: 0.7, 1 y

1.3 mg/mL. Los resultados se comparan en las figuras 3.16-3.18, en las que se observa que se logra un buen ajuste para la mezcla de proteínas eluídas bajo un flujo un 30% mayor al utilizado en el caso base, con un coeficiente de correlación entre los datos de absorbancia calculados y experimentales entre 0.94 y 0.97. Debido a variaciones en las mediciones de la línea base, no fue posible ajustar correctamente las curvas de manera de observar absorbancias nulas en lugares donde no eluye la proteína de interés, pese a esto, fue posible determinar con muy poco error tanto los tiempos de retención de las proteínas (entre 0 y 5.9%), como las absorbancias máximas (inferiores al 10% salvo para la Hb en el experimento CB6). La diferencia en el máximo de absorbancia entregado por la Hb en el experimento CB6 puede deberse a un pequeño desplazamiento de la curva experimental producto del flujo empleado en la cromatografía (un 30% mayor al caso base), lo cual impide determinar adecuadamente el primer *peak* de dicha curva. Este problema afectó en menor medida al valor del tiempo de retención de este *peak*, debido a que en esa región la curva presenta una alta pendiente. Cabe destacar que los *peaks* observados en las curvas experimentales antes del gradiente de elución corresponden a impurezas presentes en las muestras, las que estaban presentes aun en las cromatografías para las proteínas puras, pero que fueron eliminadas para poder determinar correctamente los coeficientes *FC* que relacionan la absorbancia con la concentración de proteína a la salida de la columna.

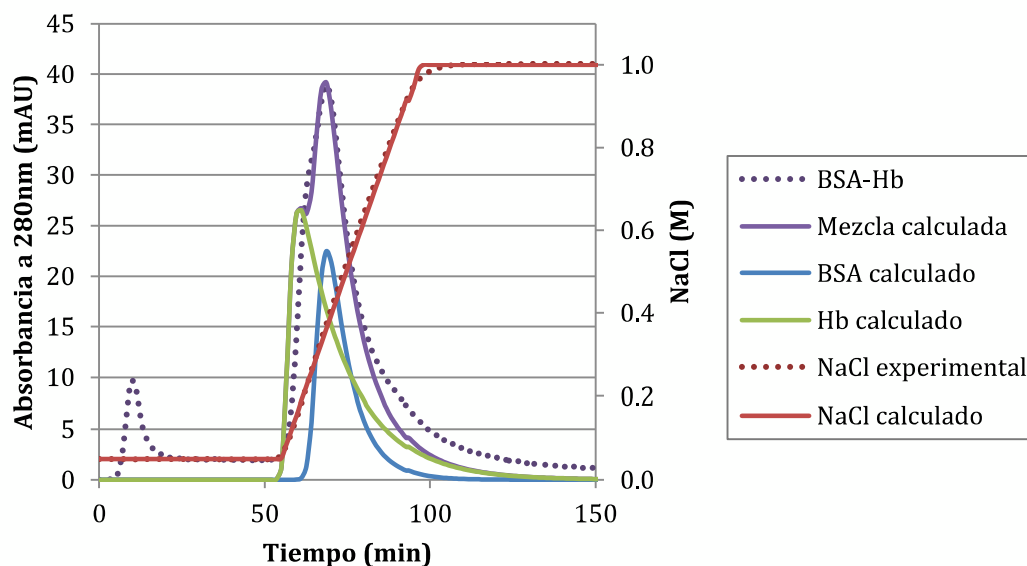


Figura 3.16 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a Cibacron blue con un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=0.7$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.022 M/min (Experimento CB6).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.940.

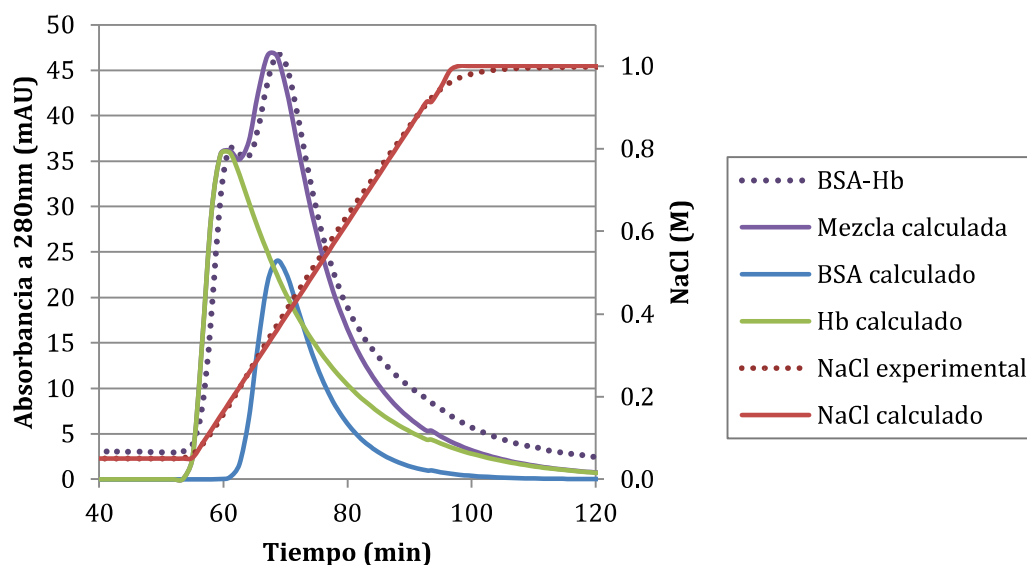


Figura 3.17 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* con un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=1$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.022 M/min (Experimento CB4).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.974.

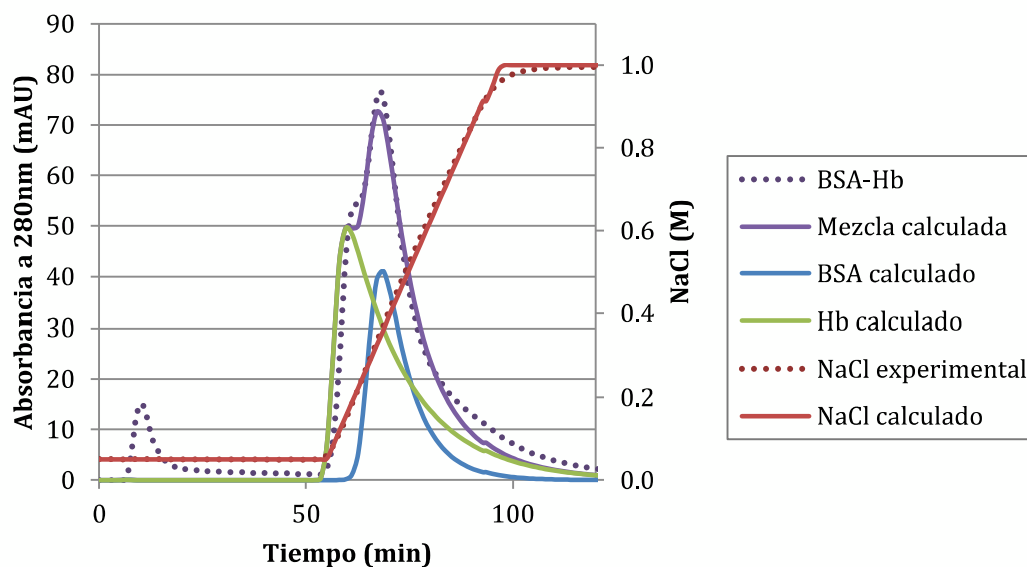


Figura 3.18 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* con un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=1.3$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.022 M/min (Experimento CB5).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.968.

Tabla 3.12 Comparación entre los *peaks* de elución experimentales y calculados para las mezclas CB6, CB4 y CB5.

Exp.	Absorbancia máxima (mAU)						Tiempo de retención (min)					
	abs_{e_1}	abs_{c_1}	ER (%)	abs_{e_2}	abs_{c_2}	ER (%)	t_{e_1}	t_{c_1}	ER (%)	t_{e_2}	t_{c_2}	ER (%)
CB6	32.62	26.72	18.1	38.92	39.18	-0.7	64.91	61.08	5.9	68.64	68.63	0.0
CB4	36.49	36.15	0.9	46.80	46.64	0.3	61.36	61.08	0.5	68.83	67.12	2.5
CB5	54.30	49.68	8.5	76.63	72.61	5.2	61.92	59.57	3.8	67.89	67.12	1.1

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental} - \text{dato calculado}}{\text{dato experimental}} \right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

Al igual que en lo observado para las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante, los tiempos de retención de los *peaks* de las mezclas de proteínas no necesariamente se corresponden con los tiempos de retención de proteínas puras. En este caso, además, la absorbancia máxima del segundo *peak* es muy distinta de la absorbancia máxima de la BSA, debido a la cola de desorción que presenta la Hb (los datos de los tiempos de retención y absorbancias máximas de los cromatogramas simulados para las proteínas individuales presentes en las distintas mezclas se muestran en el Anexo D).

Como en el sistema anterior, para variaciones en la concentración de la muestra inyectada de alrededor de un 30% y variaciones en el flujo de un 30% con respecto al caso base, el modelo es capaz de predecir correctamente el perfil de elución de la mezcla de proteínas. Si bien se esperaría que el modelo fuera capaz de predecir de igual forma concentraciones de proteína un 100% menores (como ocurrió para las inmunoglobulinas), no se espera lo mismo para concentraciones un 100% mayores debido a la gran asimetría que presentan los *peaks* en este sistema. Además, en dicha situación se ocuparía aproximadamente el 20% de la capacidad de adsorción de la resina (el doble de la ocupada por estas mezclas), pudiendo hacerse más importantes los efectos de interacción entre proteínas, como ocurrió en los casos estudiados por Orellana (2009) donde las mezclas de proteína ocuparon aproximadamente el 20-30% de la capacidad máxima de la columna

3.3.2.2 EFECTO DEL CAMBIO DE GRADIENTE Y CONCENTRACIÓN EN LA SIMULACIÓN

En este caso se estudiaron largos de gradiente iguales a 5.5, 7, 10 y 20 para un flujo igual a 0.1 mL/min y un volumen de muestra igual a 0.5 mL. Los resultados se presentan en las figuras 3.19-3.22. Además, los errores relativos en los tiempos de retención y absorbancia máxima de los *peaks* calculados y experimentales se presentan en la Tabla 3.13.

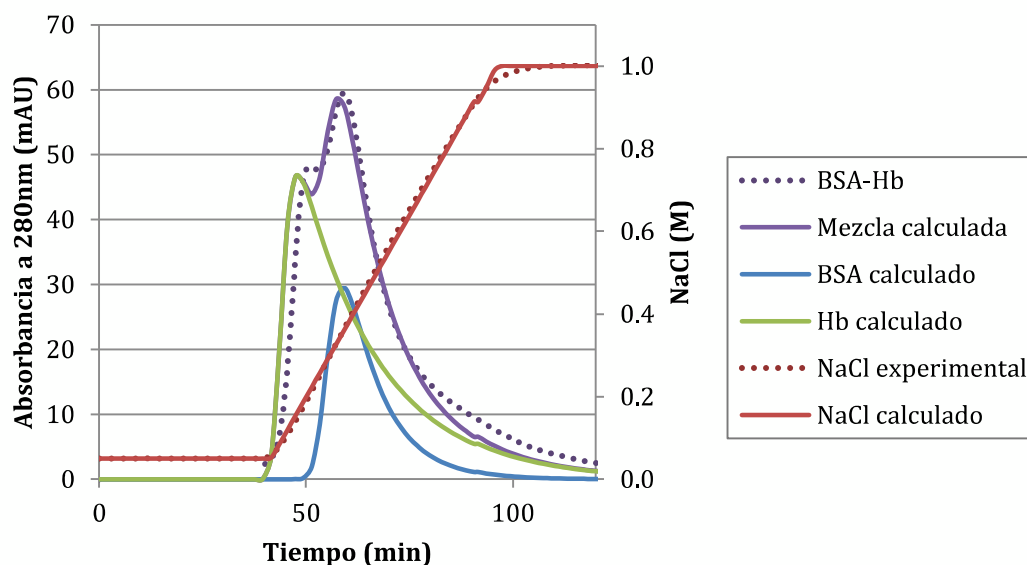


Figura 3.19 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=1$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.017 M/min (Experimento CB7).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.954.

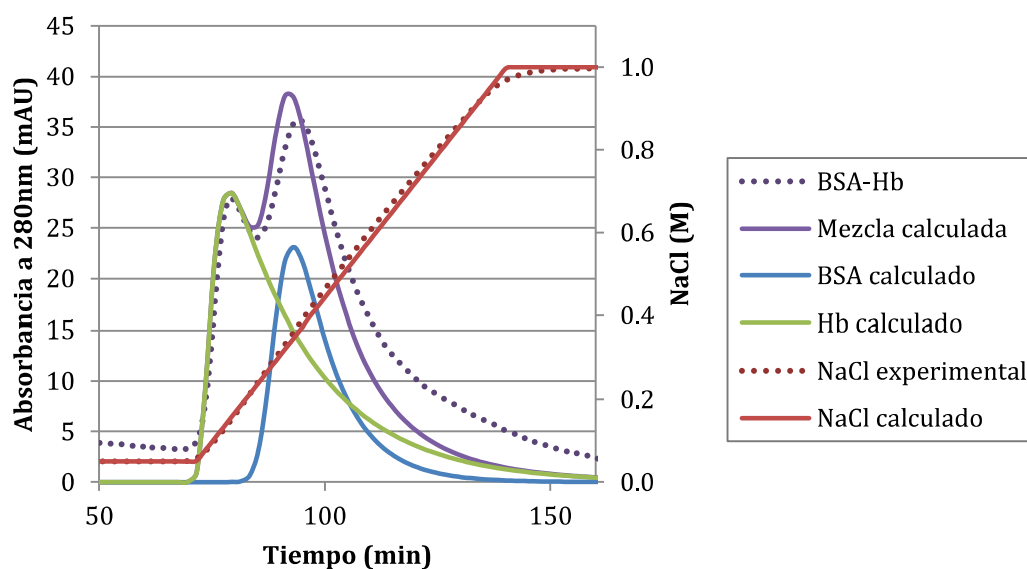


Figura 3.20 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=0.75$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.014 M/min (Experimento CB3).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.952.

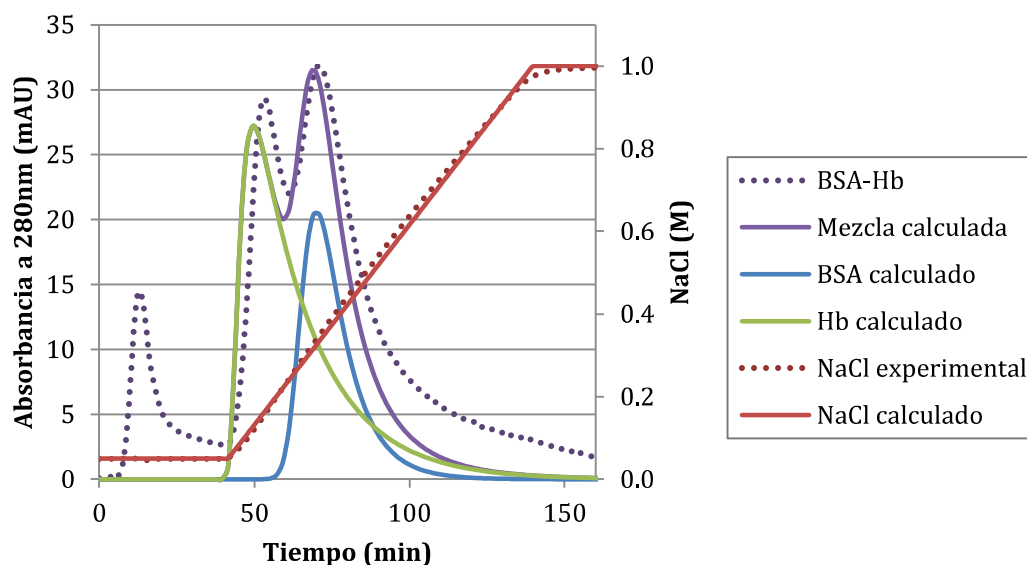


Figura 3.21 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=0.75$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.01 M/min (Experimento CB8).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.913.

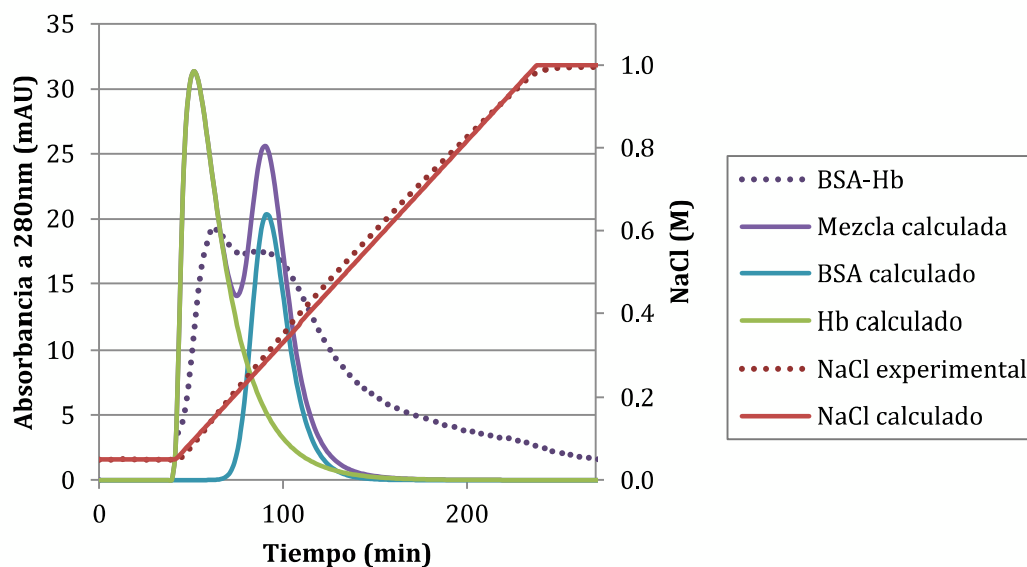


Figura 3.22 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* con un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=1$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.005 M/min (Experimento CB10).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.638.

Tabla 3.13 Comparación entre los *peaks* de elución experimentales y calculados para las mezclas CB7, CB3, CB8 y CB10.

Exp.	Absorbancia máxima (mAU)						Tiempo de retención (min)					
	abs_{e1}	abs_{c1}	ER (%)	abs_{e2}	abs_{c2}	ER (%)	t_{e1}	t_{c1}	ER (%)	t_{e2}	t_{c2}	ER (%)
CB7	48.09	46.61	3.1	59.43	58.50	1.6	50.73	47.43	6.5	59.05	57.25	3.0
CB3	27.96	28.46	-1.8	35.76	38.07	-6.5	79.05	79.40	-0.4	93.84	91.18	2.8
CB8	23.94	27.17	-13.5	31.85	31.57	0.9	58.20	49.40	15.1	71.02	69.03	2.8
CB10	19.40	31.36	-61.7	17.53	25.59	-46.0	62.20	51.36	17.4	83.79	90.63	-8.2

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental} - \text{dato calculado}}{\text{dato experimental}} \right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

En las figuras 3.19-3.22 se observa un buen ajuste para el mismo largo de gradiente utilizado para la determinación de los parámetros cinéticos (con un alto coeficiente de correlación entre los datos de absorbancia calculados y experimentales, 0.954), el que va empeorando conforme aumenta el largo del gradiente utilizado (con coeficientes de correlación de 0.952, 0.913 y 0.638 para un largo de gradiente un 27, 82 y 265% mayor al caso base, respectivamente), especialmente debido a que la cola de desorción se hace cada vez más pronunciada. Sin embargo, hasta un largo de gradiente igual a 10 (que equivale a una pendiente de gradiente un 41% menor al caso base), los tiempos de retención y las absorbancias máximas son predichas con un error relativo bastante bajo (inferiores a un 7% para ambos casos), salvo para el máximo de absorbancia entregado por la Hb en el experimento CB8 lo cual puede estar explicado principalmente por una mayor inyección real de proteína a la columna, puesto que un desplazamiento de la curva hacia la derecha (en la sección del gradiente) se debiera traducir en un *peak* más bajo y ancho, al contrario de lo observado en la Figura 3.21. Sólo en el caso del largo de gradiente igual a 20 vc, los resultados entregados por el modelo se encuentran muy lejanos de los resultados experimentales.

Cabe destacar que los errores en los tiempos de retención y las absorbancias máximas determinadas por el modelo son variables, siendo atribuidos principalmente a errores experimentales en las preparaciones de las mezclas de proteínas, los que llegaron incluso a un 25%.

3.3.2.3 EFECTO DEL CAMBIO DE FLUJO Y LARGO DE GRADIENTE EN LA SIMULACIÓN

Para estudiar este efecto se realizó una cromatografía con una concentración de 0.9 mg/mL de cada proteína, un flujo de 0.5 mL/min y un largo de gradiente de 10 vc. Los cromatogramas experimentales y calculados se presentan en la Figura 3.23 y una comparación entre los tiempos de retención y absorbancias máximas se presenta en la Tabla 3.14.

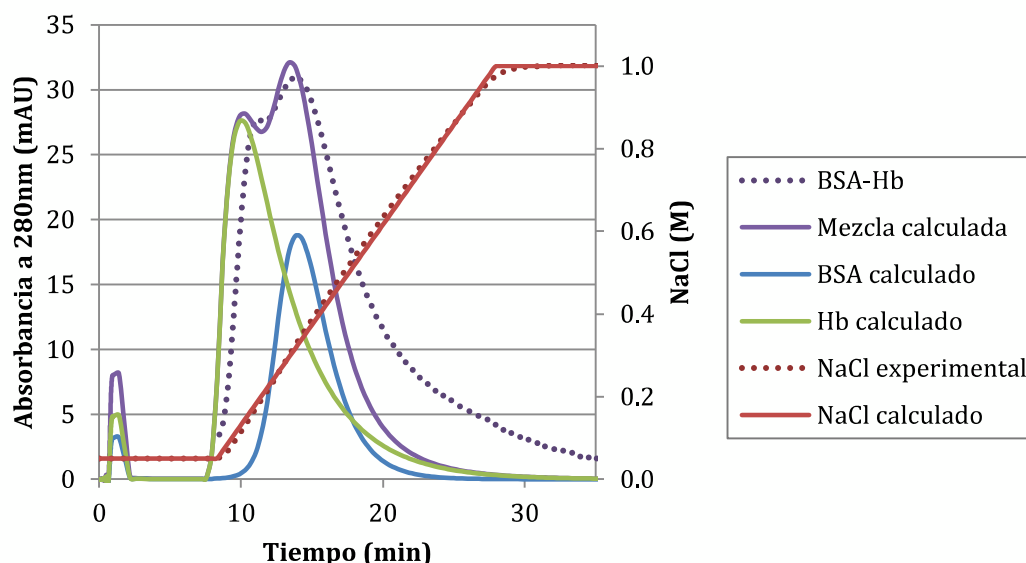


Figura 3.23 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a Cibacron blue con un flujo igual a 0.5 mL/min, $C_0=0.9$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.048 M/min (Experimento CB9).

El coeficiente de correlación entre los datos de la curva de la mezcla calculada y la experimental es 0.833.

Tabla 3.14 Comparación entre los *peaks* de elución experimentales y calculados para la mezcla CB9.

Exp.	Absorbancia máxima (mAU)						Tiempo de retención (min)					
	abs_{e1}	abs_{c1}	ER (%)	abs_{e2}	abs_{c2}	ER (%)	t_{e1}	t_{c1}	ER (%)	t_{e2}	t_{c2}	ER (%)
CB9	27.66	28.16	-1.8	30.96	32.10	-3.7	11.25	10.27	8.7	13.76	13.41	2.5

El error relativo (ER) se define como: $\left(\frac{\text{dato experimental} - \text{dato calculado}}{\text{dato experimental}} \right) \cdot 100$. De aquí se desprende que un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado

En este caso, debido al gran aumento en el flujo (400%), las curvas calculadas muestran que el modelo predice una pequeña elución de ambas proteínas antes del inicio del gradiente, indicando que dichas proteínas no lograron unirse a la matriz. Además, en este caso la curva experimental se desplaza levemente hacia la derecha, situación que el modelo no es capaz de predecir correctamente, pudiendo determinar adecuadamente sólo el tiempo de retención del segundo *peak* (con un error relativo del 2.5%), aunque el error asociado al primer tiempo de retención tampoco es tan grande (8.7%). Con respecto a las absorbancias máximas, el error, al menos gráficamente, parece ser muy bajo. Observando la totalidad del perfil de elución, el modelo no es capaz de predecirlo de muy buena forma entregando un coeficiente de correlación de 0.833. De aquí se desprende que para fuertes variaciones en el flujo de la fase móvil (400% en este caso), en conjunto con variaciones en la pendiente del gradiente (41% bajo el caso base) el modelo no es capaz de predecir correctamente las curvas de elución para mezclas de estas proteínas. Debido a que en el caso de CB8, en que se varió en la misma cantidad la pendiente del gradiente y la concentración en un 25% bajo el caso base, el coeficiente de correlación obtenido fue similar ($R^2=0.91$) y dado que para dicha variación de concentración se ha observado que el modelo es capaz de predecir correctamente los perfiles de elución (con coeficientes de correlación sobre 0.95) se cree que el

mayor responsable de no poder simular correctamente esta curva (CB9) es la duración del gradiente, teniéndose también en este sistema que el factor que más afecta las predicciones es este último.

En este caso, así como en todos los cromatogramas estudiados para este sistema, la diferencia entre el área bajo los *peaks* de absorbancia experimentales y calculados son mucho mayores que en las situaciones estudiadas para los experimentos PA, tal y como se observa en la Tabla 6.10. La principal responsable de esto es la cola de desorción, que no fue posible de eliminar mediante el ajuste con la línea base. Esto podría deberse o bien a un error asociado con el ajuste, o a un comportamiento distinto de las proteínas durante la elución debido a que no son totalmente homogéneas en cuanto a sus glicosilaciones, pudiendo existir algunas glicosilaciones en distintas regiones de la cadena polipeptídica exponiendo distintas regiones para su unión al pigmento fijado a la resina. Esto último haría que las proteínas eluyan formando distintos *peaks* hacia el final de la elución, los que se hacen más evidentes al disminuir la pendiente del gradiente.

3.3.2.4 ABSORBANCIAS A 280NM Y 405NM

En este caso es interesante observar qué tan bien el modelo es capaz de predecir la curva de la Hb, lo cual puede hacerse directamente al comparar los resultados experimentales y calculados de absorbancia a 405nm. Para ello, se transformaron los datos de absorbancia calculados por el programa a 280nm, a datos de absorbancia a 405nm, obteniéndose curvas como las presentadas en la Figura 3.24.

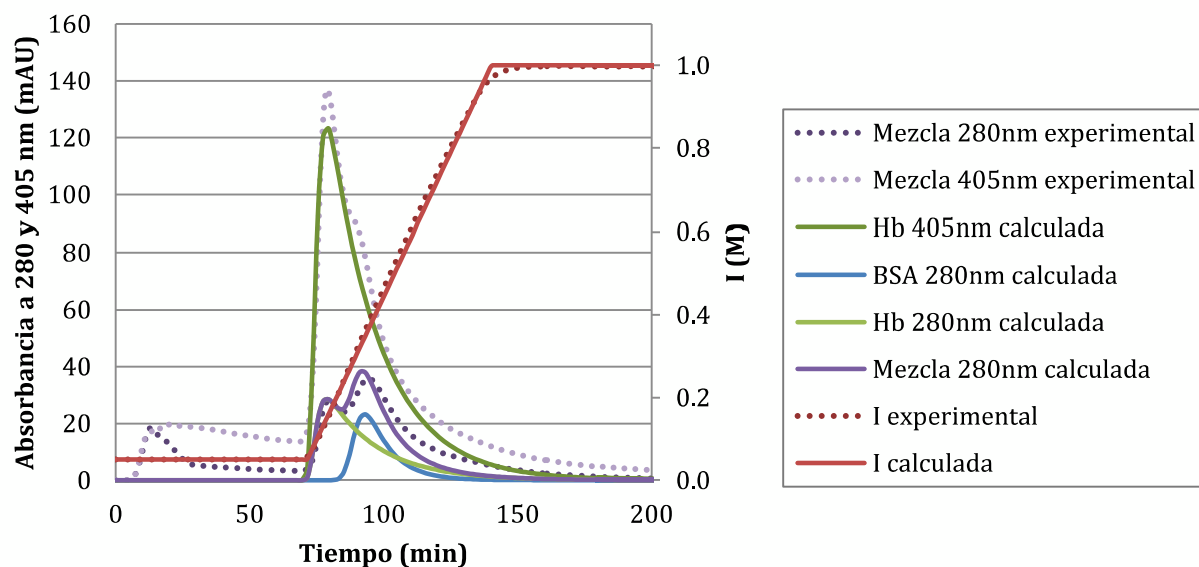


Figura 3.24 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a Cibacron blue para un flujo igual a 0.1 mL/min, $C_0=0.75$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y pendiente de gradiente igual a 0.014 M/min (Experimento CB3).

Aquí se presenta un buen ajuste del tiempo de retención de la Hb (con un ER inferior al 1%), aunque no un muy buen ajuste de la absorbancia máxima (que presenta un ER de alrededor de un 13%), probablemente debido a un error en la corrección con la línea base, sumado al hecho de que el ajuste de los parámetros cinéticos no logró determinar adecuadamente el máximo de absorbancia (ver Figura 3.5). Resultados similares se observan para los experimentos CB4 y CB5, donde el modelo es capaz de predecir muy bien la cola de desorción, más que el máximo de absorbancia. Las figuras donde fueron graficados dichos experimentos se presentan en el Anexo F.

3.4 DISCUSIÓN FINAL

En los experimentos estudiados tanto para el gradiente de sal, como para el gradiente de pH, fue posible predecir correctamente los tiempos de retención de las proteínas en las mezclas, obteniéndose errores inferiores al 8%, aun cuando la duración del gradiente aumentó 1.8 veces, en el caso de las proteínas con afinidad por *Blue Sepharose*, o al doble, en el caso de las inmunoglobulinas. No se obtuvo los mismos resultados en el caso de las absorbancias máximas, probablemente por errores experimentales al determinar la concentración inicial de la muestra (que llegó a un 25% en el caso de CB), o por la imposibilidad de ajustar correctamente los valores a la línea base. Para el resto de las variaciones: volumen de muestra (hasta 400%), flujo de la fase móvil (alrededor de un 30%) y concentración de proteínas en la muestra (hasta 30% en sistema *dye-ligand* y hasta 100% para las proteínas con afinidad por la proteína A recombinante), el error relativo fue inferior al 2% en los casos en que se utilizó un gradiente de pH para la elución, e inferior a un 6.5%, en los casos en que se utilizó un gradiente de fuerza iónica. Probablemente estos mayores errores se deban, en parte, a que en el segundo caso se inyectaron mayores masas de proteína a la columna (unas 30 veces superior a la inyectada a la columna *rProtein A FF*), afectando más fuertemente la forma en que ocurre la desorción debido a capacidades máximas desiguales para cada proteína en estudio.

De las condiciones de operación estudiadas, las que más interesaría variar al momento de buscar computacionalmente las mejores para la separación cromatográfica son las características del gradiente, puesto que permite mejorar parámetros de la separación como el rendimiento y la resolución, y el flujo, puesto que permite obtener la separación en un menor tiempo. En estos dos puntos se encuentran las principales limitantes del modelo propuesto puesto que sólo permite estimar correctamente las curvas de elución para variaciones de no más allá de un 80%, en el caso del largo del gradiente, y hasta un 30% de variación en el flujo, aunque habría que estudiar un rango más amplio para este factor. Sin embargo, independiente de estas limitaciones o de la naturaleza de los errores obtenidos en la determinación de los tiempos de retención, la magnitud de estos últimos es bastante pequeña en el rango de concentraciones, volúmenes de muestra, flujos y longitudes de gradientes estudiados. Además, los perfiles de elución son predichos con coeficientes de correlación entre los datos de absorbancia calculados y experimentales superiores a 0.91, lo que hace del modelo propuesto en este trabajo un buen punto de partida para estudiar cromatografías de afinidad con mayores concentraciones y volúmenes de muestra. Además, en este trabajo se estudian dos metodologías para determinar los parámetros cinéticos involucrados con la relación de desorción de las proteínas, las que pueden ser utilizadas para determinar los parámetros cinéticos de proteínas eluidas en distintos tipos de cromatografías.

Es importante indicar que los resultados obtenidos en este trabajo, para la técnica *dye-ligand*, son comparablemente buenos con respecto a los obtenidos por Li y colaboradores (2004), trabajo en el cual se utilizó una formulación SMA (*steric mass-action*) para expresar las isotermas binarias de adsorción. Sin embargo, ese modelo entrega *peaks* más simétricos, a diferencia de los encontrados experimentalmente en el presente trabajo y que pudieron ser simulados por el modelo propuesto en este escrito.

No se puede dejar de mencionar que recientemente los parámetros cinéticos del modelo estudiado en este trabajo han sido publicados en el artículo “Extension of the selection of protein chromatography and the rate model to affinity chromatography” de la revista *Journal of Molecular Recognition* (2010. **22**: 609-617), incluido en las últimas páginas de este informe. Los valores de los parámetros reportados en dicho artículo, difieren de los presentados en este escrito debido a que en este trabajo se profundizó aún más en la búsqueda de valores para los parámetros físicos de las distintas resinas utilizadas (tales como porosidad del lecho, factor de tortuosidad y tamaño del macroporo) y en el estudio de la relación de elución, con el fin de obtener aún un mejor ajuste de las curvas, en particular para las proteínas estudiadas en la técnica *dye-ligand*. Debido a que se propuso un mismo modelo para ambos sistemas, al variar la relación de elución o el método numérico utilizado para el cálculo de las curvas de elución de las proteínas tanto puras como en mezcla, fue necesario volver a determinar, también, los parámetros cinéticos para las inmunoglobulinas.

Por último, se recomienda que para el uso del modelo estudiado en este trabajo, antes de determinar los parámetros cinéticos, se estudien previamente las características que debe tener el gradiente para llevar a cabo una buena separación de las proteínas puesto que su variación es la que más afecta la calidad de las predicciones. Un estudio parecido debiera llevarse a cabo con el flujo de la fase móvil puesto que, aunque afecta menos que la pendiente del gradiente, es el segundo factor más relevante en los resultados de las simulaciones. Para el ajuste de las curvas se recomienda una relación de elución como la presentada por Melander y colaboradores (1989) y para la determinación de parámetros, se recomienda el uso de la función *fminsearch* de Matlab® escogiendo como base valores de los parámetros cinéticos entre 0 y 10 que corresponde al rango de valores que se han obtenido tanto en este trabajo como por Orellana y colaboradores (2009) y Lienqueo y colaboradores (2009).

4 CONCLUSIONES

Utilizando un modelo general de balances de masa se logró modelar el proceso cromatográfico de afinidad para dos ligandos distintos (proteína A y colorante *Cibacron Blue*) y dos tipos distintos de elución (gradiente no lineal de pH y gradiente lineal de fuerza iónica).

Una relación lineal de elución entre la afinidad por el ligando fijado a la matriz y la concentración de modulador (sal o pH) permitió ajustar exitosamente los datos experimentales de 3 proteínas individuales con distinta afinidad por la proteína A y 2 proteínas individuales con distinta afinidad por el colorante *Cibacron Blue*. Los parámetros cinéticos determinados permitieron simular dichos cromatogramas con un muy buen coeficiente de correlación lineal, entre las absorbancias experimentales y calculadas, mayor a 0.99.

Con respecto al estudio de validación, el modelo propuesto es capaz de predecir correctamente curvas de elución de mezclas de proteínas en condiciones de operación distintas de las utilizadas para determinar los parámetros cinéticos.

Para el caso de las proteínas con afinidad por *Cibacron Blue* se lograron buenos coeficientes de correlación (superiores a 0.91) para variaciones de hasta un 80% en la longitud del gradiente, un 30% en el flujo de la fase móvil y un 30% en la concentración de proteínas en la muestra (del orden de 1 mg/mL).

Para el caso de las inmunoglobulinas, también se obtuvieron buenos coeficientes de correlación (superiores a 0.91) para variaciones de hasta un 30% en la longitud del gradiente, un 30% en el flujo de la fase móvil y aproximadamente un 100% de variación tanto en la concentración de proteínas en la muestra (del orden de 0.15 mg/mL), como en su volumen de inyección.

La única limitación del modelo se presentó para variaciones en la pendiente del gradiente de elución permitiendo un máximo de un 41%, en el caso en que el ligando es el colorante y de un 23%, para el caso de la proteína A.

5 REFERENCIAS

- Amersham Biosciences. 2002. *Affinity Chromatography: Principles and Methods*. Uppsala, Suecia, Amersham Biosciences AB, 155p.
- Atlshuler EP, Serebryanaya DV y Katrukha AG. 2010. «Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity» *Biochemistry (Moscow)* **75**: 1584-1605.
- Carroll, DL. 1999. *David L. Carroll's FORTRAN Genetic Algorithm Driver*. <http://cuarospace.com/carrol/ga.html> (último acceso: 10 de Octubre de 2010).
- Chaiyasut C y Tsuda T. 2001. «Isoelectric points estimation of proteins by electroosmotic flow: pH relationship using physically adsorbed proteins on silica gel» *Chromatography* **22**: 91-96.
- Finlayson, B. 1980. *Nonlinear analysis in chemical engineering*. Nueva York, USA. Mc Graw-Hill International. 360 p.
- GE Healthcare 2008. «HiTrap rProtein A FF 1 ml and 5 ml» 10p.
- Geankoplis CJ. 1998. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Tercera edición, México. Editorial Prentice Hall. 1007p.
- Gu T. 1990. «Inclusion chromatography using cyclodextrin-containing resins and studies of nonlinear chromatographic theories» Tesis doctoral, School of Chemical Engineering, Purdue University. 275 p.
- Gu T. 1995. *Mathematical modeling and scale-up of liquid chromatography*. Berlin, Alemania. Springer. 123p.
- Gu T y Zheng Y. 1999. «A study of the scale-up of reversed-phase liquid chromatography» *Separation and Purification Technology* **15**: 41-58.
- Gu T, Hsu K-H y Syu M-J. 2003. «Scale-up of affinity chromatography for purification of enzymes and other proteins» *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 430-437.
- Gu T, Tsai G-J y Tsao GT. 1993. «Modeling of nonlinear multicomponent chromatography» Volumen 49 de *Advances in Biochemical Engineering*, editado por A Fiechter, 46-69. Springer-Verlag.
- Gustavsson P-E y Larsson P-O. 2006. «Support Material for Affinity Chromatography» Capítulo 2 de *Handbook of Affinity Chromatography*, editado por DS Hage. 15-34. Segunda ed. Lund, Suecia. Taylor & Francis Group.
- Hage DS, Bian M, Burks R, Karle E, Ohnmacht C y Wa C. 2006 «Bioaffinity Chromatography» Capítulo 5 de *Handbook of Affinity Chromatography*, editado por DS Hage. 101-126. Segunda ed. Lund, Suecia. Taylor & Francis Group.
- Janeway CA, Travers P, Walport M y Shlomchick MJ. 2001. *Inmunobiology. The Immune System in Health and Disease*, 5th edition. Nueva York, USA. Garland Science.
- Labrou NE. 2000. «Dye-ligand affinity chromatography for protein separation and purification» Capítulo 13 de *Methods in Molecular Biology. Volume 147. Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, editado por P Bailon, GK Ehrlich, W-J Fung y W Berthold, 129-131. Totowa, NJ. Humana Press Inc.
- Li W, Zhang S y Sun Y. 2004. «Modeling of the linear-gradient dye-ligand affinity chromatography with a binary adsorption isotherm» *Biochemical Engineering Journal* **22**: 63-70.
- Li Z, Gu Y y Gu T. 1998. «Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography» *Biochemical Engineering Journal* **2**: 145-155.
- Lienqueo ME, Shene C y Asenjo JA. 2009. «Optimization of hydrophobic interaction chromatography using a mathematical model of elution curves of protein mixture» *Journal of Molecular Recognition* **22**: 110-120.

- Melander WR, Rassi ZE y Horvath Cs. 1989. «Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography» *Journal of Chromatography* **469**: 3-27.
- Orellana CA, Shene C y Asenjo, JA. 2009. «Mathematical modeling of elution curves for a protein mixture in ion exchange chromatography applied to high protein concentration» *Biotechnology and Bioengineering* **104**: 572-581.
- Orellana CA. 2009. «Modelamiento y simulación de las curvas de elución de proteínas a alta concentración en cromatografía de intercambio iónico» Tesis de Magíster en Ciencias de la Ingeniería mención Química, Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 99p.
- Pharmacia Biotech. 1994. «Monoclonal antibody purification» Manual, 75p.
- Ruthven DM. 1984. *Principles of adsorption and adsorption processes*. Nueva York, Wiley. 433p.
- Sandoval G, Shene C, Andrews BA y Aenjo JA. 2010. «Extension of the selection of protein chromatography and the rate model to affinity chromatography» *Journal of Molecular Recognition* **23**: 609-617.
- Schwarz, A. 2000 «Affinity Purification of Monoclonal Antibodies» Capítulo 5 de *Methods in Molecular Biology. Volume 147. Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, editado por P Bailon, GK Ehrlich, W-J Fung y W Berthold, 49-51. Totowa, NJ. Humana Press Inc.
- Shene C, Lucero A, Andrews BA y Asenjo JA. 2006. «Mathematical modeling of elution curves for a protein mixture in ion exchange chromatography and for the optimal selection of operational conditions» *Biotechnology and Bioengineering* **95**: 704-713.
- Sigma-Aldrich Co. *Sigma-Aldrich*. 2010. <http://www.sigmaaldrich.com> (último acceso: 10 de Octubre de 2010).
- Stanworth DR, Turner MW. 1978. «Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits» Capítulo 6 de *Handbook of experimental immunology, Volume 1: Immunochemistry*, editado por Weir DM, 241-253. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Subramanian A. «Immunoaffinity Chromatography» Capítulo 10 de *Methods in Molecular Biology. Volume 147. Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, editado por P Bailon, GK Ehrlich, W-J Fung y W Berthold, 95-101. Totowa, NJ. Humana Press Inc.
- The MathWorks, Inc. *MathWorks. Accelerating the pace of engineering and science*. 1994-2010. <http://www.mathworks.com> (ultimo acceso: 10 de Octubre de 2010).
- Truei Y-H, Gu T, Tsai G-J y Tsao GT. 1992. *Large-scale gradient elution chromatography*. Volumen 47 de *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, editado por A Fiechter, 1-44. Springer-Verlag.
- Villadsen JV y Stewart WE. 1967. «Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation» *Chemical Engineering Science* **22**: 1483-1501.
- White HL y Monaghan BR. 1935. «The isoelectric point of adsorbed hemoglobin» *The Journal of Biological Chemistry* **113**: 371-374.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A: USO DEL CLUSTER

Un cluster consiste en muchos computadores que se instalan pensando que va a ser utilizado como un cluster. El resultado es un computador más potente que un típico computador de escritorio, el que puede ser utilizado para el procesamiento de grandes cantidades de cálculos, los que se buscan realizar de manera paralela.

Los comandos más necesarios para interactuar con Condor a la hora de enviarle tareas o ver su estado son:

condor_q	: permite ver la cola de tareas
condor_submit <i>nombredearchivodetarea</i>	: envía la tarea “ <i>nombredearchivodetarea</i> ”
condor_rm <i>numerodetarea</i>	: borra de la cola la tarea número “ <i>numerodetarea</i> ”

El archivo “*nombredearchivodetarea*” debe tener la siguiente estructura:

```
universe=vanilla
executable=matlab -nodisplay -r nombreachivomatlab
output=results.output.%(Cluster).%(Process)
error=results.error.%(Cluster).%(Process)
log=results.%(Cluster).%(Process).log
```

donde “*nombreachivomatlab*” corresponde a la misma sentencia que se escribe en Matlab para ejecutar un programa.

6.2 ANEXO B: CROMATOGRAFÍA PASO A PASO

En este anexo se explican los pasos a seguir para la realización de las cromatografías de afinidad estudiadas en este trabajo. Se explicará desde la preparación de los *buffers* hasta el uso del sistema FPLC (mostrado en la Figura 6.1) controlado por el *software* UNICORN 5.11. Para un mayor detalle se recomienda revisar los manuales del equipo, partiendo por “Getting started”.

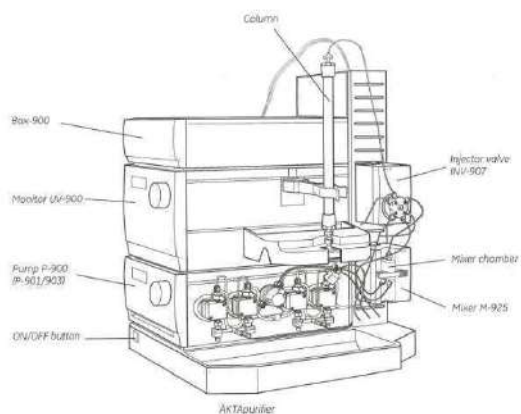


Figura 6.1 Equipo ÄKTApurifier de GE Healthcare *Fuente: Manual de ÄKTApurifier Getting Started.*

6.2.1 PREPARACIÓN DE *BUFFERS*

Los *buffers* se preparan pesando las cantidades requeridas de cada compuesto, luego se completa el volumen deseado y finalmente, si es necesario, se ajusta el pH.

La masa requerida de cada compuesto se determina utilizando la siguiente expresión:

$$m(g) = PM\left(\frac{g}{mol}\right) \cdot \text{Concentración molar}\left(\frac{mol}{L}\right) \cdot \text{Volumen}(L) \quad (6.1)$$

El peso molecular de cada uno de los reactivos utilizados se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 6.1 Peso Molecular de los reactivos utilizados en la preparación de los *buffers*.

Reactivo	Peso molecular (g/mol)
Acetato de sodio (CH ₃ COONa)	82.03
Ácido cítrico monohidrato (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	210.14
Cloruro de sodio (NaCl)	58.44
di-Sodio hidrogenofosfato dihidrato (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	177.99
Sodio dihidrogenofosfato monohidrato (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	137.99
Tris (Trizma®)	121.14
tri-Sodiocitrato dihidrato (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	294.10

Una vez ajustado el pH, los *buffers* deben ser filtrados en una cámara de filtración en vacío, utilizando filtros Advantec de 0.2 µm. Finalmente, deben ser desgasificados con helio durante aproximadamente 1 minuto por cada 100 mL de *buffer*.

6.2.1.1 *BLUE SEPHAROSE*

En este caso los *buffers* de unión y elución utilizados son los siguientes:

Buffer A: Tris-HCl⁸ 10 mM + NaCl 0.05 M pH 7.5

Buffer B: Tris-HCl 10 mM + NaCl 1 M pH 7.5

Para un volumen de 100 mL se pesan las siguientes cantidades:

Tabla 6.2 Masa requerida de reactivos para 100 mL de *buffers* de unión y elución para cromatografías en *Blue Sepharose*.

<i>Buffer</i>	Reactivo	<i>m</i> (g)
A	Tris	0.121
	NaCl	0.292
B	Tris	0.121
	NaCl	5.844

⁸ El buffer Tris-HCl se prepara en base al compuesto Trizma® de Sigma y luego se ajusta el pH con HCl y NaOH.

Según se observó experimentalmente, esta matriz requiere ser regenerada cada 10 experimentos. Para ello, se preparan los siguientes *buffers*:

Buffer de alto pH: Tris-HCl 0.1 M + NaCl 0.5 M pH 8.5

Buffer de bajo pH: Acetato de sodio 0.1 M + 0.5 M NaCl pH 4.5

Para un volumen de 250 mL se pesan las siguientes cantidades:

Tabla 6.3 Masa requerida de reactivos para 250 mL de *buffers* de bajo y alto pH para la regeneración de la matriz *Blue Sepharose*.

<i>Buffer</i>	Reactivo	<i>m</i> (g)
Alto pH	Tris	3.03
	NaCl	7.31
Bajo pH	CH ₃ COONa	2.05
	NaCl	7.31

6.2.1.2 *rPROTEIN A FF*

Los *buffers* de unión y elución utilizados son:

Buffer A: Fosfato de sodio 20 mM pH 7.0

Buffer B: Citrato de sodio 0.1 M pH 3.0

Tanto el *buffer* fosfato de sodio, como el *buffer* citrato de sodio, deben ser preparados a partir de una mezcla de sales. La masa requerida de cada una, para 100 mL, se detalla en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Masa requerida de reactivos para 100 mL de *buffers* de unión y elución para cromatografías en *rProtein A FF*.

<i>Buffer</i>	Reactivo	% v/v	<i>m</i> (g)
A	Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	61	0.217
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	39	0.108
B	C ₆ H ₆ O ₇ ·H ₂ O	82	1.723
	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	18	0.529

6.2.2 PREPARACIÓN DEL EQUIPO

A grandes rasgos, los puntos que se deben tener en consideración antes de realizar cualquier cromatografía son los siguientes:

- Instalar el loop de inyección adecuado (se cuenta con loops de 100, 200, 500 µL y de 1 y 2 mL) y lavarlo con agua MilliQ, inyectándola a través del puerto central de la válvula de inyección (como se muestra en la Figura 6.3, en la página 66).
- Desgasificar por lo menos 500 mL de agua desionizada MilliQ.
- Verificar que el nivel del recipiente de desechos esté bajo.
- Si se quiere coleccionar las fracciones de elución, disponer tubos *eppendorf* o de vidrio en el colector de fracciones.

El equipo está preparado para medir absorbancia a 3 longitudes de onda distintas (de acuerdo al método que se esté utilizando) y para medir la conductividad de la solución que sale de la columna. En caso que se quiera medir, además, el pH de dicha solución, es necesario instalar el electrodo de pH, el que debe ser enchufado en la parte trasera del equipo y se debe agregar el soporte del electrodo entre la corriente de salida de la columna y la válvula de salida, como se muestra en la Figura 6.2.

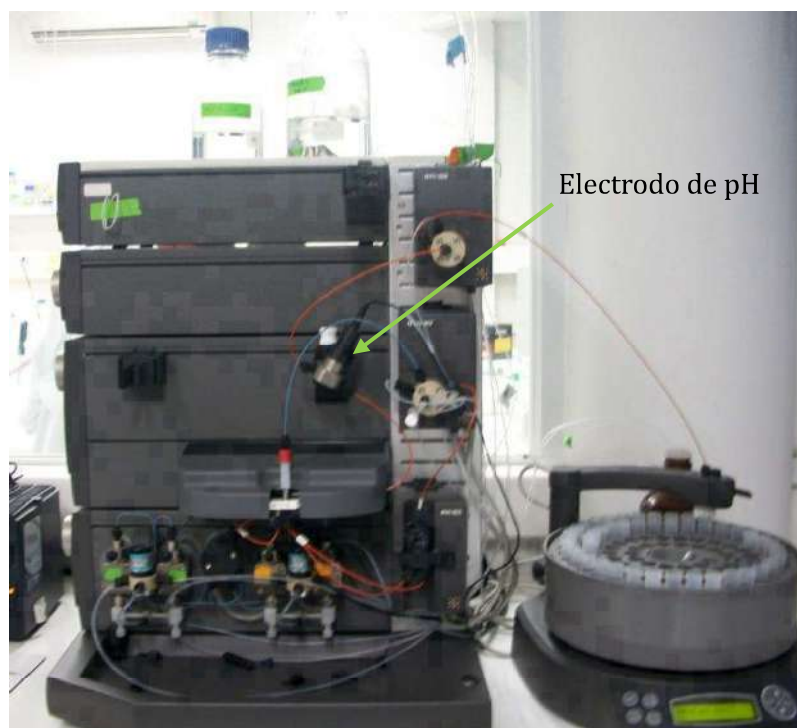


Figura 6.2 Conexión del electrodo de pH en el circuito seguido por la fase móvil durante la cromatografía.

Para su calibración, es necesario contar con soluciones estándar de pH 4.0 y 7.0 en vasos de precipitado de 50 mL (basta con 10 mL) y se debe proceder de la siguiente forma:

- Seleccionar en el menú superior, "System"
- Seleccionar "Calibrate"
- Seleccionar pH
- Presionar el botón "Read" en cada uno de los valores de pH necesarios.

Una vez calibrado se dispone en su lugar respectivo en el equipo, como se muestra en la Figura 6.2.

6.2.2.1 CONEXIÓN DE LA COLUMNA

Antes de utilizar las columnas se suelen lavar con agua MilliQ. Si el equipo no está en uso, las alimentaciones a las bombas deben estar en una solución de etanol al 20% v/v, por lo que el primer paso es sumergir dichas alimentaciones en agua MilliQ para proceder a lavar las bombas con agua. Los menús a seleccionar para el lavado son los siguientes:

- Manual
- Pump
- Pump Wash Purifier A1 y B1
- **Insert (botón)**
- **Execute (botón)**

Una vez lavadas las bombas, se procede a conectar la columna al equipo, mientras a través de éste se está bombeando un flujo determinado de agua (se suele alimentar un total de 5 volúmenes de columna). Los menús a seleccionar en el *software* son los siguientes:

- | | | | | |
|------------------|-----------------|-------------------------|------|---------------|
| • Manual | | | | |
| • Pump | Flow | 0.5 ⁹ mL/min | | Insert |
| | Gradient | 0 % B | | Insert |
| • Flowpath | Injection Valve | Load | | Insert |
| | Pump A Inlet | A1 | | Insert |
| • Alarms | Pressure | 0.5 ¹⁰ | | Insert |
| • Other | End timer | Acc. Volume | 5 mL | Insert |
| • Execute | | | | |

Blue Sepharose

Una vez que se comenzó a bombear el flujo seleccionado y se observa salir el líquido a través del puerto de la válvula de inyección que va hacia la columna, conectar la manguera de la parte superior de esta última. Luego, conectar rápidamente la manguera de la parte inferior de la columna.

rProtein A FF

En este caso, la columna se atornilla por su base al equipo, por lo que una vez iniciado el flujo sólo es necesario ajustar correctamente la manguera de la parte superior de la columna.

6.2.2.2 REGENERACIÓN Y AMBIENTACIÓN DE LA COLUMNA

Blue Sepharose

Una vez lavada la columna con agua, ésta debe ser ambientada con 5 vc de *buffer* de unión (siguiendo los mismos pasos que para lavar con agua), quedando lista para su uso.

rProtein A FF

Luego de lavar con agua, esta columna debe ser regenerada utilizando 5 vc de *buffer* de elución. Posteriormente debe ser ambientada con 5 vc de *buffer* de unión, quedando lista para su uso.

6.2.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras deben ser diluidas en el *buffer* de unión, para que tengan las mismas condiciones que éste y no eluyan en un momento no deseado.

⁹ Depende de la presión máxima que acepte la columna.

¹⁰ Depende de la presión máxima que acepte la columna.

Una vez lavado el loop y justo antes de empezar la cromatografía, se toma un volumen levemente superior al del loop de inyección con una jeringa de 1 mL y se inyecta en el puerto central de la válvula de inyección, como aparece en la siguiente figura.

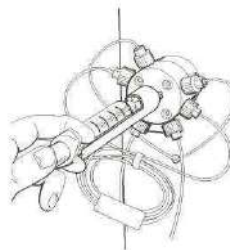


Figura 6.3 Inyección de la muestra a la válvula de inyección. Fuente: *Manual de ÄKTApurifier Getting Started*.

Blue Sepharose

Las proteínas utilizadas en este caso vienen en polvo, por lo que para su preparación basta pesar una cantidad determinada en un tubo *ependorf* de 1.5 mL, o en un trozo de papel de aluminio, y luego agregar un volumen de *buffer* A tal que se obtiene la concentración deseada.

rProtein A FF

En este caso, los IgG's vienen en solución 0.01 M PBS, 1% BSA y 15 mM azida sódica a pH 7.4, a una concentración de 0.2 mg/mL. Como el pH de la solución es muy similar al del *buffer* de unión, las muestras a estudiar son diluidas agregando dicho *buffer* hasta llegar a la concentración de proteína deseada.

6.2.3 EJECUCIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA

Este último paso consiste en ejecutar el método correspondiente al sistema estudiado. Para ello se siguen los siguientes pasos:

- Seleccionar Run.
- Seleccionar del menú el método que se desee ejecutar.
- Verificar las condiciones de flujo, equilibrio de la columna, lavado de la columna, colección de fracciones y volumen de inyección.
- Seguir los pasos entregados por el *software*.

6.2.4 ALMACENAMIENTO DE LA COLUMNA

Una vez terminada la cromatografía y si es que la columna no será utilizada nuevamente durante el día, ésta debe ser lavada con 5 vc de agua y luego, con 5 vc de etanol 20% v/v. Posteriormente la columna debe desconectarse del equipo, retirando primero la manguera de la base de la columna y luego, la de la parte superior (al contrario de cómo fue conectada al equipo). Finalmente, la columna debe mantenerse bajo refrigeración (entre 4 y 8 °C).

6.3 ANEXO C: DISCRETIZACIÓN ESPACIAL DEL SISTEMA

La resolución analítica de ecuaciones diferenciales parciales es un problema que muchas veces no tiene solución o que simplemente, es muy difícil de encontrar. De esta manera, los métodos numéricos surgen como una forma de resolver aproximadamente ecuaciones de tipo diferencial, aproximando la solución de un problema por la solución de un problema equivalente planteado en un subespacio de dimensión finita.

Tingyue Gu, en su libro “Mathematical modeling and scale-up of liquid chromatography” (1995), explica detalladamente la formulación del modelo de balances de masa que se utilizó en este trabajo. De la misma forma, describe un procedimiento eficiente para su resolución numérica, el que consiste en discretizar el balance de masa diferencial parcial en la fase móvil -utilizando N_z nodos a lo largo de la columna- y el balance de masa diferencial parcial en la fase partícula -utilizando N_z nodos a lo largo de la columna y N_r nodos al interior de la partícula-, para luego acoplar las resultantes ecuaciones diferenciales ordinarias y resolverlas mediante alguna herramienta computacional.

A continuación se explica brevemente cómo se utiliza cada método de discretización en las ecuaciones diferenciales parciales de este trabajo.

6.3.1 MÉTODO DE ELEMENTOS FINITOS PARA LOS BALANCES DE MASA EN LA FASE SENO DEL LÍQUIDO

El método de elementos finitos se caracteriza por transformar un problema diferencial en un problema de álgebra lineal el que, con la ayuda de un *software* computacional, es más fácil de resolver.

La descripción matemática de este método es la siguiente:

1. El problema se formula en forma variacional, es decir, se transforma el problema diferencial original en un problema lineal, pero en un espacio de dimensión infinita.
2. El dominio (de las variables independientes) se particiona en subdominios, llamados elementos finitos. Asociado a estos se construye un espacio vectorial de dimensión finita, llamado espacio de elementos finitos.
3. Se proyecta la solución del problema diferencial original sobre el espacio vectorial finito de los elementos finitos, dando lugar a un sistema de ecuaciones lineales, con bastantes ecuaciones en la mayoría de los casos, donde el número de ecuaciones es igual a la dimensión del espacio vectorial de los elementos finitos obtenido. Hay que destacar que mientras mayor sea la dimensión de este espacio, mejor es la aproximación obtenida.
4. El último paso es la solución numérica del sistema de ecuaciones lineales, haciendo uso de herramientas computacionales. En este último paso, para efectos prácticos, los cálculos se realizan sobre una serie de puntos representativos dentro de cada elemento finito, denominados nodos, los cuales incluyen los vértices de los elementos finitos.

Hay que notar que la forma en la cual se proyecta la solución original del problema diferencial en el espacio vectorial de los elementos finitos, da lugar a diversos métodos, en todos los cuales se busca que la diferencia (el llamado residuo) entre la solución analítica del problema original y la solución aproximada sea muy pequeña, idealmente cero. El usado en este trabajo corresponde al método de residuos ponderados de Galerkin.

De acuerdo con la explicación de Finlayson (1980), este método utiliza funciones de prueba ya sea lineales o cuadráticas en la posición (en este trabajo se utilizan estas últimas). Lo primero es dividir el dominio adimensional $0 \leq z \leq 1$ en elementos de tamaño h_k . Se define una base de funciones denominadas ϕ_k , siendo su valor igual a 1 en el punto k y cero en los puntos $k - 1$ e $k + 1$. Entre dichos puntos la función tiene una forma cuadrática y en el resto del dominio es igual a 0. Se define un sistema de coordenadas local (con numeración n o m) en cada elemento utilizando coordenadas transformadas. De esta forma, en el elemento k -ésimo

$$u = \frac{z - z_k}{h_k} \quad (6.2)$$

donde u toma valores entre 0 y 1 cuando z toma valores entre z_k y z_{k+1} . Entre cada elemento se definen, en el sistema local, las funciones cuadráticas de la ecuación (6.3),

$$\phi_n = \begin{cases} \phi_1 = 2(u - 1)\left(u - \frac{1}{2}\right) \\ \phi_2 = 4u(1 - u) \\ \phi_3 = 2u\left(u - \frac{1}{2}\right) \end{cases} \quad (6.3)$$

las que se muestran en la Figura 6.4

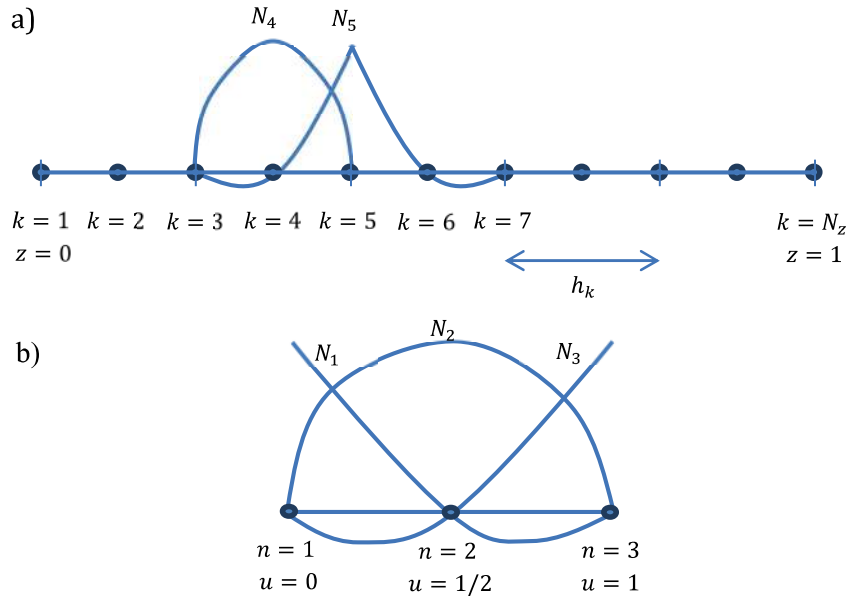


Figura 6.4 Ecuaciones de prueba cuadráticas para el método de Elementos finitos de Galerkin. a) Sistema global con numeración i . b) Sistema local con numeración n . Fuente: Finlayson, 1980.

De esta forma, la solución propuesta puede escribirse como sigue:

$$c(z) = \sum_{k=1}^{N_z} c_k \phi_k(z) \quad (6.4)$$

donde cada $\phi_k(z)$ es definido sólo en elementos apropiados, en particular en los elementos $k - 1$ y k , de acuerdo con la ecuación (6.3) y N_z corresponde al número de nodos en los cuales fue dividido el eje z , que es equivalente a $2N_e + 1$, con N_e el número de elementos finitos.

En el método de Galerkin, se forman los residuos sustituyendo la solución propuesta (ecuación (6.4)) en las ecuaciones diferenciales. Luego, el residuo es multiplicado por cada función de prueba (ϕ_j) para obtener las ecuaciones de Galerkin. De esta forma, las integrales resultantes sólo tienen que ser resueltas para un elemento finito genérico, en sus coordenadas locales, para luego ser ensamblados en una matriz diagonal que contenga las matrices locales para cada elemento finito.

Aplicando el método de Galerkin al balance diferencial en la fase móvil (ecuación 1.23), los residuos se construyen de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \int_0^1 \phi_j \left[-\frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial^2 (\sum c_{bi,k} \phi_k)}{\partial z^2} + \frac{\partial (\sum c_{bi,k} \phi_k)}{\partial z} + \frac{\partial (\sum c_{bi,k} \phi_k)}{\partial \tau} \right. \\ \left. + \xi_i \left(\sum c_{bi,k} \phi_k - \sum c_{pi,r=1,k} \phi_k \right) \right] dz = 0 \end{aligned} \quad (6.5)$$

Reordenando la expresión e integrando por partes en el término diferencial de segundo orden de esta expresión, se obtiene:

$$\begin{aligned} \sum_{k=1}^{N_z} \int_0^1 \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial \phi_j}{\partial z} \frac{\partial \phi_k}{\partial z} dz c_{bi,k} + \left(-\frac{1}{Pe_{Li}} \right) \phi_j \frac{\partial (\sum_{k=1}^{N_z} c_{bi,k} \phi_k)}{\partial z} \Big|_0^1 \\ + \sum_{k=1}^{N_z} \int_0^1 \phi_j \frac{\partial \phi_k}{\partial z} dz c_{bi,k} + \sum_{k=1}^{N_z} \int_0^1 \phi_j \phi_k dz \frac{\partial c_{bi,k}}{\partial \tau} \\ + \sum_{k=1}^{N_z} \int_0^1 \xi_i \phi_j \phi_k dz c_{bi,k} - \sum_{k=1}^{N_z} \int_0^1 \xi_i \phi_j \phi_k dz c_{pi,r=1,k} = 0 \end{aligned} \quad (6.6)$$

Debido a que las funciones ϕ_j y ϕ_k son distintas de cero sólo en los elementos $j - 1$ y j , y $k - 1$ y k , la integración puede separarse en elementos, de los cuales en el elemento l se define:

$$\frac{\partial \phi_j}{\partial z} = \frac{1}{h_l} \frac{\partial \phi_n}{\partial u} \quad dz = h_l du \quad (6.7)$$

Entonces se tiene:

$$\begin{aligned}
& \sum_{l=1}^{N_e} \sum_{m=1}^3 \frac{1}{h_l} \int_0^1 \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial \phi_n}{\partial u} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} du c_{bi,m}^e + \sum_{l=1}^{N_e} \sum_{m=1}^3 \left(-\frac{1}{Pe_{Li}} \right) \frac{\phi_n}{h_l} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} \Big|_0^1 \\
& + \sum_{l=1}^{N_e} \sum_{m=1}^3 \int_0^1 \phi_n \frac{\partial \phi_m}{\partial u} du c_{bi,m}^e + \sum_{l=1}^{N_e} \sum_{m=1}^3 h_l \int_0^1 \phi_n \phi_m du \frac{\partial c_{bi,m}^e}{\partial \tau} \\
& + \sum_{l=1}^{N_e} \sum_{m=1}^3 h_l \int_0^1 \xi_i \phi_n \phi_m du c_{bi,m}^e \\
& - \sum_{l=1}^{N_e} \sum_{m=1}^3 h_l \int_0^1 \xi_i \phi_n \phi_m du c_{pi,r=1,m}^e = 0
\end{aligned} \tag{6.8}$$

Sumando sobre todos los elementos, se puede escribir la ecuación de Galerkin en términos de coordenadas locales:

$$\begin{aligned}
& \sum_e \sum_{m=1}^3 \frac{1}{h_e} \int_0^1 \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial \phi_n}{\partial u} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} du c_{bi,m}^e + \sum_e \sum_{m=1}^3 \left(-\frac{1}{Pe_{Li}} \right) \frac{\phi_n}{h_e} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} \Big|_0^1 \\
& + \sum_e \sum_{m=1}^3 \int_0^1 \phi_n \frac{\partial \phi_m}{\partial u} du c_{bi,m}^e + \sum_e \sum_{m=1}^3 h_e \int_0^1 \phi_n \phi_m du \frac{\partial c_{bi,m}^e}{\partial \tau} \\
& + \sum_e \sum_{m=1}^3 h_e \int_0^1 \xi_i \phi_n \phi_m du c_{bi,m}^e \\
& - \sum_e \sum_{m=1}^3 h_e \int_0^1 \xi_i \phi_n \phi_m du c_{pi,r=1,m}^e = 0
\end{aligned} \tag{6.9}$$

Reordenando y agrupando términos:

$$\begin{aligned}
& \sum_e \sum_{m=1}^3 h_e \int_0^1 \phi_n \phi_m du \frac{\partial c_{bi,m}^e}{\partial \tau} \\
& + \sum_e \sum_{m=1}^3 \int_0^1 \left[\frac{1}{h_e} \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial \phi_n}{\partial u} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} + \phi_n \frac{\partial \phi_m}{\partial u} + h_e \xi_i \phi_n \phi_m \right] du c_{bi,m}^e \\
& = \sum_e \sum_{m=1}^3 \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\phi_n}{h_e} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} \Big|_0^1 + \sum_e \sum_{m=1}^3 \int_0^1 h_e \xi_i \phi_n \phi_m du c_{pi,r=1,m}^e
\end{aligned} \tag{6.10}$$

En forma matricial, y de acuerdo a lo desarrollado por Gu (1995) la ecuación (6.10) queda de la siguiente forma:

$$\sum_e [DB_i]_{n,m}^e [c'_{bi}]_m^e + \sum_e [AKB_i]_{n,m}^e [c_{bi}]_m^e = [PB_i]_m + \sum_e [AFB_i]_{n,m}^e [c_{pi,r=1}]_m^e \quad (6.11)$$

con

$$[DB_i]_{n,m}^e = h_e \int_0^1 \phi_n \phi_m du \quad (6.12)$$

$$[AKB_i]_{n,m}^e = \int_0^1 \left[\frac{1}{h_e} \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial \phi_n}{\partial u} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} + \phi_n \frac{\partial \phi_m}{\partial u} + h_e \xi_i \phi_n \phi_m \right] du \quad (6.13)$$

$$[PB_i]_m = \sum_e \sum_{m=1}^3 \frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\phi_n}{h_e} \frac{\partial \phi_m}{\partial u} \Big|_0^1 = \begin{cases} -c_{bi} + \frac{C_{fi}(\tau)}{C_{0i}}, & z = 0 \\ 0, & \sim \end{cases} \quad (6.14)$$

$$[AFB_i]_{n,m}^e = \int_0^1 h_e \xi_i \phi_n \phi_m du \quad (6.15)$$

Estas ecuaciones pueden ser definidas en cada elemento utilizando un sistema local de coordenadas y luego pueden ser ensambladas para obtener la matriz final.

Para su resolución numérica, la ecuación (6.11) puede ser reescrita de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} h_e [M1]^e [c'_{bi}] = & - \left(\frac{1}{h_e Pe_{Li}} [M2]^e + [M3]^e + h_e \xi_i [M1]^e \right) [c_{bi}] + [PB_i] \\ & + h_e \xi_i [M1]^e [c_{pi,r=N_r+1}] \end{aligned} \quad (6.16)$$

donde $h_e = 2/(N_z - 1)$ y las matrices $[M1]^e$, $[M2]^e$ y $[M3]^e$ se forman ensamblando de manera tridiagonal las matrices locales $[M1]$, $[M2]$ y $[M3]$ cuyos valores fueron reportados por Finlayson (1980):

$$[M1] = \int_0^1 \phi_n \phi_m du = \begin{pmatrix} \frac{2}{15} & \frac{1}{15} & -\frac{1}{30} \\ \frac{1}{15} & \frac{8}{15} & \frac{1}{15} \\ -\frac{1}{30} & \frac{1}{15} & \frac{2}{15} \end{pmatrix} \quad (6.17)$$

$$[M2] = \int_0^1 \frac{d\phi_n}{du} \frac{d\phi_m}{du} du = \begin{pmatrix} \frac{7}{3} & -\frac{8}{3} & \frac{1}{3} \\ -\frac{8}{3} & \frac{16}{3} & -\frac{8}{3} \\ \frac{1}{3} & -\frac{8}{3} & \frac{7}{3} \end{pmatrix} \quad (6.18)$$

$$[M3] = \int_0^1 \phi_n \frac{d\phi_m}{du} du = \begin{pmatrix} -\frac{1}{2} & \frac{2}{3} & -\frac{1}{6} \\ -\frac{2}{3} & 0 & \frac{2}{3} \\ \frac{1}{6} & -\frac{2}{3} & \frac{1}{2} \end{pmatrix} \quad (6.19)$$

6.3.2 MÉTODO DE COLOCACIÓN ORTOGONAL PARA LOS BALANCES DE MASA EN LA FASE PARTÍCULA

Usando los mismos polinomios simétricos definidos por Finlayson (1980), el balance de masa adimensional en la partícula (ecuación 1.26) es transformado en la siguiente ecuación por el método de colocación ortogonal:

$$\left(\sum_{j=1}^N \frac{\partial g_i}{\partial c_{pj}} \frac{\partial c_{pj}}{\partial \tau} \right)_l = \eta_i \sum_{k=1}^{N_r+1} B_{l,k} (c_{pi})_k, \quad l = 1, 2, \dots, N_r \quad (6.20)$$

Donde $g_i = (1 - \varepsilon_p) c_{pi}^* + \varepsilon_p c_{pi}$. El valor de $(c_{pi})_{N_r+1}$, es decir, $c_{pi,r=1}$, puede ser obtenido de la condición de borde en $r=1$:

$$c_{pi,r=1} = \frac{B_{li} c_{bi} - \sum_{j=1}^{N_r} A_{Nr+1,j} c_{p,j}}{A_{Nr+1,N_r+1} + B_{li}} \quad (6.21)$$

Donde las matrices A y B son las definidas por Finlayson (1980). Debido a que los valores entregados para dichas matrices sólo permiten utilizar hasta 2 nodos de colocación, se debió encontrar su valor para un número genérico N_r . Este procedimiento fue descrito, además, por Villadsen y Stewart (1967), el que fue seguido en este trabajo para determinar dichas matrices.

El primer paso para la discretización de la ecuación diferencial parcial consiste en elegir una función de prueba, que en este caso es

$$y^{(n)} = y(1) + (1 - x^2) \sum_{i=0}^{n-1} a_i^{(n)} P_i(x^2) \quad (6.22)$$

Donde $P_i(x^2)$ son polinomios de grado i en x^2 que deben ser especificados y $a_i^{(n)}$ son constantes que deben ser determinadas y n corresponde al número de nodos de colocación.

Se define que los polinomios serán ortogonales con la siguiente condición

$$\int_0^1 (1-x^2)P_i(x^2)P_n(x^2)x^{a-1}dx = 0 \quad i \leq n-1 \quad (6.23)$$

donde a es igual a 1, 2 ó 3 si su geomtería es planar, cilíndrica o esférica. La solución de esta ecuación está dada por:

$$P_i(x^2) = 1 + \frac{(-i)\left(i + \frac{a}{2} + 1\right)}{1!\left(\frac{a}{2}\right)}x^2 + \dots \quad (6.24)$$

$$+ \frac{(-i)(-i+1) \dots (-1)\left(i + \frac{a}{2} + 1\right) \dots \left(i + \frac{a}{2} + i\right)}{i!\left(\frac{a}{2}\right)\left(\frac{a}{2} + 1\right) \dots \left(\frac{a}{2} + i - 1\right)}x^{2i}$$

Luego, los ceros positivos de esta función, corresponderán a los nodos de colocación interna, que sumados a un punto de frontera ($x_n=1$), corresponderán a los nodos de colocación ortogonal, N_r .

Para el cálculo de las matrices A y B se definen las matrices Q, C y D de la siguiente forma:

$$Q_{ji} = x_j^{2i-2} \quad (6.25)$$

$$C_{ji} = (2i-2)x_j^{2i-3} \quad (6.26)$$

$$D_{ji} = 2(i-1)(2(i-1)+1)x_j^{2(i-1)-2} \quad (6.27)$$

Finalmente, las matrices A y B se calculan utilizando las siguientes expresiones:

$$A = \frac{C}{Q} \quad (6.28)$$

$$B = \frac{D}{Q} \quad (6.29)$$

6.4 ANEXO D: AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS

6.4.1 RESULTADOS ENTREGADOS POR LA RELACIÓN EXPONENCIAL

Para las inmunoglobulinas de tipo 2a y 2b, se obtuvieron los siguientes valores de los parámetros cinéticos para las distintas combinaciones de valores de tortuosidad y nodos de colocación ortogonal, utilizando el algoritmo genético.

Tabla 6.5 Parámetros cinéticos de IgG2a e IgG2b obtenidos para una relación de elución exponencial utilizando distintos valores de tortuosidad y número de nodos de colocación ortogonal, utilizando el algoritmo genético.

Parámetro	IgG2a				IgG2b			
	$\tau_{tor} = 2$		$\tau_{tor} = 4$		$\tau_{tor} = 2$		$\tau_{tor} = 4$	
	$N_r = 2$	$N_r = 3$	$N_r = 2$	$N_r = 3$	$N_r = 2$	$N_r = 3$	$N_r = 2$	$N_r = 3$
$D\alpha^a$	14.79	18.81	24.20	24.33	17.11	27.62	17.77	24.81
β'	27.64	26.45	29.71	29.41	15.42	17.28	22.11	22.12
α'	2.93	4.16	2.03	1.54	3.51	0.945	0.23	0.22
$Error_p^a$	0.0037	0.0034	0.0329	0.0019	0.0057	0.0022	0.0208	0.0017

^a Suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los datos calculados por el programa computacional, dividido por el número de datos que se compararon.

En el caso de la IgG2a, se obtuvieron las siguientes curvas:

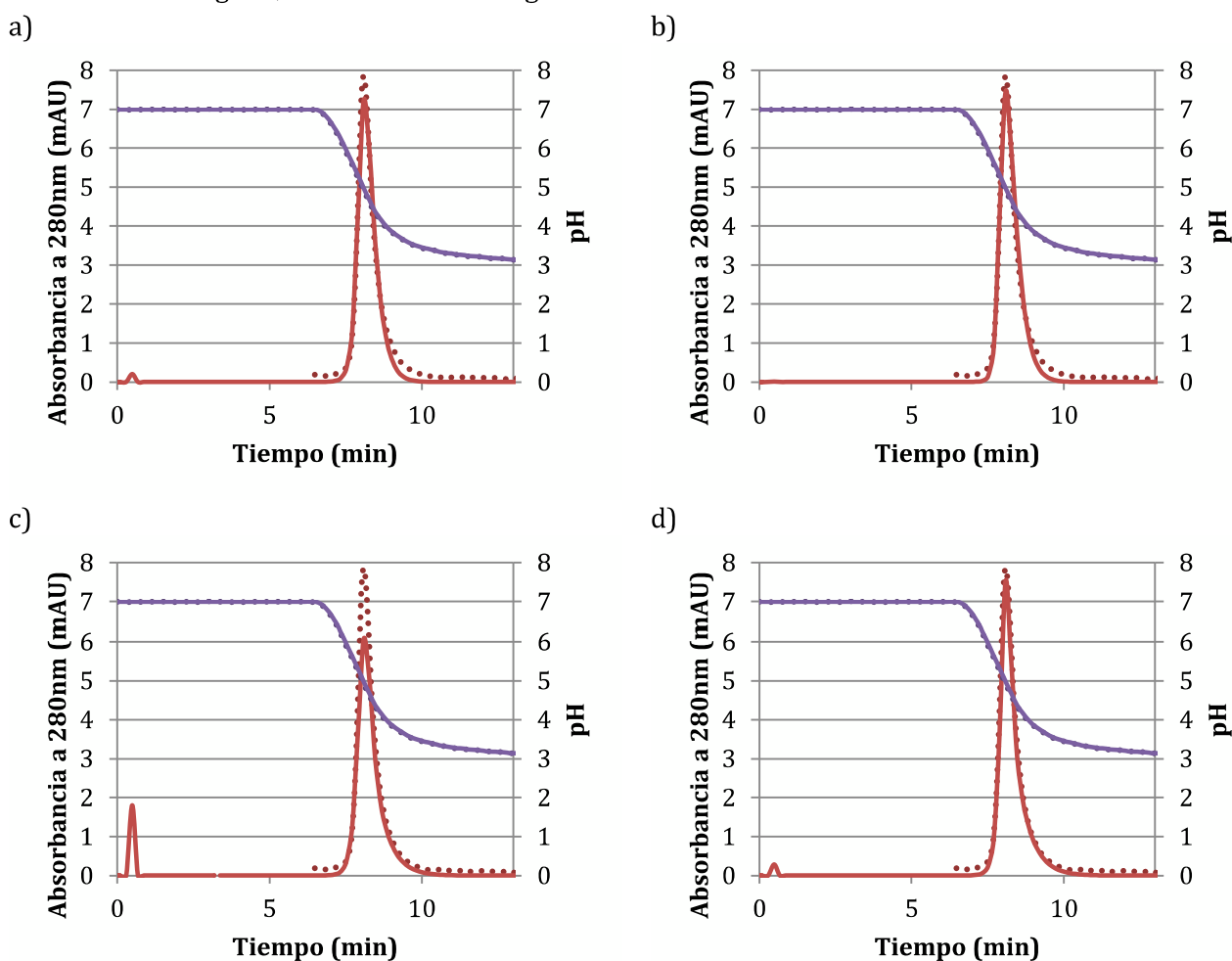


Figura 6.5 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de la proteína IgG2a utilizando un algoritmo genético y una relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.

Las líneas punteadas corresponden a los datos experimentales, mientras que las continuas, a los datos calculados por el programa. La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min⁻¹. En los primeros dos gráficos se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2. En a) se utilizaron 2 nodos de colocación ortogonal, y en b) se utilizaron 3. En los últimos dos gráficos, el factor de tortuosidad tomó un valor de 4 y se utilizaron 2 (c) y 3 (d) nodos de colocación ortogonal.

Para la IgG2b, las curvas fueron las siguientes:

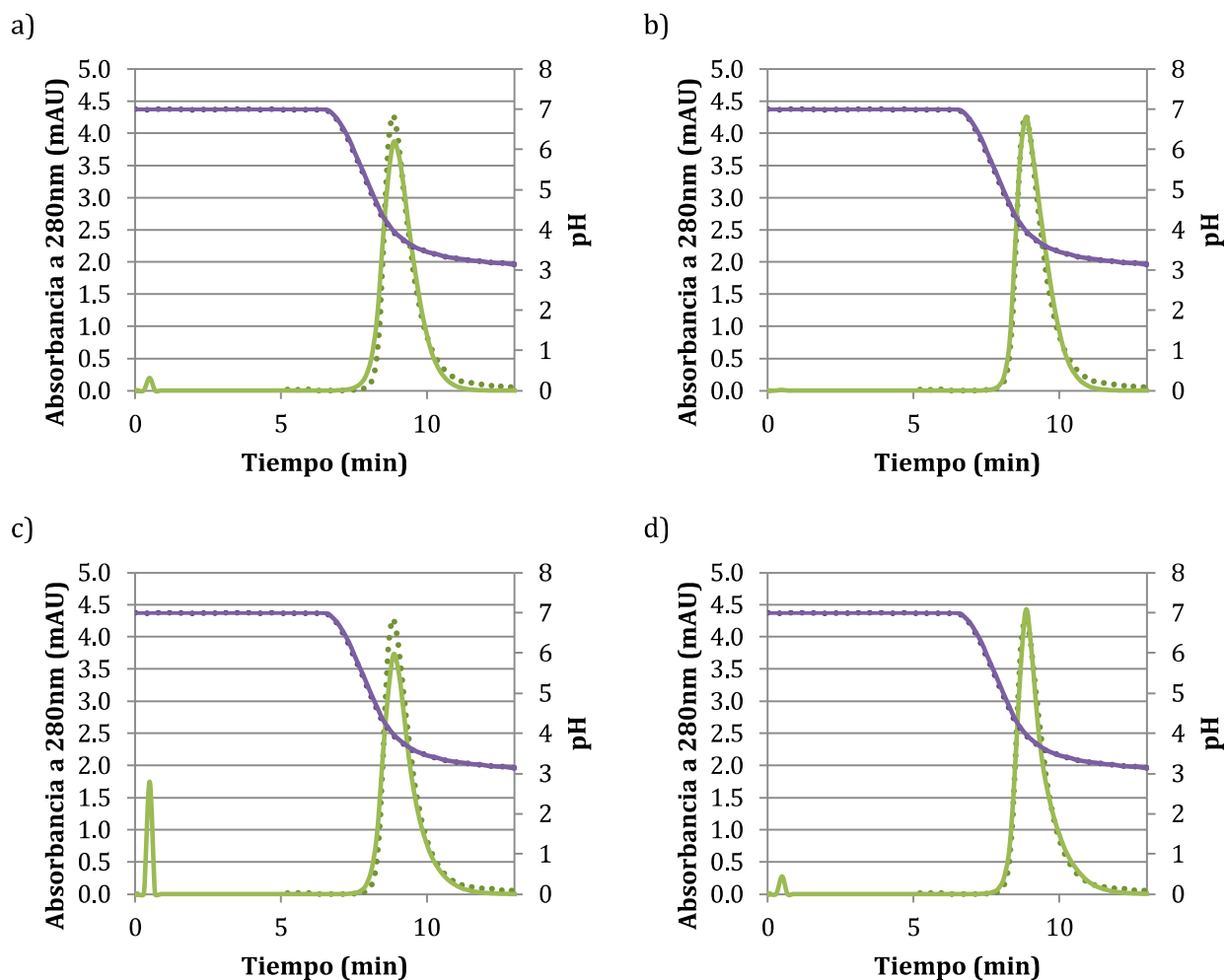


Figura 6.6 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de parámetros cinéticos de la proteína IgG2b utilizando un algoritmo genético y una relación exponencial entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.

Las líneas punteadas corresponden a los datos experimentales, mientras que las continuas, a los datos calculados por el programa. La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min^{-1} . En los primeros dos gráficos se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2. En a) se utilizaron 2 nodos de colocación ortogonal, y en b) se utilizaron 3. En los últimos dos gráficos, el factor de tortuosidad tomó un valor de 4 y se utilizaron 2 (c) y 3 (d) nodos de colocación ortogonal.

6.4.2 COMPARACIÓN ENTRE RELACIONES LINEALES Y RELACIÓN EXPONENCIAL

Los parámetros cinéticos de las curvas que mejor se ajustaron (para las distintas tortuosidades estudiadas) se presentan en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Comparación de parámetros cinéticos obtenidos utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad por el ligando.

Relación	N_r	τ_{tor}	Proteína	Da^a	β'	α'	Da^d	γ	α	Error _p ^a
Exponencial	3	4	BSA	2.284	0.055	308,98				0.77
			Hb	0.407	0.007	679,48				46.81
		2	IgG1	4.11	18.86	15.04				0.002
			IgG2a	21.21	28.35	3.03				0.003
			IgG2b	25.46	17.48	2.09				0.002
Lineal	2	6	BSA				0.438	-13.70	8.18	0.11
			Hb				0.208	-37.68	7.75	0.67
		2	IgG1				50.42	1.56	-5.03	0.002
			IgG2a				44.62	2.05	-7.09	0.002
			IgG2b				89.14	1.15	-0.84	0.004
Lineal modificada	2	6	BSA				0.437	-13.77	8.20	0.11
			Hb				0.205	-20.01	5.98	0.64
		2	IgG1				2.375	2.15	-8.67	0.002
			IgG2a				10.067	2.28	-8.40	0.003
			IgG2b				0.750	3.85	-13.17	0.001

^a Suma de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los datos calculados por el programa computacional, dividido por el número de datos que se compararon.

Las curvas resultantes para la IgG2a y la IgG2b se presentan a continuación:

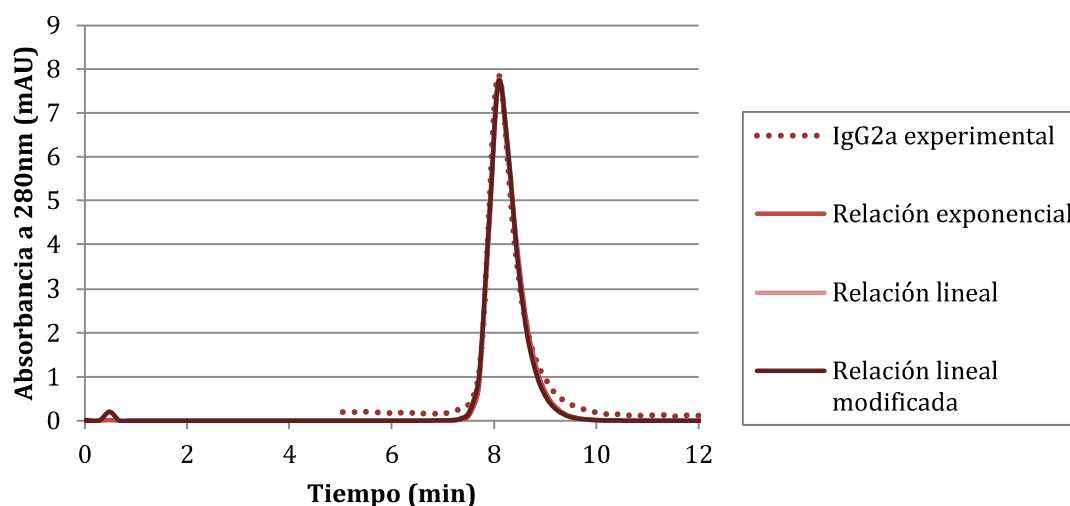


Figura 6.7 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de los parámetros cinéticos de la IgG2a utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.

La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min⁻¹. Para el cálculo de las curvas con la relación exponencial se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2 y $N_r=3$ y para las relaciones lineales se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2 y $N_r=2$.

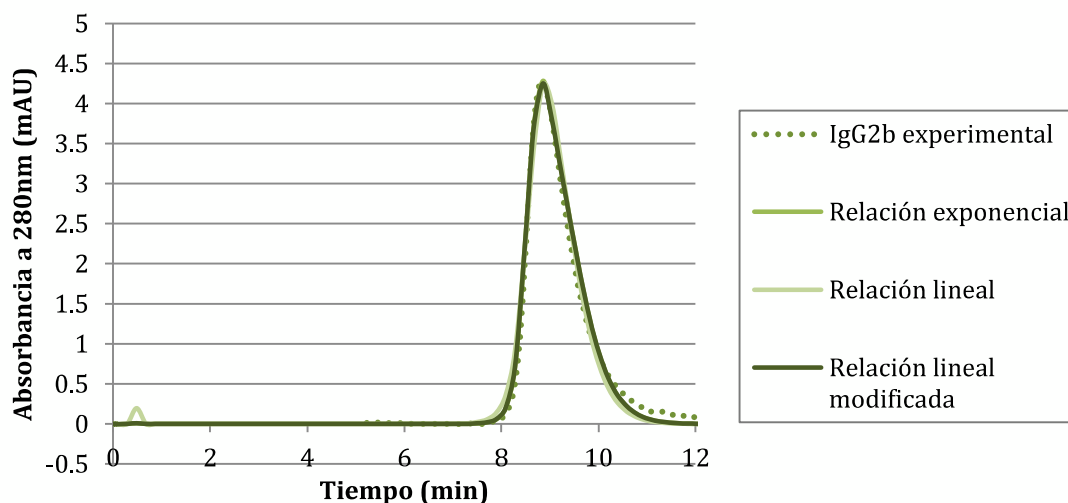


Figura 6.8 Comparación entre datos experimentales y calculados para el ajuste de los parámetros cinéticos de la IgG2b utilizando distintas relaciones entre la concentración del modulador y la afinidad de la proteína por el ligando.

La curva experimental se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $C_0=0.15$ mg/mL, $v_m=0.1$ mL y una pendiente de gradiente igual a -0.4 min⁻¹. Para el cálculo de las curvas con la relación exponencial se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2 y $N_r=3$ y para las relaciones lineales se utilizó un factor de tortuosidad igual a 2 y $N_r=2$.

6.5 ANEXO E: SIMULACIONES PARA LAS PROTEÍNAS CON AFINIDAD POR LA PROTEÍNA A

6.5.1 COMPARACIÓN ENTRE DATOS CALCULADOS PARA LAS PROTEÍNAS INDIVIDUALES Y LA MEZCLA

En la Tabla 6.7 se presentan los tiempos de retención y las absorbancias máximas a 280nm tanto para las curvas de las proteínas individuales y la mezcla de ellas, calculadas por el programa computacional.

Tabla 6.7 Absorbancias máximas y tiempos de retención de las curvas calculadas para las proteínas individuales y para la mezcla de proteínas con afinidad por proteína A recombinante.

Experimento	Mezcla calculada				Proteínas individuales calculadas					
	$abs_{m\acute{a}x_1}$	$abs_{m\acute{a}x_2}$	t_{ret_1}	t_{ret_2}	$abs_{m\acute{a}x_1}$	$abs_{m\acute{a}x_2}$	$abs_{m\acute{a}x_3}$	t_{ret_1}	t_{ret_2}	t_{ret_3}
PA4	2.54		9.26		1.30	1.66		8.87	9.26	
PA5	1.38	0.71	9.34	10.30	1.37	0.63		9.34	10.30	
PA6	3.29	3.62	6.07	6.81	3.29	3.22		6.07	6.81	
PA7	8.49		11.55		3.95	5.15		11.28	11.55	
PA8	5.14	4.42	8.19	8.76	5.12	3.54		8.19	8.96	
PA9	11.03	6.92	8.19	8.57	5.03	6.27	3.54	7.99	8.19	8.96
PA10	2.63	2.01	8.87	10.41	2.63	1.96		8.87	10.41	
PA11	0.73	0.83	8.49	9.45	0.73	0.76		8.49	9.45	

Para contribuir en la comparación entre los datos calculados y los datos experimentales se consideró, además, el área bajo el *peak* de absorbancia como una medida de la masa de proteína que

se adsorbió en la columna. No en todas las situaciones se logró ajustar correctamente los datos experimentales a la línea base, lo que puede contribuir a las diferencias presentadas en la Tabla 6.8 o incluso, enmascarar la diferencia en la cantidad de proteína inyectada en la columna. Entonces, cualquier diferencia en las absorbancias máximas de los *peaks* tiene una pequeña contribución tanto de la inyección real de proteína a la columna, como del ajuste de la curva experimental con el blanco de absorbancia.

Tabla 6.8 Comparación entre las áreas bajo el *peak* de absorbancia experimental y la calculada por el modelo para las distintas cromatografías realizadas en la columna *HiTrap r Protein A FF*.

Experimento	Área bajo el <i>peak</i> de absorbancia(<i>mAU · min</i>)		ER (%)
	Experimental	Calculada	
PA4	2.69	2.71	-0.92
PA5	2.01	2.04	-1.73
PA6	5.27	5.56	-5.56
PA7	8.86	8.71	1.73
PA8	8.24	7.72	6.30
PA9	13.08	13.15	-0.58
PA10	5.44	5.33	2.06
PA11	1.63	1.60	1.64

Un error relativo negativo indica que el valor experimental es menor que su correspondiente valor calculado.

6.6 ANEXO F: SIMULACIONES PARA LAS PROTEÍNAS CON AFINIDAD POR *CIBACRON BLUE*

6.6.1 COMPARACIÓN DE CURVAS DE HB A 405NM

En las siguientes figuras se presentan comparaciones entre las curvas experimentales y las calculadas para mezclas de BSA y Hb, incluyendo las curvas de absorbancia a 405nm.

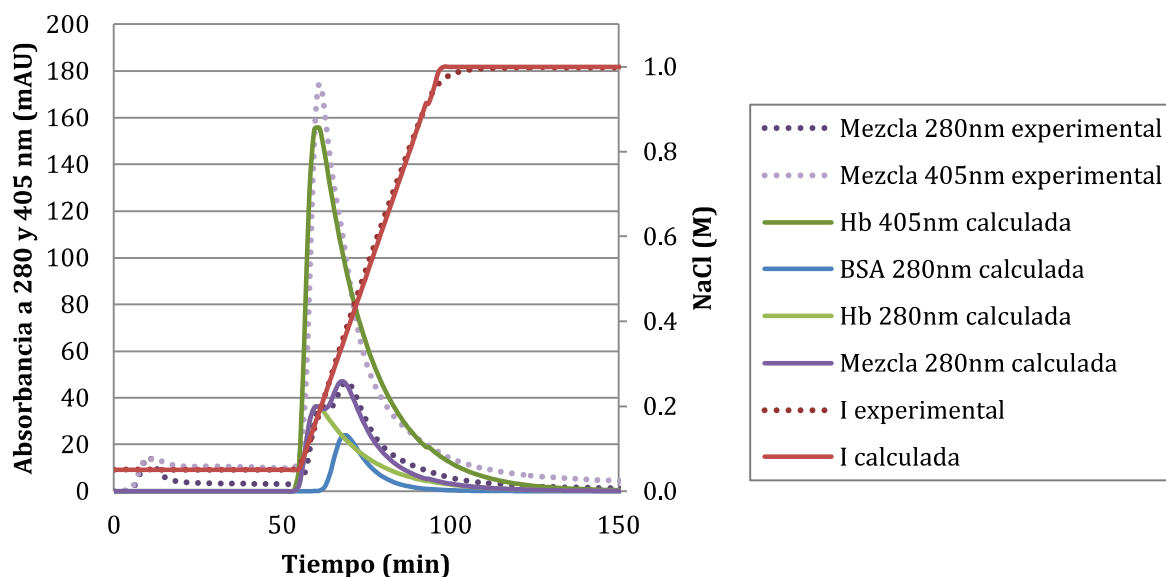


Figura 6.9 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* para un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=0.8$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y un largo de gradiente de 5.5 vc (Experimento CB4).

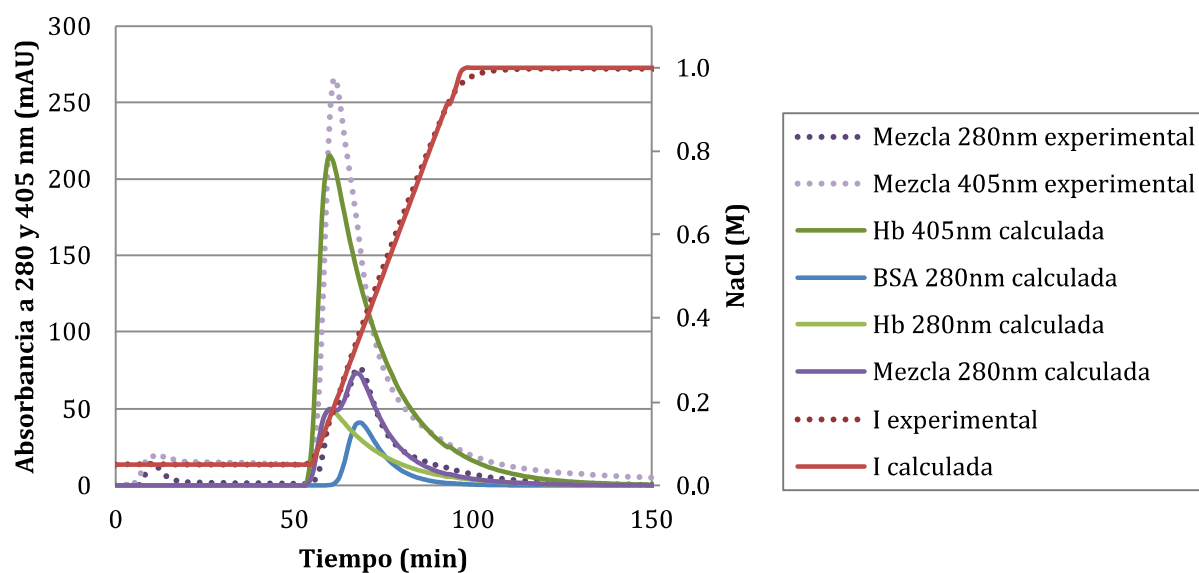


Figura 6.10 Comparación entre la curva experimental y las curvas calculadas para la mezcla de proteínas con afinidad a *Cibacron blue* para un flujo igual a 0.13 mL/min, $C_0=1.3$ mg/mL, $v_m=0.5$ mL y un largo de gradiente de 5.5 vc (Experimento CB5).

6.6.2 COMPARACIÓN ENTRE DATOS CALCULADOS PARA LAS PROTEÍNAS INDIVIDUALES Y LA MEZCLA

En la Tabla 6.9 se presentan los tiempos de retención y las absorbancias máximas a 280nm tanto para las curvas de las proteínas individuales y la mezcla de ellas, calculadas por el programa computacional.

Tabla 6.9 Absorbancias máximas y tiempos de retención de las curvas calculadas para las proteínas individuales y para la mezcla de proteínas con afinidad por *Cibacron blue*.

Experimento	Mezcla calculada				Proteínas individuales calculadas			
	$abs_{máx_1}$	$abs_{máx_2}$	t_{ret_1}	t_{ret_2}	$abs_{máx_1}$	$abs_{máx_2}$	t_{ret_1}	t_{ret_2}
CB3	28.5	38.1	79.4	91.2	28.5	23.1	79.4	93.1
CB4	36.2	46.6	61.1	67.1	35.9	24.0	61.1	68.6
CB5	49.7	72.6	59.6	67.1	49.5	41.1	59.6	68.6
CB6	26.7	39.2	61.1	68.6	26.6	22.5	61.1	68.6
CB7	46.6	58.5	47.4	57.3	46.6	29.5	47.4	59.2
CB8	27.2	31.6	49.4	69.0	27.2	20.4	49.4	71.0
CB9	28.2	32.1	10.3	13.4	27.5	18.7	9.9	13.8
CB10	31.4	25.6	51.4	90.6	31.4	20.3	51.4	90.6

Una comparación entre la absorbancia bajo el *peak* de absorbancia calculado y experimental se presenta en la Tabla 6.10.

Tabla 6.10 Comparación entre las áreas bajo el *peak* de absorbancia experimental y la calculada por el modelo para las distintas cromatografías realizadas en la columna *Blue Sepharose*.

Experimento	Área bajo el <i>peak</i> de absorbancia($mAU \cdot min$)		Error relativo (%)
	Experimental	Calculada	
CB3	1370.5	1103.5	19.5
CB4	1137.3	1000.4	12.0
CB5	1529.4	1476.4	3.5
CB6	901.4	795.1	11.8
CB7	1659.2	1618.3	2.5
CB8	1407.9	1103.7	21.6
CB9	338.8	264.7	21.9
CB10	1930.7	1471.8	23.8

6.7 ANEXO G: PROGRAMAS COMPUTACIONALES

A continuación se incluyen los códigos de las funciones implementadas en Matlab.

6.7.1 FUNCIONES PARA EL CÁLCULO DE LAS CURVAS DE ELUCIÓN, Y SU COMPARACIÓN CON DATOS EXPERIMENTALES.

La función principal corresponde a `curva_calculada.m` y es la encargada de simular curvas para distintas condiciones de operación y compararlas con datos experimentales. Para ello utiliza las siguientes funciones:

- **datos_experimentales:** invoca a los archivos de texto que contienen los datos experimentales de los distintos experimentos realizados y además contiene la información que indica qué proteínas están presentes en cada uno de dichos experimentos.
- **ecuaciones_diferenciales:** entrega el sistema de ecuaciones diferenciales que resuelve la función `ode15s` de Matlab. Contiene, además, las condiciones de borde e iniciales para cada una de las etapas del proceso cromatográfico.
- **matrices_colocacion_ortogonal:** entrega las matrices locales de colocación ortogonal (matrices A y B) para la discretización de las EDP's en la fase de la partícula
- **operacion:** entrega las condiciones de operación de cada uno de los experimentos estudiados (flujo de la fase móvil, concentración de proteína inyectada, volumen de inyección, volumen de lavado, longitud del gradiente).
- **par_cineticos:** entrega los parámetros cinéticos de las proteínas involucradas en un experimento determinado.
- **parametros:** contiene los parámetros físicos de la columna cromatográfica y calcula los números adimensionales necesarios para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales. Además, entrega las condiciones iniciales para la resolución del sistema.
- **prop_proteinas:** contiene parámetros físicos de las proteínas como su peso molecular, el factor de correlación entre concentración de proteína y absorbancia y el coeficiente de porosidad de la partícula porosa por la proteína.

6.7.1.1 CURVA_CALCULADA.M

Esta función calcula las curvas de elución de proteínas y las compara punto a punto con las curvas experimentales (función principal).

```
function fun_min=curva_calculada(base_datos)

global alfa beta Dd factor_tpo N Nz Coi tinyeccion tlavado telucion tfin PM K

%% Datos experimentales
[datos BSA Hb] = datos_experimentales(base_datos);
[Dd beta alfa] = par_cineticos(BSA,Hb);
prop_proteinas(BSA,Hb);
[c_i] = parametros(BSA,Hb,base_datos);
%% Datos calculados
ind=[];
for i=1:N+1
```

```

    ind(i)=i*Nz;%valores a la salida
end
options = odeset('RelTol',1e-5,'AbsTol',1e-6,'InitialStep',1e-5);
[tt1 c1] = ode15s('ecuaciones_diferenciales',[0 tinyeccion],c_i,options);
c_i      = c1(end,:);
[tt2 c2] =
ode15s('ecuaciones_diferenciales',[tinyeccion:0.5:tlavado],c_i,options);
c_i      = c2(end,:);
[tt3 c3] =
ode15s('ecuaciones_diferenciales',[tlavado:0.5:tlavado+telucion],c_i,options);
c_i      = c3(end,:);
[tt4 c4] =
ode15s('ecuaciones_diferenciales',[tlavado+telucion:0.5:tfin],c_i,options);
tta      = [tt1;tt2;tt3;tt4];
tt       = tta*factor_tpo;
cc       = [c1;c2;c3;c4];
datoscc  = tt;
%% Transformación a datos de concentración en mg/mL
for i=1:N
    datoscc = [datoscc cc(:,ind(i))*Coi(i)*PM(i)];
end
datoscc   = [datoscc cc(:,ind(N+1))];
%% Transformación de datos de concentración a absorbancia de la mezcla de
proteínas.
filas = size(datoscc);
suma  = zeros(filas(1),1);
for i=1:N
    datoscc(:,i+1) = datoscc(:,i+1)/K(i);
    suma(:,1)      = suma(:,1)+datoscc(:,i+1);
end
curvas      = datoscc;           % Guarda las curvas de proteínas puras
datoscc(:,1) = datoscc(:,1);
datoscc(:,2) = suma(:,1);
datoscc(:,3) = datoscc(:,N+2);
datoscc      = datoscc(:,1:3);
%% error punto a punto
error_punto  = 0;
for i=1:length(tt)
    [a1,b1]   = min(abs(tt(i)-datos(:,1)));
    error_punto = error_punto + ((datoscc(i,2)-datos(b1,2)))^2;
end
fun_min=error_punto;
save calculado.txt datoscc -ascii -double -tabs
save curvas.txt curvas -ascii -double -tabs

```

6.7.1.2 DATOS_EXPERIMENTALES.M

Esta función carga los datos experimentales (en un archivo .txt) y entrega, además, el tiempo en el cual termina la cromatografía. Para los experimentos pH-i, se tiene una función análoga.

```

function [datos BSA Hb]=datos_experimentales(base_datos)

global t_fin

BSA      = 1;
Hb       = 0;

if base_datos==1
    load datosbsa.txt
    datos = datosbsa;
elseif base_datos==2
    load datoshb.txt
    datos = datoshb;

```



```

        BSA      = 0;
        Hb       = 1;
elseif base_datos==3
    load sal_3.txt
    datos = sal_3;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==4
    load sal_4.txt
    datos = sal_4;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==5
    load sal_5.txt
    datos = sal_5;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==6
    load sal_6.txt
    datos = sal_6;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==7
    load sal_7.txt
    datos = sal_7;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==8
    load sal_8.txt
    datos = sal_8;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==9
    load sal_9.txt
    datos = sal_9;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
elseif base_datos==10
    load sal_10.txt
    datos = sal_10;
    BSA   = 1;
    Hb    = 1;
end
t_fin = datos(end,1);

```

6.7.1.3 ECUACIONES_DIFERENCIALES.M

Esta función entrega el sistema de ecuaciones diferenciales que resuelve *ode15s*.

Para el sistema con elución con sal.

```

function dc = ecuaciones_diferenciales(t,c)

global N Nz Nr Bi tinyeccion tlavado telucion Cosal Coi eta alfa beta Da Dd A
B dz M1_I M2 M3 M1 Pe Xi Cinf Ep

% Aquí se reescriben las concentraciones por componente en matrices de tamaño:
% cb=(Nz,Nc+1); cp=(Nz,Nz*Nr*(Nc+1)); cps=(Nz,Nz*Nr*(Nc+1))
cb=[];cp=[];cps=[];
[A B] = matrices_colocacion_ortogonal(Nr);
A = A(end,:);
B = B(1:Nr,:);
%% Concentración inicial de los componentes (proteínas y sal) en la fase móvil
for q=1:N+1
    for i=1:Nz
        cb(i,q) = c((q-1)*Nz+i);
    end
end

%% Concentración inicial de las proteínas en la partícula
for q=1:N
    for i=1:Nz
        for j=1:Nr
            % En líquido estancado
            cp(i,j,q) = c(Nz*(N+1)+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr);
            % Adsorbida
            cps(i,j,q) = c(Nz*(N+1)+Nz*Nr*N+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr);
        end
    end
end

```

```

end
% Condición de borde (Cp(R=1))
cp(i,Nr+1,q) = (Bi(q)*cb(i,q)-(1:Nr)*cp(i,1:Nr,q)')/(A(Nr+1)+Bi(q));
end
end
%% Balances de masa en la fase móvil
for q=1:N+1
    if q~=N+1
        % Condición de borde para las proteínas
        if t < tinyeccion
            CB(1) = -(cb(1,q)-1.)/dz; % Durante inyección de proteínas
        elseif t >= tinyeccion
            CB(1) = -(cb(1,q)-0.)/dz; % Posterior a la inyección
        end
        CB(Nz) = 0;
        dcb(1:Nz,q) = M1_I*(-
(M2/Pe+M3+M1*Xi(q))*cb(1:Nz,q)+M1*Xi(q)*cp(:,Nr+1,q)+CB');
    elseif q==N+1
        % para la sal
        if (t <= tlavado)
            CB(1) = -(cb(1,q)-Cosal/Coi(N+1))/dz; % Sin gradiente
        elseif (t > tlavado) && (t <= tlavado+telucion)
            CB(1) = -(cb(1,q)-(Cosal/Coi(N+1)+(1.-
Cosal/Coi(N+1))/telucion*(t-tlavado)))/dz; % Durante el gradiente
        elseif (t >= tlavado+telucion)
            CB(1) = -(cb(1,q)-1.)/dz; % Posterior al gradiente
        end
        CB(Nz) = 0;
        dcb(1:Nz,q) = M1_I*(-(M2/Pe+M3)*cb(1:Nz,q)+CB');
    end
end
end
%% Cinética de adsorción
for q=1:N
    for i=1:Nz
        for j=1:Nr
            sumq = Cinf;
            for qq=1:N
                sumq = sumq-cps(i,j,qq)*Coi(qq);
            end
            sumq = max(sumq/Coi(q),0);
            if t<=tlavado
                Da(q)=1000;
            else
                bi = 10^(alfa(q)+beta(q)*cb(i,N+1)*Coi(N+1));
                Da(q) = Dd(q)*bi*Coi(q);
            end
            dcps(i,j,q)=Da(q)*cp(i,j,q)*sumq-Dd(q)*cps(i,j,q);
        end
    end
end
end
%% Balances de masa en la fase estancada al interior de la partícula: sólo
interactúan las proteínas
for q = 1:N
    for i=1:Nz
        dcp(i,:,q) = (1/Ep(q))*(eta(q)*(B*cp(i,:,q)')'-(1-Ep(q))*dcps(i,:,q));
    end
end
end

```

```

%% Sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias
%Fase móvil
dc = [];
for q=1:N+1
    dc = [dc; dcb(:,q)];
end
% Fase partícula
for q=1:N
    for i=1:Nz
        for j=1:Nr
            dc(Nz*(N+1)+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr) = dcp(i,j,q);
            dc(Nz*(N+1)+Nz*Nr*N+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr) = dcps(i,j,q);
        end
    end
end
end

```

Para el sistema con elución por pH

```

function dc = ecuaciones_diferenciales(t,c)

global N Nz Nr Bi tinyeccion tlavado factor_tpo pHi xpH ypH Coi eta alfa beta
Da Dd A B dz M1_I M2 M3 M1 Pe Xi Cinf Ep

% Reescribimos las concentraciones por componente en matrices de tamaño:
% cb=(Nz,Nc+1); cp=(Nz,Nz*Nr*(Nc+1)); cps=(Nz,Nz*Nr*(Nc+1))
cb=[];cp=[];cps=[];
[A B] = matrices_colocacion_ortogonal(Nr);
A = A(end,:);
B = B(1:Nr,:);
%% Concentración inicial de los componentes (proteínas y pH) en la fase móvil
para cada etapa
for q=1:N+1
    for i=1:Nz
        cb(i,q) = c((q-1)*Nz+i);
    end
end
%% Concentración inicial de las proteínas en la partícula
for q=1:N
    for i=1:Nz
        for j=1:Nr
            % En líquido estancado
            cp(i,j,q) = c(Nz*(N+1)+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr);
            % Adsorbida
            cps(i,j,q) = c(Nz*(N+1)+Nz*Nr*(N)+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr);
        end
        cp(i,Nr+1,q) = (Bi(q)*cb(i,q) -
A(1:Nr)*cp(i,1:Nr,q)')/(A(Nr+1)+Bi(q)); % Condición de borde (Cp(R=1))
    end
end
%% Balances de masa en la fase móvil
for q=1:N+1
    if q~=N+1
        % Condición de borde para las proteínas
        if t < tinyeccion
            CB(1) = -(cb(1,q)-1.)/dz; % Durante inyección de
proteínas
        elseif t >= tinyeccion

```

```

        CB(1) = -(cb(1,q)-0.)/dz; % Posterior a la
inyección
    end
    CB(Nz) = 0;
    dcb(1:Nz,q) = M1_I*(-
(M2/Pe+M3+M1*Xi(q))*cb(1:Nz,q)+M1*Xi(q)*cp(:,Nr+1,q)+CB');
    elseif q==N+1
        % para el pH
        if (t <= tlavado)
            CB(1) = -(cb(1,q)-1)/dz; % Sin gradiente
        elseif (t > tlavado)
            pH = spline(xpH/factor_tpo,ypH,t);
            CB(1) = -(cb(1,q)-pH/pHi)/dz; % Durante el gradiente
        end
        CB(Nz) = 0;
        dcb(1:Nz,q) = M1_I*(-(M2/Pe+M3)*cb(1:Nz,q)+CB');
    end
end
%% Cinética de adsorción
for q=1:N
    for i=1:Nz
        for j=1:Nr
            sumq=Cinf;
            for qq=1:N
                sumq=sumq-cps(i,j,qq)*Coi(qq);
            end
            sumq=max(sumq/Coi(q),0);
            if t<=tlavado
                Da(q) = 1000;
            else
                bi(q) = 10^(alfa(q)+beta(q)*cb(i,N+1)*Coi(N+1));
                Da(q) = Dd(q)*bi(q)*Coi(q);
            end
            dcps(i,j,q)=Da(q)*cp(i,j,q)*sumq-Dd(q)*cps(i,j,q);
        end
    end
end
%% Balances de masa en la fase estancada al interior de la partícula: sólo
interactúan las proteínas
for q=1:N
    for i=1:Nz
        dcp(i,:,q) = (1/Ep(q))*(eta(q)*(B*cp(i,:,q))'-(1-
Ep(q))*dcps(i,:,q));
    end
end
%% Sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias
%Fase móvil
dc = [];
for q=1:N+1
    dc = [dc;dcb(:,q)];
end
% Fase partícula
for q=1:N
    for i=1:Nz
        for j=1:Nr
            dc(Nz*(N+1)+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr) = dcp(i,j,q);
            dc(Nz*(N+1)+Nz*Nr*N+(q-1)*Nz*Nr+j+(i-1)*Nr) = dcps(i,j,q);
        end
    end
end

```

```

        end
    end
end

```

6.7.1.4 MATRICES_COLOCACION_ORTOGONAL.M

Esta función calcula las matrices locales de colocación ortogonal (matrices A y B) para la discretización de las EDP's en la fase de la partícula.

```

function [A B]=matrices_colocacion_ortogonal(Nr)
a      = 3;          % a=1 para placas; a=2 para cilindros; a=3 para esferas
i      = Nr;         % número de nodos internos.
%Variables de la función Pi(x^2)    x:coordenada radial
F(1)   = -i;
F(2)   = i+a/2+1;
F(3)   = a/2;
%% Función Pi(x^2)
Pi     = zeros(1,i+1);
Pi(1)  = 1;
i_fact = 1;          % variable auxiliar que calcula el factorial de i
for j=1:i
    i_fact = i_fact*j;
    Pi(j+1) = F(1)*F(2)/(i_fact*F(3));
    F(1)    = F(1)*(-i+j);
    F(2)    = F(2)*(i+a/2+1+j);
    F(3)    = F(3)*(a/2+j);
end
%% Constantes del polinomio Pi(x^2)
constantes_Pi = zeros(1,(2*i+1)); % matriz que guarda las constantes
del polinomio Pi: [x^2i x^(2i-1) x^(2i-2)... x^0]
auxiliar      = i+1; % para guardar los datos de Pi desde
la constante de x^2i
for u=1:length(constantes_Pi)
    if round(u/2)==u/2 % si es par
        constantes_Pi(u) = 0;
    else
        constantes_Pi(u) = Pi(auxiliar);
        auxiliar = auxiliar-1;
    end
end
end
%% Raíces positivas del polinomio Pi(x^2)
%Cuento el número de raíces positivas para determinar el tamaño de la
%matriz de puntos de colocación
ceros = roots(constantes_Pi);
positivos = 0;
for j=1:length(ceros)
    if ceros(j)>0
        positivos=positivos+1;
    end
end
%% Matriz con raíces positivas del polinomio
xn = zeros(1,positivos+1);
auxiliar1 = 1; %para recorrer el vector fila xn desde el primer
componente
for j=length(ceros):-1:1
    if ceros(j)>0
        xn(auxiliar1) = ceros(j);
    end
end

```

```

        auxiliar1      = auxiliar1+1;
    end
end
xn(end)      = 1;
%% Determinación de las matrices Q, C y D
Q            = zeros(i+1);
C            = zeros(i+1);
D            = zeros(i+1);
for fila=1:i+1
    for columna=1:i+1
        Q(fila,columna) = xn(fila)^(2*columna-2);
        C(fila,columna) = (2*columna-2)*xn(fila)^(2*columna-3);
        D(fila,columna) = 2*(columna-1)*(2*(columna-
1)+1)*xn(fila)^(2*(columna-1)-2);
    end
end
%% Determinación de matrices A y B
A            = C/Q;
B            = D/Q;

```

6.7.1.5 OPERACION.M

Esta función entrega las condiciones de operación de cada uno de los experimentos estudiados.

Para el sistema con elución con sal.

```

function [Co vlavado Cosal Cfsal cv F vm]=operacion(base_datos)

%BSA pura para ajuste de parámetros
if base_datos==1
    Co      = 0.98;      % Concentración inicial de proteína (mg/mL). Se
considera 98% de pureza.
    cv      = 5.5;      % Largo del gradiente de sal (mL).
    F       = 0.1;      % Flujo volumétrico de la fase móvil (mL/min).
    vm      = 0.5;      % Volumen de inyección de la muestra (mL).
    vlavado = 2;        % Volumen de lavado (mL)
end
%Hb pura para ajuste de parámetros
if base_datos==2
    Co      = 0.989;     % concentración inicial de proteína (mg/mL). Se
considera un 98.9% de pureza.
    cv      = 5.5;      % Largo del gradiente de sal (mL).
    F       = 0.1;      % Flujo volumétrico de la fase móvil (mL/min).
    vm      = 0.5;      % Volumen de inyección de la muestra (mL).
    vlavado = 2;        % Volumen de lavado (mL).
end
if base_datos== 3
    vm      = 0.5;
    Co      = 0.75;
    F       = 0.1;
    vlavado = 5;
    cv      = 7;
elseif base_datos==4
    vm      = 0.5;
    Co      = [0.75 0.95];
    F       = 0.13;
    vlavado = 5;
    cv      = 5.5;
elseif base_datos==5
    vm      = 0.5;
    Co      = 1.3;
    F       = 0.13;
    vlavado = 5;
    cv      = 5.5;
elseif base_datos==6
    vm      = 0.5;
    Co      = 0.7;
    F       = 0.13;

```

```

        vlavado = 5;
        cv      = 5.5;
elseif base_datos==7
    vm      = 0.5;
    Co      = [0.9 1.2];
    F       = 0.1;
    vlavado = 2;
    cv      = 5.5;
elseif base_datos==8
    vm      = 0.5;
    Co      = 0.75;
    F       = 0.1;
    vlavado = 2;
    cv      = 10;
elseif base_datos==9
    vm      = 0.5;
    Co      = 0.9;
    F       = 0.5;
    vlavado = 2;
    cv      = 10;
elseif base_datos==10
    vm      = 0.5;
    Co      = 1;
    F       = 0.1;
    vlavado = 2;
    cv      = 20;
end
Cosol = 0.05;           %
Concentración inicial de sal (M).
Cfsal = 1;              %
Concentración final de sal (M).

```

Para el sistema con elución con pH.

```

function [Co vlavado pHi cv F vm]=operacion(base_datos)
if base_datos==1      %% IgG1 pura para ajuste de parámetros
    Co      = 0.15;    % Concentración inicial de proteína (mg/mL). Se
considera 98% de pureza.
    cv      = 10;      % Largo del gradiente de sal (mL).
    F       = 1;       % Flujo volumétrico de la fase móvil (mL/min).
    vm      = 0.1;     % Volumen de inyección de la muestra (mL).
    vlavado = 5;       % Volumen de lavado (mL).
    pHi     = 7;       % pH inicial.
elseif base_datos==2  %% IgG2a pura para ajuste de parámetros
    Co      = 0.15;    % Concentración inicial de proteína (mg/mL). Se
considera 98% de pureza.
    cv      = 10;      % Largo del gradiente de sal (mL).
    F       = 1;       % Flujo volumétrico de la fase móvil (mL/min).
    vm      = 0.1;     % Volumen de inyección de la muestra (mL).
    vlavado = 5;       % Volumen de lavado (mL).
    pHi     = 7;       % pH inicial.
elseif base_datos==3  %% IgG2b pura para ajuste de parámetros
    Co      = 0.15;    % Concentración inicial de proteína (mg/mL). Se
considera 98% de pureza.
    cv      = 10;      % Largo del gradiente de sal (mL).
    F       = 1;       % Flujo volumétrico de la fase móvil (mL/min).
    vm      = 0.1;     % Volumen de inyección de la muestra (mL).
    vlavado = 5;       % Volumen de lavado (mL).
    pHi     = 7;       % pH inicial.
elseif base_datos==4
    Co      = [0.008 0.008];
    cv      = 20;
    F       = 1;
    vm      = 0.5;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7;      % pH
inicial.
elseif base_datos==5
    Co      = [0.017 0.013];
    cv      = 20;
    F       = 1;
    vm      = 0.2;
    vlavado = 5;
    pHi     = 6.97;    % pH
inicial.
elseif base_datos==6
    Co      = [0.09 0.13];
    cv      = 10;
    F       = 1.3;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7.12;    % pH
inicial.

```

```

elseif base_datos==7
    Co      = [0.09 0.09];
    cv      = 10;
    F       = 0.7;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7.13;          % pH
inicial.
elseif base_datos==8
    Co      = [0.05 0.064];
    cv      = 10;
    F       = 1;
    vm      = 0.2;
    vlavado = 5;
    pHi     = 6.96;          % pH
inicial.
elseif base_datos==9
    Co      = [.065 0.065 0.065];
    cv      = 10;
    F       = 1;
    vm      = 0.2;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7;             % pH
inicial.
elseif base_datos==10
    Co      = 0.11*[1 1 1];
    cv      = 20;
    F       = 1;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7;             % pH
inicial.
elseif base_datos==11
    Co      = [0.08/5 0.08/5];
    cv      = 20;
    F       = 1;
    vm      = 0.5;
    vlavado = 5;
    pHi     = 6.98;          % pH
inicial.
elseif base_datos==12
    Co      = [0.02/5 0.028/5];
    cv      = 13;
    F       = 1;
    vm      = 0.5;
    vlavado = 5;
    pHi     = 6.86;          % pH
inicial.
elseif base_datos==13
    Co      = [0.033 0.028];
    cv      = 20;
    F       = 1;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 6.98;          % pH
inicial.
elseif base_datos==14
    Co      = 0.15;
    cv      = 10;
    F       = 1;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7;
elseif base_datos==15
    Co      = 0.15;
    cv      = 10;
    F       = 1;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7;
elseif base_datos==16
    Co      = 0.15;
    cv      = 10;
    F       = 1;
    vm      = 0.1;
    vlavado = 5;
    pHi     = 7;
end

```

6.7.1.6 PAR_CINETICOS.M

Esta función entrega los parámetros cinéticos de la mezcla o de las proteínas puras.

Para el sistema con elución con sal.

```

function [Dd beta
alfa]=par_cineticos(BSA,Hb)

global N

Dd  = zeros(1,N);
beta = zeros(1,N);
alfa = zeros(1,N);
i = 1;
if BSA==1 %
    Dd(i)  = 0.437;
    beta(i) = 13.77;
    alfa(i) = 8.20;
    i      = i+1;
end
if Hb==1 %
    Dd(i)  = 0.205;
    beta(i) = 20.01;
    alfa(i) = 5.98;
end

```


Para el sistema con elución con pH.

```
function [Dd beta alfa]=par_cineticos(IgG1,IgG2a,IgG2b)

global N
Dd = zeros(1,N);
beta = zeros(1,N);
alfa = zeros(1,N);

i = 1;
if IgG1==1 %
    Dd(i) = 2.3746;
    beta(i) = 2.1464;
    alfa(i) = 8.6726;
    i = i+1;
end
if IgG2a==1
    Dd(i) = 10.0668;
    beta(i) = 2.2818;
    alfa(i) = 8.4040;
    i = i+1;
end
if IgG2b==1
    Dd(i) = 0.7499;
    beta(i) = 3.8476;
    alfa(i) = 13.1718;
end
```

6.7.1.7 PARAMETROS.M

Esta función calcula los parámetros adimensionales del sistema, las matrices locales del método de diferencias finitas y entrega la condición inicial para cada intervalo en el que se resuelven el sistema de ecuaciones difernciales.

Para el sistema con elución con sal.

```
function [c_i]=parametros(BSA,Hb,base_datos)

global N Nz Nr M1 M1_I M2 M3 Bi Cosal Coi eta factor_tpo dz Pe Xi Cinf
tinyeccion tlavado telucion tfin t_fin Ep PM
%% Parámetros del algoritmo numérico
Ne = 5; % Número de elementos cuadráticos
Nz = 2*Ne+1;
Nr = 2; % Número de nodos de colocación interna
z = 1;
dz = 2*(z-0)/(Nz-1);
%% Parámetros de la matriz / columna
Cinf = 11/66000; % Capacidad máxima de la columna (M)
d = 0.5; % Diámetro de la columna (cm)
L = 5; % Largo de la columna (cm)
ttor = 6; % Factor de tortuosidad ()
Eb = 0.4; % Fracción de huecos de la columna ()
Rp = 0.0045; % Radio de la partícula de adsorbente (cm)
dporo = 300; % Diámetro de macroporo de la partícula de adsorbene (A)
Vloop = 0.28; % Volumen de las mangueras que conectan la columna al
equipo (mL)
%% Parámetros de la fase móvil
ro = 0.99823; % Densidad (g/cm^3)
mu = 0.01005; % Viscosidad (g/(cm*s))
%% Necesarios para determinación de Adimensionales
prop_proteinas(BSA,Hb);
[Co vlavado Cosal Cfsal cv F vm] = operacion(base_datos);
Vol_col = pi*(d^2/4)*L; % Volumen de la columna (cm^3)
v = 4*F/(pi*d^2*Eb); % Velocidad intersticial de la fase móvil
(cm/min)
%% Cálculo de números adimensionales
Re = 2*ro*(v/60)*Rp/mu; % Número de Reynolds ()
```

```

Dm          = 2.74*10^-5*PM.^(-1/3);           % Correlación para la
Difusividad molecular (cm^2/s)
dm          = 1.44*PM.^(1/3);                 % Correlación para el
diámetro de la molécula (A)
lambda      = dm./dporo;
Dp          = (Dm./ttor).*(1-2.104*lambda+2.09*lambda.^3-0.95*lambda.^5); %
Correlación para la Difusividad intrapartícula (cm^2/min)
k          = 0.687*(v/60)^(1/3)*(Eb*Rp./Dm).^(-2/3); % Correlación para el
coeficiente de transferencia de masa (cm/s)
Pe          = L/(2*Rp*Eb)*(0.2+0.011*Re^0.48); % Correlación para el número
de Peclet ()
eta         = Ep.*Dp*L./(Rp^2*(v/60));
Bi          = k*Rp./(Ep.*Dp);                 % Número de Biot para la
transferencia de masa ()
Xi          = 3*Bi.*eta*(1-Eb)/Eb;           % Constante adimensional
%% Factores para adimensionar variables temporales y de concentración
factor_tpo  = L/v;
Cop         = Co./PM;                       % Concentración inicial de proteínas (M)
Coi         = Cop;                          % La concentración máxima de proteínas equivale
a su concentración inicial
Coi(N+1)    = Cfsal;                       % La concentración máxima de la sal es la final
%% Adimensionamiento de variables temporales
tinyeccion  = (vm/F)/factor_tpo;            % Tiempo adimensional de inyección
t_igrad     = (vlavado+vm+Vloop+Vol_col)/F; % Tiempo en el que empieza el
gradiente
tlavado     = t_igrad/factor_tpo;           % Tiempo adimensional de lavado
(antes de inicio del gradiente)
tgrad       = cv*Vol_col/F;                 % Tiempo de duración del gradiente
telucion    = tgrad/factor_tpo;             % Tiempo adimensional de duración
del gradiente
tfin        = t_fin/factor_tpo;             % Tiempo adimensional al cual
termina la cromatografía
%% Condición inicial
% En la fase móvil
c_iprot     = zeros(1,N*Nz);                % Proteínas (Ci=0)
c_isal      = Cosal*ones(1,Nz);             % Sal (Ci=Cosal)
% En la fase líquida de la partícula
c_ipart_prot = zeros(1,N*Nz*Nr);
% En la fase sólida de la partícula
c_iad_prot  = zeros(1,N*Nz*Nr);            % Sólo la proteína se adsorbe
c_i         = [c_iprot c_isal c_ipart_prot c_iad_prot];
%% Matriz de Rigidez Fase Líquida
d=[];v1=[];v2=[];
% M1
d(1)        = 2/15;
d(Nz)       = 2/15;
for i=2:Nz-1
    if mod(i,2)==0
        d(i)    = 8/15;
        v2(i-1) = -1/30;
    else
        d(i)    = 4/15;
        v2(i-1) = 0;
    end
end
v1(1:Nz-1)  = 1/15;
M1          = diag(d,0)+diag(v1,1)+diag(v1,-1)+diag(v2,2)+diag(v2,-2);

```

```

M1          = sparse(M1);
M1_I        = inv(M1);
% M2
d(1)        = 7/3;
d(Nz)       = 7/3;
for i=2:Nz-1
    if mod(i,2)==0
        d(i)      = 16/3;
        v2(i-1)   = 1/3;
    else
        d(i)      = 14/3;
        v2(i-1)   = 0;
    end
end
v1(1:Nz-1)  = -8/3;
M2          = (diag(d,0)+diag(v1,1)+diag(v1,-1)+diag(v2,2)+diag(v2,-2))/dz^2;
M2          = sparse(M2);

%M3
d(1)        = -1/2;
d(Nz)       = 1/2;
for i=2:Nz-1
    if mod(i,2)==0
        d(i)      = 0;
        v2(i-1)   = 1/6;
    else
        d(i)      = 0;
        v2(i-1)   = 0;
    end
end
v1(1:Nz-1)  = 2/3;
M3          = (diag(d,0)+diag(v1,1)-diag(v1,-1)-diag(v2,2)+diag(v2,-2))/dz;
M3          = sparse(M3);

```

Para el sistema con elución con pH.

```

function [c_i]=parametros(IgG1,IgG2a,IgG2b,base_datos)

global N Nz Nr M1 M1_I M2 M3 Bi pHi Coi eta factor_tpo dz Pe Xi Cinf
tinyeccion tlavado telucion tfin t_fin Ep PM
%% Parámetros del algoritmo numérico
Ne          = 5;           % Número de elementos cuadráticos
Nz          = 2*Ne+1;
Nr          = 2;           % Número de nodos de colocación interna
z           = 1;
dz          = 2*(z-0)/(Nz-1);
%% Parámetros de la matriz / columna
Cinf        = 50/152000; % Capacidad máxima de la columna (M).
d           = 0.7;        % Diámetro de la columna (cm).
L           = 2.5;        % Largo de la columna (cm).
ttor        = 2;          % Factor de tortuosidad ().
Eb          = 0.4;        % Fracción de huecos de la columna ().
Rp          = 0.0045;      % Radio de la partícula de adsorbente (cm).
dporo       = 700;        % Diámetro de macroporo de la partícula de adsorbene
(A).
Vloop       = 0.1;        % Volumen de las mangueras que conectan la columna al
equipo (mL).

```

```

%% Parámetros de la fase móvil
ro      = 0.99823;    % Densidad (g/cm^3).
mu      = 0.01005;    % Viscosidad (g/(cm*s)).
%% Necesarios para determinación de Adimensionales
prop_proteinas(IgG1,IgG2a,IgG2b);
[Co vlavado pHi cv F vm]=operacion(base_datos);
Vol_col  = pi*(d^2/4)*L;    % Volumen de la columna (cm^3).
v        = 4*F/(pi*d^2*Eb);    % Velocidad intersticial de la fase móvil
(cm/min).
%% Cálculo de números adimensionales
Re      = 2*ro*(v/60)*Rp/mu;    % Número de Reynolds ().
Dm      = 2.74*10^-5*PM.^(-1/3);    % Correlación para la
Difusividad molecular (cm^2/s).
dm      = 1.44*PM.^(1/3);    % Correlación para el
diámetro de la molécula (A).
lambda  = dm./dporo;
Dp      = (Dm./ttor).*(1-2.104*lambda+2.09*lambda.^3-0.95*lambda.^5); %
Correlación para la Difusividad intrapartícula (cm^2/min).
k       = 0.687*(v/60)^(1/3)*(Eb*Rp./Dm).^(-2/3)    % Correlación para el
coeficiente de transferencia de masa (cm/s).

Pe      = L/(2*Rp*Eb)*(0.2+0.011*Re^0.48);    % Correlación para el número
de Peclet ().
eta     = Ep.*Dp*L/(Rp^2*(v/60));
Bi      = k*Rp./(Ep.*Dp);    % Número de Biot para la
transferencia de masa ().
Xi      = 3*Bi.*eta*(1-Eb)/Eb;    % Constante adimensional.
%% Factores para adimensionar variables temporales y de concentración
factor_tpo = L/v;
Cop     = Co./PM;    % Concentración inicial de proteínas (M)
Coi     = Cop;    % La concentración máxima de proteínas equivale a su
concentración inicial.
Coi(N+1) = pHi;    % La concentración máxima del pH es al inicio
%% Adimensionamiento de variables temporales
tinyeccion = (vm/F)/factor_tpo;    % Tiempo adimensional de inyección
t_igrad   = (vm+vlavado+Vloop+Vol_col)/F;    % Tiempo en el que empieza el
gradiente
tlavado   = t_igrad/factor_tpo;    % Tiempo adimensional de lavado
(antes de inicio del gradiente)
tgrad     = cv*Vol_col/F;    % Tiempo de duración del gradiente
telucion  = tgrad/factor_tpo;    % Tiempo adimensional de duración
del gradiente
tfin      = t_fin/factor_tpo;    % Tiempo adimensional al cual
termina la cromatografía
%% Condición inicial
% En la fase móvil
c_iprot   = zeros(1,N*Nz);    % Proteínas (Cinicial=0)
c_ipH     = ones(1,Nz);    % pH (Cinicial=pHA/pH0=1)
% En la fase líquida de la partícula
c_ipart_prot = zeros(1,N*Nz*Nr);
% En la fase sólida de la partícula
c_iad_prot = zeros(1,N*Nz*Nr);    % Sólo la proteína se adsorbe
c_i       = [c_iprot c_ipH c_ipart_prot c_iad_prot];
%% Matriz de Rigidez Fase Líquida
d=[];v1=[];v2=[];
% M1
d(1)      = 2/15;

```

```

d(Nz)      = 2/15;
for i=2:Nz-1
    if mod(i,2)==0
        d(i)      = 8/15;
        v2(i-1)   = -1/30;
    else
        d(i)      = 4/15;
        v2(i-1)   = 0;
    end
end
v1(1:Nz-1) = 1/15;
M1          = diag(d,0)+diag(v1,1)+diag(v1,-1)+diag(v2,2)+diag(v2,-2);
M1          = sparse(M1);
M1_I        = inv(M1);
%M2
d(1)        = 7/3;
d(Nz)       = 7/3;
for i=2:Nz-1
    if mod(i,2)==0
        d(i)      = 16/3;
        v2(i-1)   = 1/3;
    else
        d(i)      = 14/3;
        v2(i-1)   = 0;
    end
end
v1(1:Nz-1)  = -8/3;
M2          = (diag(d,0)+diag(v1,1)+diag(v1,-1)+diag(v2,2)+diag(v2,-2))/dz^2;
M2          = sparse(M2);

%M3
d(1)        = -1/2;
d(Nz)       = 1/2;
for i=2:Nz-1
    if mod(i,2)==0
        d(i)      = 0;
        v2(i-1)   = 1/6;
    else
        d(i)      = 0;
        v2(i-1)   = 0;
    end
end
v1(1:Nz-1)  = 2/3;
M3          = (diag(d,0)+diag(v1,1)-diag(v1,-1)-diag(v2,2)+diag(v2,-2))/dz;
M3          = sparse(M3);

```

6.7.1.8 PROP_PROTEINAS.M

Esta función entrega para cada proteína: Ep (porosidad de la partícula), PM (peso molecular) y K (factor de correlación cantidad:concentración de proteína).

Para el sistema con elución con sal.

```

function []=prop_proteinas(BSA,Hb)

global N Ep K PM

```

```

N      = BSA+Hb;          % Número
de proteínas. La sal es el componente N+1
Ep      = ones(1,N);
K       = ones(1,N);
PM      = ones(1,N);

i      = 1;
if (BSA==1)
    Ep(i) = 0.55;
    K(i)  = 0.0098;      %
    mg/(mAU*mL) para UV 280nm
    PM(i) = 66000;
    i     = i+1;
end
if (Hb==1)
    Ep(i) = 0.58;
    K(i)  = 0.0052;      %
    mg/(mAU*mL) para UV 280nm
    PM(i) = 64500;
end

```

Para el sistema con elución con pH.

```

function []=prop_proteinas(IgG1,IgG2a,IgG2b)

global N Ep K PM

N      = IgG1+IgG2a+IgG2b;
Ep      = ones(1,N);
K       = ones(1,N);
PM      = ones(1,N);

i      = 1;
if (IgG1==1)
    Ep(i) = 0.55;
    K(i)  = 0.003;      %
    mg/(mAU*mL)
    PM(i) = 150000;
    i     = i+1;
end
if (IgG2a==1)
    Ep(i) = 0.55;
    K(i)  = 0.0029;      %
    mg/(mAU*mL)
    PM(i) = 150000;
    i     = i+1;
end
if (IgG2b==1)
    Ep(i) = 0.55;
    K(i)  = 0.003;      %
    mg/(mAU*mL)
    PM(i) = 150000;
end

```

6.7.2 FUNCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS UTILIZANDO *FMINSEARCH*.

6.7.2.1 MIFUNCION.M

Esta función es análoga a *curva_calculada.m* salvo por pequeñas modificaciones en la obtención de los parámetros cinéticos. En este caso, *x* es el vector que contiene los parámetros cinéticos, a diferencia del caso anterior, en que se tenía una función que entregaba los parámetros de cada proteína. Aquí sólo se incluye la del pH, puesto que la de la sal tiene las mismas modificaciones.

```

function error=mifuncion(x)

global alfa beta Dd factor_tpo N Nz Coi tinyeccion tlavado telucion tfin PM K

base_datos=1; %IgG1
%% Datos experimentales
[datos IgG1 IgG2a IgG2b]=datos_experimentales(base_datos);
%% Parámetros cinéticos
Dd      = x(1);
beta    = x(2);
alfa    = x(3);
%eta    = param(4);
%% Condición inicial y propiedades de las proteínas (K y PM)

```

```

prop_proteinas(IgG1,IgG2a,IgG2b);
[c_i]=parametros(IgG1,IgG2a,IgG2b,base_datos);
%% Cálculo de la curva
ind=[];
for i=1:N+1
    ind(i)=i*Nz;%valores a la salida
end
options = odeset('RelTol',1e-5,'AbsTol',1e-6,'InitialStep',1e-5);
[tt1 c1] = ode15s('ecuaciones_diferenciales',[0 tinyeccion],c_i,options);
c_i      = c1(end,:);
[tt2 c2] =
ode15s('ecuaciones_diferenciales',[tinyeccion:0.5:tlavado],c_i,options);
c_i      = c2(end,:);
[tt3 c3] =
ode15s('ecuaciones_diferenciales',[tlavado:0.5:tlavado+telucion],c_i,options);
c_i      = c3(end,:);
[tt4 c4] =
ode15s('ecuaciones_diferenciales',[tlavado+telucion:0.5:tfin],c_i,options);
tta      = [tt1;tt2;tt3;tt4];
tt        = tta*factor_tpo;
cc        = [c1;c2;c3;c4];
datoscc   = tt;
%% Transformación a datos de concentración en mg/mL
for i=1:N
    datoscc = [datoscc cc(:,ind(i))*Coi(i)*PM(i)];
end
datoscc    = [datoscc cc(:,ind(N+1))];
%% Transformación de datos de concentración a absorbancia
filas = size(datoscc);
suma  = zeros(filas(1),1);
for i=1:N
    datoscc(:,i+1) = datoscc(:,i+1)/K(i);
    suma(:,1)      = suma(:,1)+datoscc(:,i+1);
end
datoscc(:,1) = datoscc(:,1);
datoscc(:,2) = suma(:,1);
datoscc(:,3) = datoscc(:,N+2);
datoscc      = datoscc(:,1:3);
%% error punto a punto
error_punto  = 0;
for i=1:length(tt)
    [a1,b1]    = min(abs(tt(i)-datos(:,1)));
    error_punto = error_punto + ((datoscc(i,2)-datos(b1,2)))^2;
end
error=error_punto;
end

```

6.7.2.2 ENCONTRAR.M

Este script crea una matriz C donde se encuentra la función mifuncion.m evaluada en puntos entre 1 y 37 equiespaciados en 4, para encontrar el punto necesario por *fminsearch* para encontrar los parámetros cinéticos. En el caso de la relación de elución lineal, se evaluó en puntos entre 1 y 10 equiespaciados en 1.

```

tic
clear all;close all; clc;
n=37;

```

```

espacio = 4;
%% Creo el arreglo con valores iguales a 1000
for k=1:n
    error(:,:,k)=10^3*ones(n);
end
%% Calculo el error en cada punto del arreglo
for i=1:espacio:n
    for j=1:espacio:n
        for k=1:espacio:n
            error(i,j,k)=mifuncion([i j k]);
        end
    end
end
%% Ordeno el arreglo en una matriz i,j (con k columnas j)
C=[];
for k=1:n
    C=[C error(:,:,k)];
end
%% Busco el mínimo i,j de la matriz C
minC = min(min(C)); %mínimo de los error
[minC_i minC_j] = find(error==minC); %posición del min error en la matriz
error
%% Da es i; alfa es k; beta es j.
Da = minC_i
aux = round(minC_j/n)-minC_j/n;
if aux<0
    alfa = round(minC_j/n)+1
else
    alfa = round(minC_j/n)
end
beta = minC_j-(alfa-1)*n
minC
save C.txt C -ascii -double -tabs
toc

```

6.7.2.3 MINSEARCH.M

Este script calcula los parámetros cinéticos utilizando *fminsearch*.

```

clear all; close all; clc;
tic
param=[4 2 8.9]; %IgG2a
[x,fval]=fminsearch(@(x)mifuncion(x),param)
toc

```


Extension of the selection of protein chromatography and the rate model to affinity chromatography[†]

G. Sandoval^a, C. Shene^b, B. A. Andrews^a and J. A. Asenjo^{a*}

The rational selection of optimal protein purification sequences, as well as mathematical models that simulate and allow optimization of chromatographic protein purification processes have been developed for purification procedures such as ion-exchange, hydrophobic interaction and gel filtration chromatography. This paper investigates the extension of such analysis to affinity chromatography both in the selection of chromatographic processes and in the use of the rate model for mathematical modelling and simulation. Two affinity systems were used: Blue Sepharose and Protein A. The extension of the theory developed previously for ion-exchange and HIC chromatography to affinity separations is analyzed in this paper. For the selection of operations two algorithms are used. In the first, the value of η , which corresponds to the efficiency (resolution) of the actual chromatography and, Σ , which determines the amount of a particular contaminant eliminated after each separation step, which determines the purity, have to be determined. It was found that the value of both these parameters is not generic for affinity separations but will depend on the type of affinity system used and will have to be determined on a case by case basis. With Blue Sepharose a salt gradient was used and with Protein A, a pH gradient. Parameters were determined with individual proteins and simulations of the protein mixtures were done. This approach allows investigation of chromatographic protein purification in a holistic manner that includes ion-exchange, HIC, gel filtration and affinity separations for the first time. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: rational selection; affinity chromatography; mathematical; modelling

INTRODUCTION

Over the past years, we have developed a computer based expert system based on proteomic data of proteins for the rational selection of optimal protein purification sequences (Asenjo and Andrews, 2004), as well as mathematical models that simulate and allow optimization of chromatographic protein purification processes (Shene *et al.*, 2006). So far these systems have mainly considered more generic purification procedures such as ion-exchange, hydrophobic interaction and gel filtration chromatography. This paper investigates the extension of such analysis to affinity chromatography both in the selection of chromatographic processes and in the mathematical modelling and simulation of chromatographic performance.

Expert system on proteomic data for the selection of protein purification

A clear rationale for the selection of high-resolution purification operations has been previously developed (Asenjo and Andrews, 2004). It characterizes the ability of the separation operation to separate one protein from another by using the theoretical concept of separation coefficients (SC) (Asenjo, 1990; Leser and Asenjo, 1992). It uses a relationship between the separation coefficient ($SC = DF \times \eta$) and the variables that determine the performance in a separation process: the deviation factor (DF) for differences among physicochemical properties and the efficiency (η) of the process. The DF was defined as the difference in a particular physico-chemical property (such as molecular weight, charge or hydrophobicity) between two proteins, which

correspond to the target protein and the particular contaminant protein being considered (Asenjo and Andrews, 2004). To include the rule-of-thumb that reflects the logic of first separating impurities present in higher concentrations, a relative contaminant protein concentration (θ), and the selection separation coefficient (SSC) is defined as the product of the SC and this relative concentration ($SSC = SC \times \theta = DF \times \eta\theta$). The relationship between the SC and resolution and efficiency has been described in detail previously (Asenjo and Andrews, 2004).

Two basic algorithms were developed in order to choose the optimal sequence of operations to use in a protein purification process. In the first algorithm the SSC between the target protein and each of the main contaminant proteins for each of the physico-chemical properties is calculated and the values of all the

* Correspondence to: J. A. Asenjo, Centre for Biochemical Engineering and Biotechnology, Institute for Cell Dynamics and Biotechnology: a Centre for Systems Biology, University of Chile, Beauchef 850, Santiago, Chile
E-mail: juasenjo@ing.uchile.cl

a G. Sandoval, B. A. Andrews, J. A. Asenjo
Centre for Biochemical Engineering and Biotechnology, Institute for Cell Dynamics and Biotechnology: a Centre for Systems Biology, University of Chile, Beauchef 850, Santiago, Chile

b C. Shene
Department of Chemical Engineering, University of La Frontera, Temuco, Chile

[†] This article is published in *Journal of Molecular Recognition* as a special issue on Affinity 2009, edited by Gideon Fleminger, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel and George Ehrlich, Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, USA.

SSCs is ordered in decreasing order. The operation and conditions that give the largest value of SSC is then chosen as the first separation (chromatography) to use.

A second algorithm was developed to modify the protein concentrations in the database of contaminants of those that have either been totally eliminated or diminished after the first separation process is performed. The amount of a protein contaminant eliminated after a chromatographic step was carried out by simplifying the shape of the chromatographic peaks to a narrow triangle (Asenjo and Andrews, 2004). A variable, Σ , corresponds to the peak width and has been experimentally determined (Lienqueo *et al.*, 1996) and it was found that under the conditions normally used for protein purification, the value of Σ is virtually independent of protein concentration.

Affinity chromatography was not considered in any rational manner as part of the heuristics of this process. It was assumed that if this technique is chosen by the user all contaminants will be reduced by a fixed percentage (e.g. 90%) in the affinity separation step (Leser, 1996). However, since affinity chromatography will have to be analyzed on a case by case basis, given the nature of the different ligands that can be used (e.g. metal ions in IMAC, dye or other) it was not included in the Expert System.

Mathematical modelling to simulate chromatography

Once the type of chromatography is chosen, optimization of the operating conditions is essential. In chromatography, protein adsorption depends on composition and concentration of the mixture and also on operational conditions such as flow rate, ionic strength gradient, sample load, physical properties of the adsorbent matrix and column dimensions. Mathematical models for describing a chromatographic separation have been discussed previously (Shene *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2009). Two such models are the plate model and the more fundamentally based rate model.

The plate model is based on the plate theory. The model assumes that the chromatographic column is formed by a number of plates (N_p) each of them having the same ratio between the stationary phase volume and the volume of the mobile phase (H). For a defined column geometry and if the adsorption kinetics is known the problem is reduced to solve the system of N_p ordinary differential equations (ODE). In order to solve this ODE system the ionic strength at each plate ($i = 1 \dots N_p$) has to be computed as a function of time.

In the more fundamentally based rate model the dimensionless elution curves are obtained from the solution of a partial differential equation (PDE) subject to the initial and boundary conditions. In order to solve the PDE the dimensionless concentration profile for each component in the liquid phase contained inside the particles, c_p , has to be computed. These concentration profiles are obtained from the solution of another PDE also subject to initial and boundary conditions.

Since all mass transfer phenomena are taken into account in the PDEs, rate models can be used for testing different chromatographic conditions (Gu, 1995; Lazo, 1999).

The rate model has recently been applied to very high protein concentrations (up to ca. 40 g/L) such as those found in many practical and large-scale industrial applications. (Orellana *et al.*, 2009). With pure proteins at high concentrations the model could simulate changes in flow rate, ionic strength, salt gradient and separation time. When protein mixtures at high concentrations

were simulated some of the kinetic parameters of the individual proteins had to be modified to take into account protein–protein interactions, competition and displacement. In this way the model allowed prediction of the behaviour of the elution curves as a function of flow rate, ionic strength and salt gradient with a relative error below 5%. Li *et al.* (2004), developed a similar model for dye–ligand affinity chromatography using a binary adsorption isotherm.

A mathematical function was built that included parameters to optimize protein production as well as the effects of chromatography performance such as yield, purity, concentration and the time needed to accomplish the separation (Shene *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2009). Operational conditions in the chromatography such as flow rate, ionic strength gradient and the operational time can be selected using the model to optimize the protein production process depending on the characteristics of the final product such as purity and yield. This mathematical function was successfully used for the selection of the operational conditions as well as the fraction of the product to be collected (peak cutting) in a chromatographic operation.

The aim of this paper is to investigate the extension of such successful analyses to affinity chromatography both in the selection of chromatographic processes and in the mathematical modelling and simulation of chromatographic performance.

MATERIALS AND METHODS

The high-performance liquid chromatography system employed consisted of a fast protein liquid chromatography (FPLC) System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) equipped with a 100 and 500 μ L injection loop. The chromatographic columns were a Blue Sepharose CL-6B matrix (Sigma R9903) packed into a 5/5 column HR (5 cm length, 0.5 cm diameter, Pharmacia Biotech) and a HiTrap rProtein A FF (1 mL, GE Healthcare 17-5079-02). The experiments were performed at room temperature, using flow-rates equal to 0.1 mL/min for the dye–ligand experiments and 1 and 3 mL/min for the Protein A affinity experiments.

For the dye–ligand affinity chromatography two proteins were used: haemoglobin (Hb) from rabbit (Sigma H7255) and albumin from bovine serum albumin (BSA, Sigma A7030) in a buffer 10 mM Tris–HCl containing 0.05 M NaCl (pH 7.5). To elute components retained in the column, a linear gradient of salt concentration was created using a buffer 10 mM Tris–HCl containing 1 M NaCl at pH 7.5. The gradient molarity was estimated from the conductivity of the solution. The elution curve of Hb as a function of time was directly obtained from the measurements of absorbance at 405 nm of the outlet flow, while the elution curve of BSA was obtained from the measurements of absorbance at 280 nm by subtracting the contribution of Hb at that wavelength.

For the Protein A affinity chromatography three proteins, with different affinity for the Protein A were used: Mouse IgG1 (Sigma M5284), Mouse IgG2a (Sigma M5409) and Mouse IgG2b (Sigma M5534) in a buffer 20 mM sodium phosphate at pH 7.0. A pH linear gradient was created for the elution of the retained components using a buffer 0.1 M sodium citrate at pH 3.0. The pH gradient was directly measured with a pH electrode and the elution curves were obtained from the measurements of the absorbance at 280 nm of the outlet flow as a function of time.

In order to adjust the adsorption kinetic parameters and to transform the absorbance measurements into concentration

Table 1. Operating conditions for pure proteins used in the experimental runs

	Dye-ligand	Protein A
Flow (mL/min)	0.1	1
Injection volume (μL)	500	100
Protein Concentration (mg/mL)	1	0.15
Length of the linear gradient (CV)	5.5	10

values, experiments for pure proteins were carried out for both chromatographic systems using the conditions shown in Table 1.

MATHEMATICAL MODEL FOR AFFINITY

The general rate model is based on mass balances and mass transfer phenomena that take place in affinity chromatography. This was formulated with the same assumptions made in the ion-exchange chromatography, IEC, model (Shene *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2009), i.e. $t = 0$ corresponds to the moment at which the sample is pumped to the column, radial dispersion effects for components in the mobile phase are null, and adsorbent particles (particles from now on) are assumed spheres of uniform radii (R_p). In the present model it was assumed that properties of the stagnant phase (ionic strength and pH) inside the adsorbent particles are those of the mobile phase that surround them (no gradients).

In the column, protein in the mobile phase moves due to dispersion and convective flow; it is also transported inside the particles. Because at different axial positions protein concentration at the surface of particles is different, solution of the mass balance equation for the protein in the mobile phase must be coupled to the solution of mass balance applied to the particles. These two mass balances are given by PDEs because of the position and time dependent nature of the chromatographic process. Rate models for IEC, hydrophobic interaction chromatography and gel permeation chromatography are given by the same equations. For the first two processes differences are found in the adsorption kinetics or the relationship between adsorption rate constants and properties of the mobile phase.

Proteins are adsorbed onto the attached ligand according to a reversible reaction with rate constants for the adsorption and desorption kinetics equal to k_{ai} and k_{di} , respectively:



Adsorption rate depends on the concentration of available sites for adsorption (L_a); this concentration is given by the difference between adsorption capacity (C^∞) and the sites occupied by adsorbed proteins ($\sum_{i=1}^N C_i^*$). Accordingly, changes in concentration of adsorbed proteins (C_i^*) are given by,

$$\frac{\partial C_i^*}{\partial t} = k_{ai} C_i \left(C_i^\infty - \sum_{i=1}^N C_i^* \right) - k_{di} C_i^* \quad (2)$$

At steady state, the relationship in (2) reduces to the Langmuir isotherm for multicomponents. Our model assumes that properties of the mobile phase (C_{N+1}) affect the desorption rate

constant and its contribution is to model this effect through simple relationships (Eqs. 3a and b):

$$\text{For pH gradient : } k_{di} = \alpha'_i e^{\beta'_i (C_0/C_{N+1, \max} - C_0/C_{N+1, \max})} \quad (3a)$$

$$\text{For ionic strength gradient : } k_{di} = \alpha'_i e^{\beta'_i (C_{N+1}/C_{N+1, \max} - C_0/C_{N+1, \max})} \quad (3b)$$

Parameters α'_i and β'_i for each protein depend on the protein-adsorbent affinity and the conditions used for the elution (pH or ionic strength). C_0 is the initial ionic strength or pH of the mobile phase. The relationships proposed for the desorption rate constant permit an important increase once the ionic strength or pH in the mobile phase reaches the value at which protein affinity to the adsorbent is reduced.

The following equations in the model (4–7) are the same as those found in the IEC rate model (Shene *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2009). The PDE for each protein ($i = 1 \dots M$) in the mobile phase corresponds to:

$$-D_{bi} \frac{\partial^2 C_{bi}}{\partial Z^2} + v \frac{\partial C_{bi}}{\partial Z} + \frac{\partial C_{bi}}{\partial t} + \frac{3k_i(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b R_p} (C_{bi} - C_{pi, R=R_p}) = 0 \quad (4)$$

In this PDE, the first and second terms represent transport of protein i by axial dispersion and convective flow, respectively, where D_{bi} is the dispersive coefficient and v velocity of the mobile phase through the bed. The fourth term in the PDE in relationship (4) is the mass transfer flux from the mobile phase to the particle surface, in which k_i is the mass transfer coefficient, and ε_b the bed porosity. For ionic strength and pH ($i = N+1$) the fourth term in this PDE was not considered due to the assumption of no gradient inside the particle for these components. At the column inlet ($Z = 0$), protein dispersion flux equals the input mass flux, thus:

$$D_{bi} \frac{\partial C_{bi}(t, 0)}{\partial Z} = v [C_{bi}(t, 0) - C_{Fi}(t)] \quad (5)$$

At the column outlet ($Z = L$), protein dispersion flux is null ($D_{bi}(\partial C_{bi}/\partial Z) = 0$).

The following PDE represents the mass balance for a protein in the stagnant phase inside a particle:

$$\frac{\partial C_{pi}^*}{\partial t} + \varepsilon_p \frac{\partial C_{pi}}{\partial t} - \varepsilon_p D_{pi} \left[\frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} \right) \right] = 0 \quad (6)$$

The third term represents protein diffusion through the stagnant fluid phase that could become adsorbed onto the particle surface or desorbed from it depending on the properties of the fluid phase (first term). At the centre of the particle ($R = 0$) symmetry conditions hold ($(\partial C_{pi}/\partial R) = 0$). The changes in the mobile phase and those taking place inside the particles are related because the diffusional flux to the particle and the mass transfer flux from the mobile phase must be equal, thus,

$$\varepsilon_p D_{pi} \frac{\partial C_{pi}(t, R_p, Z)}{\partial R} = k_i [C_{bi}(t, Z) - C_{pi}(t, R_p, Z)] \quad (7)$$

In solving PDEs the computations can almost always be simplified by the use of dimensionless variables. By using the dimensionless variables $c_{bi} = C_{bi}/C_{oi}$, $c_i^* = C_i^*/C_{oi}$, $\tau = tv/L$, $r = R/R_p$, $z = Z/L$, coefficients in the PDEs in (4) and (6) are given in terms of the following dimensionless numbers, Peclet number ($Pe_i = vL/D_{bi}$), Biot number ($Bi_i = K_i R_p / [\varepsilon_p D_{pi}]$), $\pi \varepsilon_p D_{pi} L / (R_p^2 v)$, $\xi_i = 3Bi_i \pi (1 - \varepsilon_b) / \varepsilon_b$, and Damköhler numbers for adsorption $Da_i^a = L \times k_{ai} C_{oi} / v$ and, desorption $Da_i^d = L \times k_{di} / v$.

Dimensionless model equation for the components of the mobile phase are,

$$\text{Proteins : } -\frac{1}{\text{Pe}_{Li}} \frac{\partial^2 c_{bi}}{\partial z^2} + \frac{\partial c_{bi}}{\partial z} + \frac{\partial c_{bi}}{\partial \tau} + \xi_i(c_{bi} - c_{pi,r=1}) = 0 \quad (8a)$$

$$\text{Ionic strength or pH : } -\frac{1}{\text{Pe}_{Li}} \frac{\partial^2 c_{bN+1}}{\partial z^2} + \frac{\partial c_{bN+1}}{\partial z} + \frac{\partial c_{bN+1}}{\partial \tau} = 0 \quad (8b)$$

For the proteins in the particles,

$$(1 - \varepsilon_p) \frac{\partial c_i^*}{\partial \tau} + \varepsilon_p \frac{\partial c_{pi}}{\partial \tau} - \pi \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_{pi}}{\partial r} \right) \right] = 0 \quad (9)$$

For the adsorption kinetics

$$\frac{\partial c_i^*}{\partial \tau} = \text{Da}_i^a c_{pi} (c_i^\infty - c_i^*) - \text{Da}_i^d c_i^* \quad (10)$$

with, $\text{Da}_i^d = \alpha_i e^{\beta_i(c_{0,N+1} - c_{N+1})}$ and $\text{Da}_i^a = \alpha_i e^{\beta_i(c_{N+1} - c_{0,N+1})}$ when a pH gradient or ionic strength gradient is used for protein elution, respectively. The dimensionless boundary conditions in (5) and (7) are given by:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_{bi}(\tau, 0)}{\partial z} &= \text{Pe}_{Li} \left[c_{bi}(\tau, 0) - \frac{C_{Fi}(\tau)}{C_{0i}} \right] \\ \frac{\partial c_{pi}(\tau, 1, z)}{\partial r} &= \text{Bi}_i [c_{bi}(\tau, z) - c_{pi}(\tau, z, 1)] \end{aligned} \quad (11)$$

Protein concentration in the mobile phase that enters the column (C_F) is given by:

$$\frac{C_{F,i}(\tau)}{C_{0i}} = \begin{cases} 1 & 0 \leq \tau \leq \tau_1 \\ 0 & \tau > \tau_1 \end{cases} \quad i = 1 \dots N_p \quad (12)$$

where τ_1 is the dimensionless time it takes to pump the sample. Changes in pH or ionic strength of the mobile phase are given by:

$$\frac{C_{F,N+1}(\tau)}{C_{0,N+1}} = \begin{cases} 0 & 0 \leq \tau \leq \tau_{\text{wash}} \\ a + b(\tau - \tau_{\text{wash}}) & \tau_{\text{wash}} < \tau \leq \tau_{\text{elution}} \\ c & \tau > \tau_{\text{elution}} \end{cases} \quad (13)$$

During the interval $[\tau_1, \tau_{\text{wash}}]$ the nonadsorbed components retained inside the adsorbent particles, are eluted; after this and during $[\tau_{\text{wash}}, \tau_{\text{elution}}]$ elution pH or ionic strength change according to the gradient steepness b .

The model was solved numerically using Matlab. The finite element (with quadratic elements) and the orthogonal collocation methods were used to discretize the partial bulk-phase and particle-phase differential equations, respectively. The resulting ODE system was solved using ode15s routine in Matlab. Simulations were carried out on a personal computer with Windows 2000 operating system. Ten quadratic elements were used for discretizing the axial dimension and two for the radial dimension. Three parameters in the model equations for proteins (Pe , Bi , π) were calculated and three (Da^a , α and β) were estimated from experimental elution curves; Pe number for the ionic strength and pH were estimated separately from experimental curves. A genetic algorithm code (Carroll, 2009) was implemented in Matlab and was used to fit parameters in order to minimize the sum of squared differences between experimental and computed values of protein concentrations and pH or ionic strength. Estimated parameters for single protein were used to simulate elution curves of single proteins at conditions different from those used for parameter estimation and also to simulate the elution curve of protein mixtures.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of operation

The rationale for selection of high-resolution purification is based both on the differences in the physico-chemical property of the proteins (product and contaminant) being exploited in that particular chromatography (DF) and on the efficiency of the actual chromatography (η). In order to include affinity to a particular ligand in the already well-developed database of molecular weight, charge at different values of the pH and hydrophobicity we have tested two relatively standard affinity ligands which are Blue Sepharose and Protein A. In the same way the efficiency η , was characterized previously for ion-exchange, gel filtration and HIC (Asenjo and Andrews, 2004) this was done for these two ligands. Typical chromatograms are shown in Figure 1 for Blue Sepharose and in Figure 2 for Protein A. The values of the efficiency obtained are shown in Table 2 together with those previously obtained for ion-exchange, HIC and Gel Filtration. This parameter is essential for the application of the first algorithm of the methodology as has been explained in the introduction. In the affinity chromatography carried out with Blue Sepharose values close to 0.7 were found for the value of the efficiency whereas for Protein A, values in the range 0.9–1.0 were found. Hence the values obtained depend on the type of affinity system used and cannot really be considered as more 'generic' as

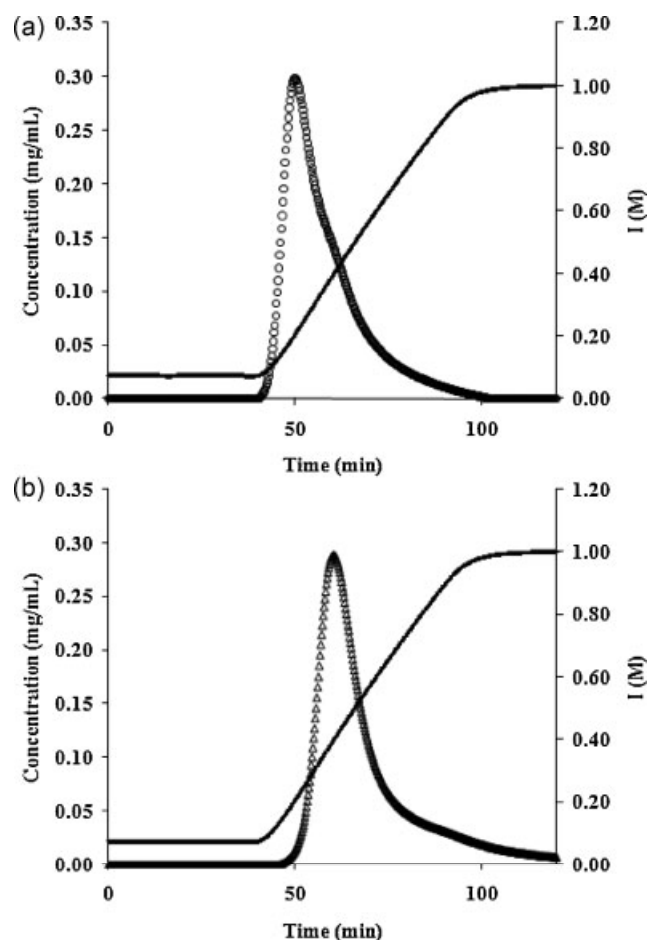


Figure 1. Typical chromatograms with Blue Sepharose with linear gradient of salt. (a) Hb and (b) BSA.

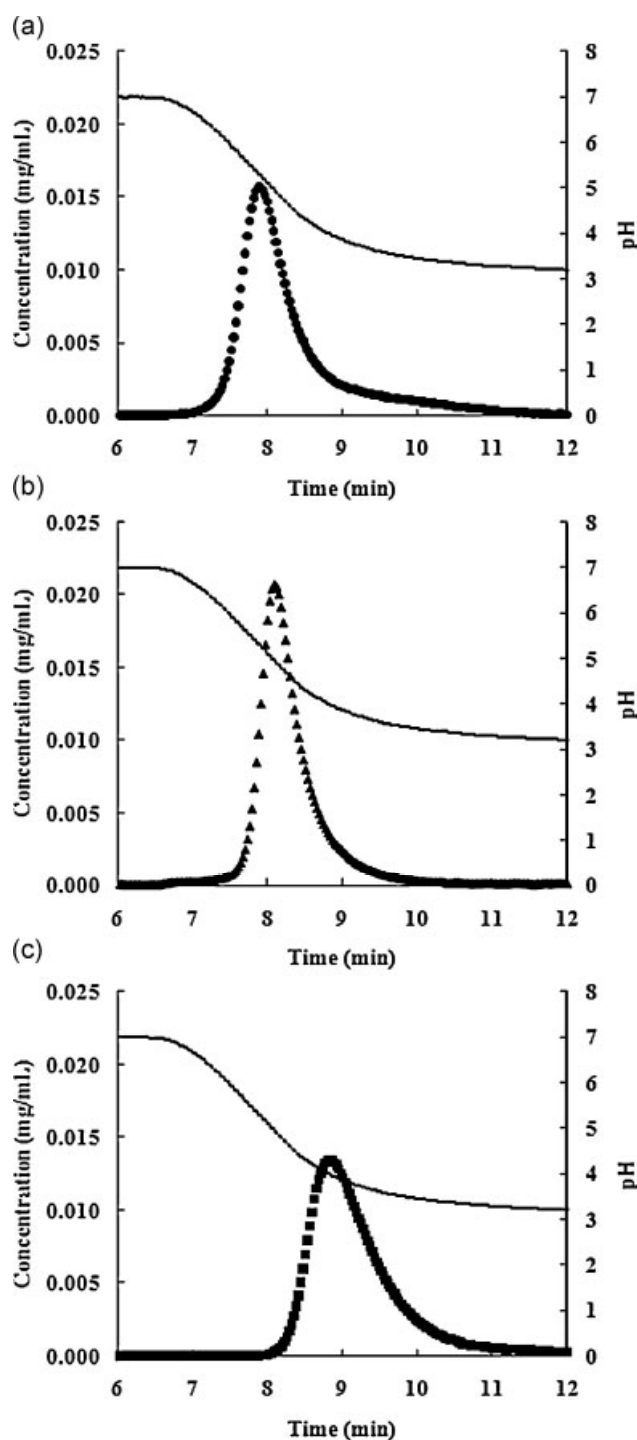


Figure 2. Typical chromatograms of IgG's with Protein A as ligand and a linear pH gradient. (a) IgG1, (b) IgG2a and (c) IgG2b.

was the case for ion exchange, HIC and gel filtration. For Protein A, even though the pH gradient cannot be as closely controlled to the desired linear behaviour as the salt gradient as can be clearly observed in Figures 1 and 2, the resolution obtained (η) is higher (0.9–1.0) than for Blue Sepharose (0.7). Hence, contrary to common belief, the high affinity Protein A matrix gave resolutions close to ion-exchange chromatography but not higher, and Blue Sepharose gave resolutions clearly lower than ion-exchange and even somewhat lower than HIC.

Table 2. Efficiency (η) obtained in this work for affinity chromatography compared with previous work

Chromatography	Efficiency (η)
Ion-exchange	1.00
Affinity: Blue Sepharose and Protein A	0.70–1.00
Hydrophobic interaction	0.86
Gel filtration	0.66

The second algorithm calculates and modifies how much of each of the protein contaminants is eliminated in each separation step. This is done by approximating the peaks to narrow triangles and the parameter Σ has to be found which corresponds to the width of the triangle at the base (Asenjo and Andrews, 2004).

This was done for both affinity ligands and the values of Σ obtained are shown in Table 3. Similarly to the determination of η , the value obtained for Σ depends on the type of affinity system used and would therefore have to be determined on a case by case basis for the specific type of affinity system used. Similarly to the calculation of the efficiency (η), the value obtained for the peak width (Σ) is much narrower for Protein A (0.22) than for Blue Sepharose (0.31) giving a higher resolution for Protein A. In this case the value of Σ for Protein A was not as narrow as for ion-exchange (Table 3) but similar to HIC, whereas the value for Blue Sepharose (dye–ligand) was between that obtained previously for HIC and gel filtration.

Modelling and simulating affinity

As described in the Materials and Methods Section and in the Mathematical Modelling Section, the two standard affinity ligands, Blue Sepharose and Protein A were investigated in order to assess the fitting and simulation of the mathematical model to the behaviour of specific proteins in these two materials, particularly since the elution strategy of the first one uses a salt gradient and the elution strategy of the second one uses a pH gradient or a pH step.

Blue Sepharose and salt gradient

Elution curves of BSA and Hb which have different affinities to Blue Sepharose are shown in Figure 1. These experimental curves were used for parameter estimation and the results are presented

Table 3. Values of dimensionless peak width (Σ) obtained in this work for affinity chromatography compared with previous work

Chromatography		Dimensionless peak width (Σ)
Affinity (this paper)	Dye-ligand (blue Seph.)	0.31
	Protein A	0.22
Ion-exchange		0.15
Hydrophobic Interaction		0.22
Gel filtration		0.46

Table 4. Parameters in the rate model used for simulating elution curves by salt gradient using Blue Sepharose

Component	F (mL/min)	C_0 (mg/mL)	V_m (mL)	Grad (CV)	D_a	β	α	Pe	Bi	π
BSA	0.1	1	0.5	5.5	25.02	1.7609	104.11	395.26	39.45	0.1068
Hb	0.1	1	0.5	5.5	66.72	1.2810	147.51	395.26	37.15	0.2555
Salt		0.05						395.26	10.45	23.743

in Table 4. Simulated curves are also shown in Figure 3. The Pe, Bi and π were parameters calculated and α , β and D_a were fitted for each protein as shown in Figure 3. The values estimated for the parameters were used for simulating the elution curve of the

two protein mixture as shown in Figure 4a. Figure 4b shows a simulation and experimental results using a different salt gradient. The Hb peak in the model shows virtually no displacement in the elution time whereas the BSA peak shows

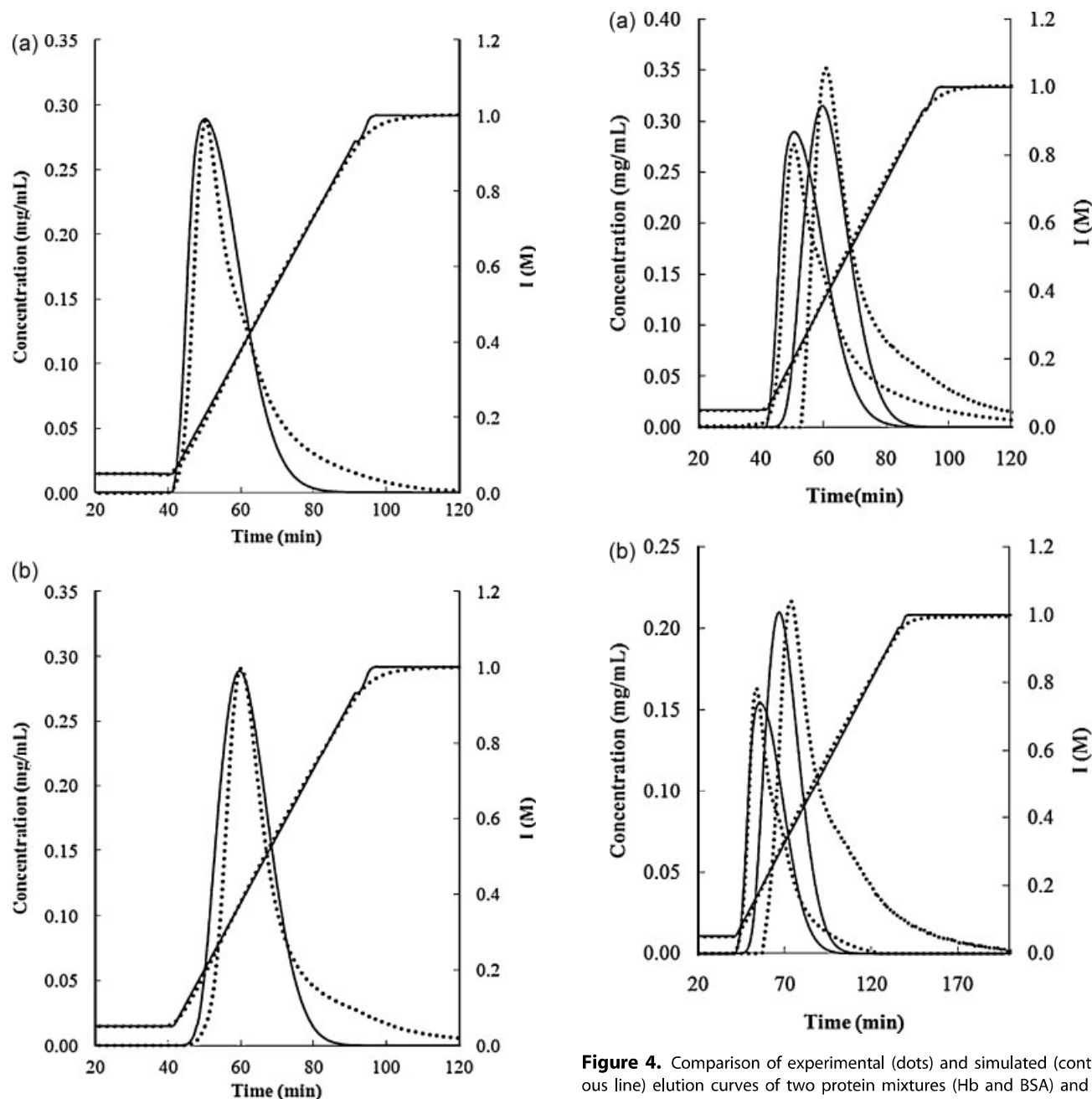


Figure 3. Comparison of experimental (dots) and simulated (continuous line) elution curves of (a) Hb and (b) BSA and salt gradient. Experimental data used for parameter estimation.

Figure 4. Comparison of experimental (dots) and simulated (continuous line) elution curves of two protein mixtures (Hb and BSA) and salt gradient, (a) concentration of both proteins 1 mg/mL, volume of the injection sample 500 μ L, flow rate 0.1 mL/min and gradient length 5.5 CV, (b) concentration of each protein 1 mg/mL, volume of the injection sample 500 μ L, flow rate 0.1 mL/min and gradient length 10 CV.

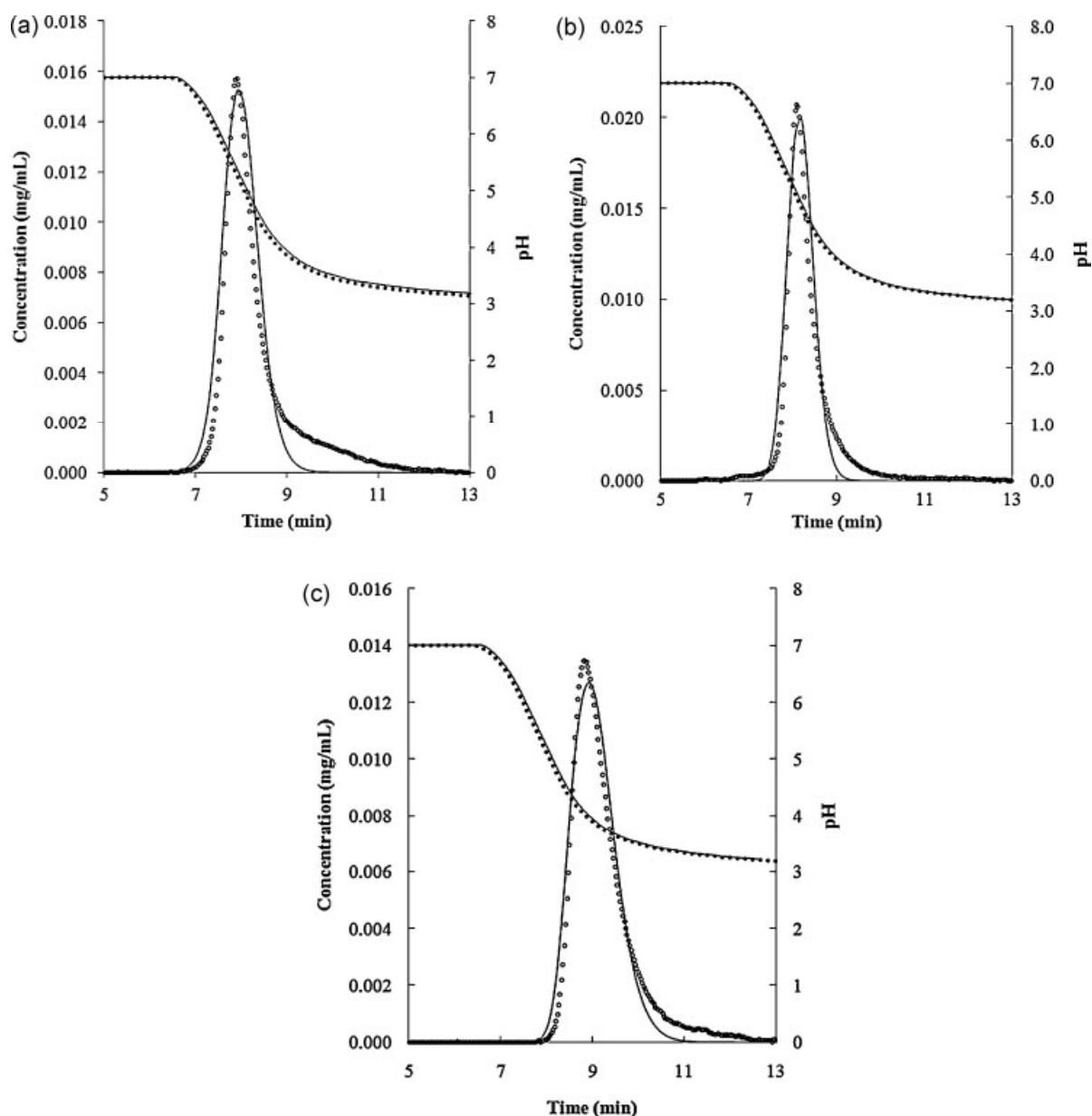


Figure 5. Comparison of experimental (dots) and simulated (continuous line) elution curves of (a) IgG1, (b) IgG2a, (c) IgG2b and pH gradient. Experimental data were used for parameter estimation.

an 8% displacement in Figure 4b. A similar small displacement for BSA was observed in the simulations of the model previously developed by Li *et al.* (2004). When comparing the experimental results and the model simulations for both Hb and BSA, a 'tail' can be observed in figures. Fig. 3a and b where the model does not follow the experimental results closely. Two explanations for this

behaviour could be that the experimental salt gradient does not follow the strictly linear gradient towards the end of the run and that the protein may not be totally homogeneous and that some glycosylation heterogeneity may be present in the sample used. This phenomena is also observed for the mixture of both proteins as can be seen in Figure 4a and b.

Table 5. Parameters in the rate model used for simulating elution curves by pH gradient using Protein A

Protein	F (mL/min)	C_0 (mg/mL)	V_m (mL)	Grad (CV)	Da	β	α	Pe	Bi	π
IgG1	1	0.149	0.1	10	0.1152	6.7116	5.8261	212.39	91.83	0.1691
IgG2a	1	0.149	0.1	10	0.2201	5.9780	9.5755	212.39	91.83	0.3711
IgG2b	1	0.149	0.1	10	1.5610	7.7755	7.3049	212.39	91.83	0.2426

Table 6. Operation conditions used for simulating elution curves of mixtures by pH gradient using Protein A shown in Figure 6

Mixture	Protein	Co (mg/mL)	F (mL/min)	V _m (mL)	Grad (CV)
a	IgG1	0.084	1	0.1	20
	IgG2b	0.095			
b	IgG1	0.016	1	0.25	20
	IgG2a	0.016			
c	IgG2a	0.038	1	0.1	20
	IgG2b	0.038			

Protein A and pH gradient

Elution curves of three IgGs (IgG1, IgG2a and IgG2b) with different affinities to Protein A are shown in Figure 5. These three experimental curves were used for parameter estimation; the results are presented in Table 5. The P_e , B_i and π were calculated

whereas α , β and D_a were fitted for each protein as shown in Figure 5. Simulated curves are also shown in the figures. Similarly to the behaviour shown for Blue Sepharose, the simulation results show a small difference with the experimental results for IgG1 and IgG2a in the tail of the peak (Figure 5a and b). This peak

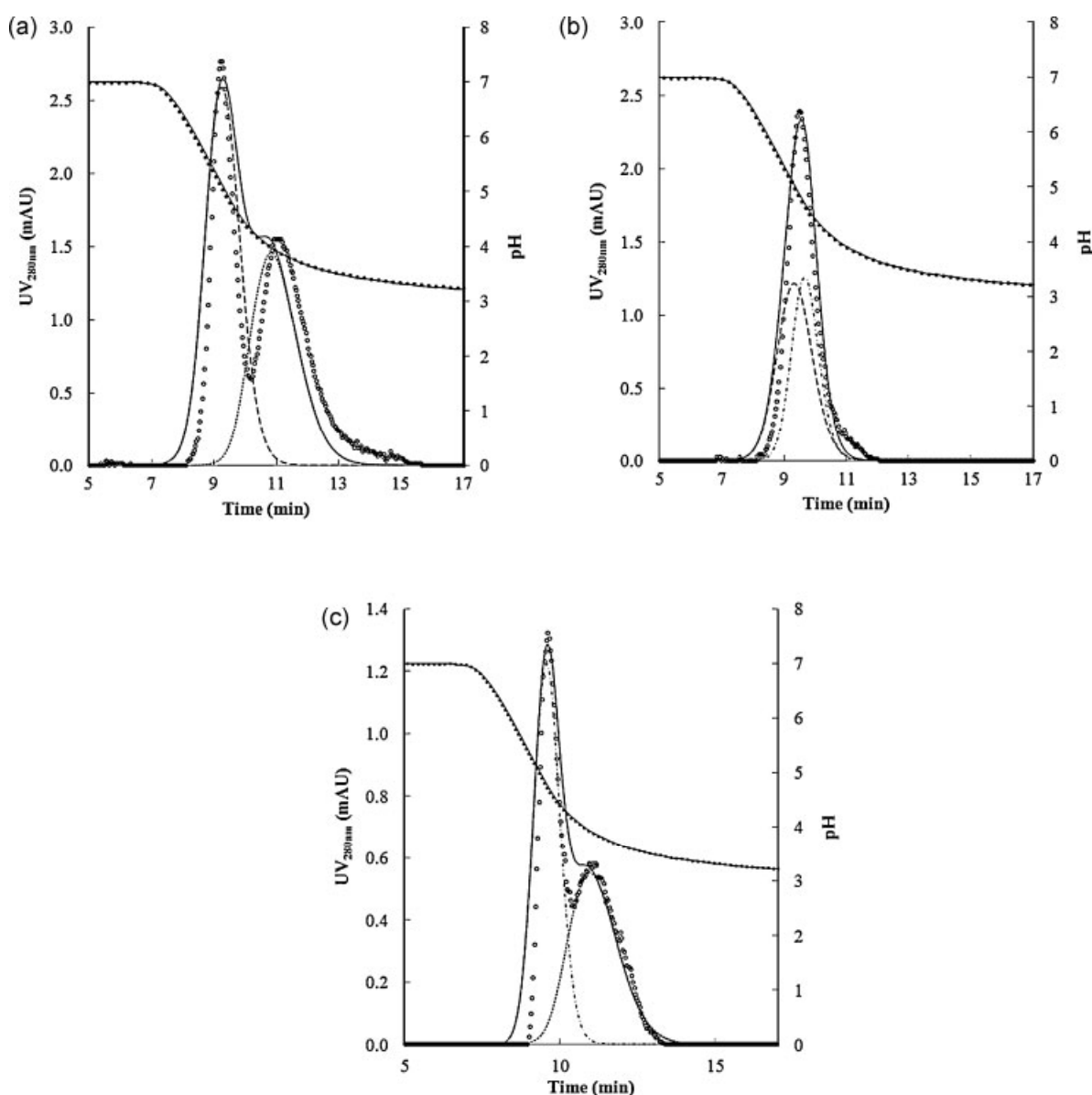
**Figure 6.** Comparison of experimental (dots) and simulated (continuous and semicontinuous lines) elution curves of various two protein mixtures (a) IgG1 and IgG2b, (b) IgG1 and IgG2a, (c) IgG2a and IgG2b and pH gradient. The operation conditions used in these runs are presented in Table 6.

Table 7. Physical parameters used for simulating elution curves by pH and salt gradient

Parameter	Blue Sepharose	Protein A
Binding capacity (mg/mL)	5	50
Mean bead size (μm)	90	90
Macroporous diameter	300	300
Tortuosity	1.5	1.5
ε_b	0.3	0.3

broadening effect could be due to the possible glycosylation heterogeneity of the IgGs. This tail peak broadening is observed to a lesser extent for the IgG2b (Figure 5c). Estimated values for the parameters were used for simulating the elution curves of the three protein mixtures and mixtures of two proteins (Table 6, Figure 6). The model and the parameters estimated from single protein elution curves was able to predict the behaviour of almost all the protein mixture elution curves obtained with different pH gradient, flow rate and protein load. For all the mixtures the simulations followed quite closely the experimental results. In Figures 5 and 6, it can be seen that the model is able to predict very well the nonlinearity of the pH gradient that occurs experimentally. Table 7 shows the physical parameters used for simulating the elution curves for salt and pH gradients.

Conclusions

This paper has investigated the development of the necessary parameters to be used in a rationale to choose an optimal

separation sequence in order to include affinity chromatography. The mathematical modelling and simulation of such affinity systems has also been investigated. For the selection of operations two algorithms are used. In the first one the value of η , which corresponds to the efficiency (resolution) of the actual chromatography and, Σ , which determines the amount of a particular contaminant eliminated after each separation step, which determines the purity, have to be determined. It was found that the value of both these parameters is not generic for affinity separations but will depend on the type of affinity system used and will have to be determined on a case by case basis. η values of ca. 0.7 were found for Blue Sepharose and 0.9–1.0 for Protein A, which compare well with 1.0 for ion exchange and 0.86 for HIC determined previously. For Σ a value of 0.31 was obtained for Blue Sepharose and 0.22 for Protein A, which compare with 0.15 for ion exchange and 0.22 for HIC.

Mathematical modelling of both affinity systems using a rate model was carried out. With Blue Sepharose a salt gradient was used and with Protein A, a pH gradient. Parameters were determined with individual proteins and successful simulations of the protein mixtures were carried out. The largest deviation in the protein mixtures at different operating conditions was 8% for BSA and less for the IgGs. The 'tailing' effect observed on the right hand side of most peaks could be caused by the possible heterogeneity of the proteins due to glycosylation.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Millenium Scientific Initiative for financial support (ICM-P05-001-F).

REFERENCES

- Asenjo, JA. 1990. Selection of operations in separation processes. In *Separation Processes in Biotechnology*, Asenjo JA (ed.) Marcel Dekker: New York; 3–16.
- Asenjo, JA Andrews, BA. 2004. Is there a rational method to purify proteins?: from expert systems to proteomics. *J. Mol. Recognit.* **17**: 236–247.
- Carroll, DL. 2009. D. L. Carroll's FORTRAN Genetic Algorithm Driver, <http://cuaerospace.com/carroll/ga.html> accessed in March 2009.
- Gu, T. 1995. Mathematical Modeling and Scale-Up of Liquid Chromatography. Berlin: Springer.
- Lazo, C. 1999. Simulation of Liquid Chromatography and Simulated Moving Bed (SMB) Systems. Studienarbeit Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Leser, EW. 1996. Prot_Ex: an expert system for selecting the sequence of processes for the downstream purification of proteins. Ph.D. Thesis, University of Reading.
- Leser, EW, Asenjo, JA. 1992. The rational design of purification processes for recombinant proteins. *J. Chromatogr.* **584**: 35–42.
- Li, W., Zhang, S., Sun, Y. 2004. Modeling of the linear-gradient dye-ligand affinity chromatography with a binary adsorption isotherm. *Biochem. Eng. J.* **22**: 63–70.
- Lienqueo, ME, Leser, EW, Asenjo JA. 1996. An expert system for the selection and synthesis of multistep protein separation processes. *Comput. Chem. Eng.* **20**: S189–S194.
- Orellana CA., Shene C., Asenjo JA. 2009. Mathematical modeling of elution curves for a protein mixture in ion exchange chromatography applied to high protein concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **104**: 572–581.
- Shene C, Lucero A, Andrews BA, Asenjo, JA. 2006. Mathematical modeling of elution curves for a protein mixture in ion exchange chromatography and for the optimal selection of operational conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **95**: 704–713.