

Opinnäytetyö (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

2010

Krista Oksanen

RPROTEIN A SEPHAROSE FF VASTA- AINEPUHDISTUSPYLVÄÄN PUHDISTAMINEN

– Cleaning-in-place (CIP)



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Krista Oksanen

RPROTEIN A SEPHAROSE FF VASTA-AINEPUHDISTUSPYLVÄÄN PUHDISTAMINEN

Työn tarkoituksena oli puhdistaa rProtein A Sepharose FF vasta-ainepuhdistuspylväs cleaning-in-place -menetelmällä (CIP). Työ tehtiin Wallac Oy:n vasta-ainevalmistuksen osastolle.

Normaalin vasta-ainepuhdistuksen yhteydessä kromatografiapylväiseen kertyy epäpuhtauksia ja kontaminaatioita, jotka eivät välttämättä poistu pylvästä regeneroinnin aikana. Cleaning-in-place -puhdistusmenetelmällä pyritään poistamaan näitä epäpuhtauksia ja varmistamaan pylvään toimivuus.

CIP-menetelmää testattiin anti-IRT 14F10 pylväällä. CIP-käsittelyn aikana kerättiin fraktioita, joista määritettiin mahdollisia pylvään epäpuhtauksia. Käsittelyn jälkeen suoritettiin normaali vasta-aine-erän puhdistus, ja puhdistetun vasta-aineen laadunvalvonta. Lisäksi varmistettiin, ettei CIP-käsittely ole vahingoittanut kromatografiapylvästä, tai ettei käsittely huononna puhdistuskapasiteettia.

Testauksissa todettiin, että CIP-menetelmä ei vahingoita kromatografiapylvästä, eikä huonontanut puhdistuskapasiteettia. Puhdistetun vasta-aineen laadunvalvonnan avulla voidaan todeta, ettei CIP-menetelmä vaikuta lopputuotteen laatuun. Lisäksi testauksissa selvisi, että pylvään suurimmat epäpuhtaudet muodostuivat proteiineista, jotka saatiin poistettu CIP-käsittelyllä. Lopputuloksena voidaan todeta, että rProtein A Sepharose FF kromatografiapylväs voidaan puhdistaa cleaning-in-place -menetelmällä.

ASIASANAT:

kromatografia, puhdistus, vasta-aineet

Krista Oksanen

CLEANING OF RPROTEIN A SEPHAROSE FF ANTIBODY PURIFICATION COLUMN

The aim of this thesis was to clean an rProtein A Sepharose FF antibody purification column by using the cleaning-in-place method (CIP). The thesis was commissioned by the antibody manufacturing department of Wallac Inc.

During normal antibody purification, impurities and contaminants may accumulate in the chromatography column. These contaminants cannot necessarily be removed by the regeneration of the column. The idea is that the impurities and the contaminants can be removed by cleaning-in-place and at the same time the functionality of the column can be ensured.

The CIP method was tested with an anti-IRT 14F10 column. Fractions were collected during the CIP. Possible impurities were then determined from the fractions. Next the CIP column was used to purify a normal antibody batch and regular quality control of the purified antibodies was performed. In addition, tests were carried out to make sure that the CIP method did not damage the chromatography column and to make sure that the method did not affect the purification capacity.

It was found that the CIP did not damage the chromatography column, nor did it affect the purification capacity. It can be said that the method does not affect the final product. This was confirmed by the quality control of the purified antibodies. The tests showed that the majority of the impurities were proteins and the CIP method was able to remove them. As a conclusion it can be said that rProtein A Sepharose FF chromatography columns can be cleaned by the cleaning-in-place method.

KEYWORDS:

antibodies, chromatography, cleaning

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	5
1 JOHDANTO	6
2 IMMUUNIVASTE	7
2.1 Soluvälitteinen immunitaetti	7
2.2 Humoraalinen immunitaetti	8
3 VASTA-AINEET	10
4 VASTA-AINEIDEN TUOTTO JA PUHDISTUS	12
4.1 Tuotto	12
4.2 Puhdistus	14
5 CLEANING-IN-PLACE	16
6 MENETELMÄT	18
6.1 Affiniteettikromatografia	18
6.1.1rProtein A Sepharose Fast Flow	20
6.2 DELFIA immunoassay	21
6.2.1IFMA-määritys	22
6.2.2FIA-määritys	23
6.2.3Työn FIA-määritys	24
6.3 Isoelektrinen fokusointi	24
6.4 SDS-PAGE	25
6.5 Proteiinien määritys Bradfordin menetelmällä	26
6.6 Triglyseridien määritys	26
6.7 Kolesterolin määritys	27
7 TYÖN SUORITUS	28
8 TULOKSET	30
8.1 Asetonitesti	30
8.2 Vasta-aine-erän puhdistus	30
8.3 Flow through	31
8.4 IEF- ja SDS-ajot	32
8.5 Fraktioiden määritykset	35
8.6 MS-ajot	37
9 TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT	38
LÄHTEET	40

LIITTEET

Liite 1. CIP-fraktioiden massaspektrit

Liite 2. rProtein A Sepharose Fast Flow geelin kulutus

KUVAT

Kuva 1. Pelkistetty kuva vasta-aineesta. ⁵	10
Kuva 2. Matriisin tasapainotus. ⁹	19
Kuva 3. Näytteen applikointi ja sitoutumattoman materiaalin pesu. ⁹	19
Kuva 4. Näytteen eluointi. ⁹	20
Kuva 5. IFMA-määritys. ¹¹	23
Kuva 6. FIA-määritys. ¹¹	24
Kuva 7. Asymmetriafaktorin laskeminen.	28
Kuva 8. IEF-geeli 2769.	33
Kuva 9. IEF-geeli 2775, yhden viikon säilyvytykset.	33
Kuva 10. IEF-geeli 2780, kahden viikon säilyvytykset	34
Kuva 11. SDS-geeli 662.	35

KUVIOT

Kuvio 1. Vasta-aineiden tuotto.	13
---------------------------------	----

TAULUKOT

Taulukko 1. Proteiini A:n ja G:n sitomisvoimakkuuksia. ⁵	15
Taulukko 2. Puhdistusreagensseja eri epäpuhtauksille. ⁸	16
Taulukko 3. Anti-IRT 14F10 -pylvään asymmetriafaktorit.	30
Taulukko 4. Vasta-aine-erien saantoprosentteja.	31
Taulukko 5. Flow through -määrityksen tulokset.	32
Taulukko 6. Proteiinipitoisuus.	36
Taulukko 7. Triglyseridipitoisuus.	36
Taulukko 8. Kolesterolipitoisuus.	37

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Adjuvantti	Apuaine, joka vahvistaa toisen aineen vaikutusta, erityisesti toisen aineen aiheuttamaa immuunivastetta. Käytetään yleisesti rokotteissa.
Affiniteetti	Kemiassa affiniteetti tarkoittaa molekyylien yhdistymistä kemiallisen reaktion avulla. Immunologiassa affiniteetti kuvaa vasta-aine-antigeenisidoksen voimakkuutta.
Fagosyytti	Solu, joka voi kääriytyä amebamaisesti pienemmän organismin, esimerkiksi bakteerin, ympärille eli fagosytoida sen. Esimerkiksi makrofagit ovat fagosyyttejä.
Immunitaetti	Vastustuskyky
IRT	Immunoreaktiivinen trypsiini
Kateenkorva	Immuunijärjestelmään kuuluva elin, joka sijaitsee rintaontelon välikarsinassa sydämen ja rintalastan välissä.
LMW	Low Molecular Weight
Monoklonaalinen vasta-aine	Monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat vain yhden epitoopin yhdestä spesifisestä antigeenistä. Monoklonaaliset vasta-aineet tuotetaan yhdestä solukloonista.
Myeloma	Pahanlaatuinen luuydinkasvain
PAGE	Polyakryyliamidigeleielektroforeesi
Polyklonaalinen vasta-aine	Vasta-aineiden seos, joka tunnistaa useita epitooppeja joko yhdestä tai useammasta antigeenistä. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat tuotettu useasta kloonista. Niitä voidaan tuottaa esimerkiksi kanissa ja vuohessa.
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
Sytokiinit	Sytokiinit ovat proteiineja, jotka ohjaavat solujen välistä signaalia. Signaalin välitys tapahtuu solujen pinnalla olevien spesifisten reseptorien avulla.

1 JOHDANTO

Työssä pyrittiin pidentämään vasta-aineiden puhdistukseen käytettävien rProtein A Sepharose Fast Flow kromatografiapylväiden käyttöikää puhdistusmenetelmän (cleaning-in-place, CIP) avulla. Työ tehtiin Wallac Oy:n vasta-ainevalmistuksen osastolle.

Wallac Oy on osa Perkin Elmerin kansainvälistä konsernia. Perkin Elmer on teknologiayritys, joka kehittää ihmisen ja ympäristön hyvinvointia ja turvallisuutta. Turussa valmistetaan mittalaitteita, ohjelmistoja laboratorioiden tietojärjestelmiin ja reagensseja noin 70:neen analyysiin. Valmistettavia tuotteita ovat muun muassa automatisoidut DELFIA-järjestelmät, monileimalaskijat, sekä tuotteita prenataaliseulontaan ja molekyyliidiagnostiikkaan.

Wallac Oy:ssä in vitro-tuotetut monoklonaaliset vasta-aineet puhdistetaan rProtein A Sepharose FF pylväillä (GE Healthcare, 17-1279-02). Jokainen vasta-aine puhdistetaan omalla pylväällä ristikontaminaation välttämisen vuoksi. Normaali pylvään käyttöikä on 20 puhdistussykliä. Puhdistusprosessien aikana pylvääseen kertyy vähitellen kontaminaatioita ja epäpuhtauksia, jotka eivät välttämättä poistu pylvästä normaalin regeneroinnin yhteydessä. Pylvääseen kertyvät epäpuhtaudet vähentävät puhdistuskapasiteettia ja -tehokkuutta. Säännöllisen pylvään puhdistusmenetelmän (CIP) avulla voidaan poistaa epäpuhtauksia ja varmistaa pylvään puhtaus, näin pidentäen pylväiden käyttöikää sekä voidaan vähentää kustannuksia.

2 IMMUUNIVASTE

Suojautuminen elimistöön tunkeutuvia taudinaiheuttajia vastaan perustuu erilaisiin mekanismeihin. Taudinaiheuttajia voivat olla bakteerit, loiset, sienet ja virukset. Näillä mekanismeilla vieraat organismit tunnistetaan ja tuhotaan, ja niitä vastaan kehittyy immuniteetti. Immuunijärjestelmän solut (makrofagit ja imusolut eli lymfosyytit) ja lymfaattisten elinten toiminta saavat aikaan immuniteetin. Lymfaattisia elimiä ovat imusolmukkeet, kateenkorva, luuydin, nielurisat ja perna. Ihmisen immuunivaste perustuu elimistön kemiallisiin ja fyysisiin esteisiin, patogeenien tunnistamiseen ja siitä seuraaviin solunsisäisiin reaktioihin sekä fagosyyttien ja spesifisten proteiinien toimintaan. Immuunivasteen molekylaarisia komponentteja ovat immunoglobuliinit (Ig) eli vasta-aineet, komplementtijärjestelmä ja sytokiinit.¹

Adaptiivinen immuunivaste rakentuu veren valkosolujen toimintaan. Veren valkosolut voidaan jakaa kahteen ryhmään: granulositytit ja agranulosyytit. Granulosyyttejä ovat basofiilit, eosinofiilit ja neutrofiilit. Agranulosyyttejä ovat monosyytit ja lymfosyytit.² Lymfosyyttejä esiintyy imukudoksissa, imunesteessä, imusolmukkeissa, pernassa, umpilisäkkeessä sekä veressä. Lymfosyyttien aikaansaamat immuunivasteet voidaan jakaa soluvälitteiseksi ja humoraaliseksi (vasta-ainevälitteiseksi) immuniteetiksi.¹

2.1 Soluvälitteinen immuniteetti

Soluvälitteiseksi immuniteetiksi kutsutaan T-imusolujen (T-lymfosyyttien) välittämää immuunipuolustusta. Aktiiviset T-solut reagoivat suoraan vieraaseen antigeeniin. Vieras antigeeni on yleensä sitoutunut isäntäsolun pinnalle. T-solut voivat joko auttaa infektoitunutta solua tai avustaa muita soluja tuhoamaan patogeenin tai tappaa infektoituneen solun. Soluvälitteinen immuniteetti aktivoituu erityisesti sienten, solunsisäisten virusten ja loisten aiheuttamissa infektioissa. Se toimii myös kudossiirrännäisiä ja syöpäsoluja vastaan. T-soluvälitteinen immuniteetti on vasta-ainevälitteisen immuniteetin tavoin spesifinen tietyille antigeenille. Niiden toiminta eroaa B-solujen toiminnasta siten, että T-solujen toiminta on paikallista ja solujen vaikutus kohdistuu vain

läheisiin soluihin, kun taas B-solujen erittämät vasta-aineet leviävät verenkierron mukana ja vaikuttavat laajasti elimistössä.¹

T-solut voidaan jakaa toiminnallisesti erilaisiin pääluokkiin: auttaja-, regulatoriset-, ja sytotoksiset T-solut. Auttaja T-solut toimivat elimistön puolustuksessa sekä solun sisäisiä että solun ulkopuolisia patogeenejä vastaan. Ne aktivoivat makrofageja ja sytotoksisia T-soluja tuhomaan patogeenejä sekä stimuloivat B-soluja tuottamaan vasta-aineita. Sytotoksiset T-solut toimivat solun sisäisiä patogeenejä vastaan.¹ Esimerkiksi viruksen tunkeutuessa soluun sisään, solupinnan proteiinit muuttuvat virukselle luonteenomaisella tavalla. Sytotoksinen T-solu tunnistaa muuttuneet proteiinit ja kiinnittyvät niihin antigeenireseptorien välityksillä. Kiinnittymisen jälkeen sytotoksinen T-solu tappaa eli aiheuttaa kohdesolun apoptoosin ennen kuin solussa oleva virus ehtii kehittyä ja levitä muihin soluihin.³ Regulatoriset T-solut tunnistettiin alun perin lymfosyyttien toimintaa vaimentavina soluina, minkä takia niitä onkin kutsuttu suppressori-T-soluiksi. Ne hillitsevät liiallisia T-solureaktioita kroonisissa infektioissa ja vaimentavat auttaja- ja sytotoksisten T-solujen reaktiivisuutta kehon omia kudoksia kohtaan. Regulatoriset T-solut ehkäisevät kudolvaurioiden muodostumista ja osallistuvat immunologisen toleranssin kehittymiseen.¹

2.2 Humoraalinen immunitaetti

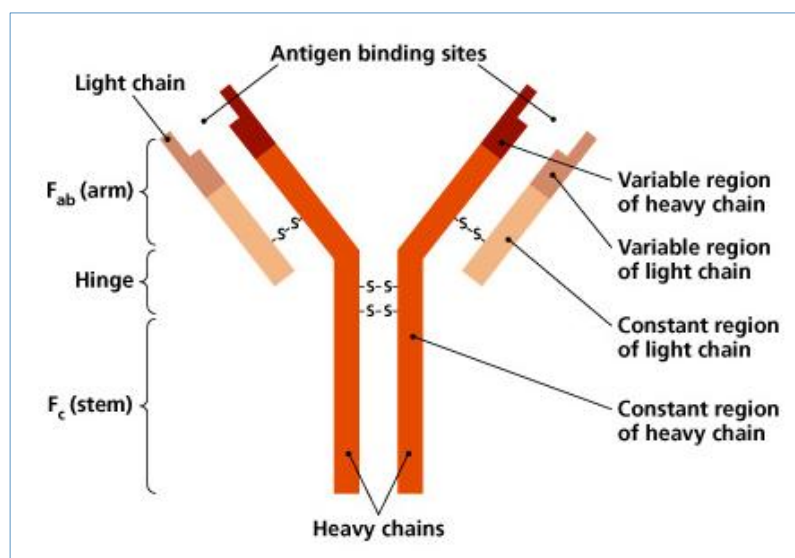
Humoraalisessa eli vasta-ainevälitteisessä immunitaetissa B-solut (B-lymfosyytit) tuottavat vasta-aineita. B-soluilla ei tiedetä olevan muuta tehtävää kuin vasta-aineiden tuottaminen. Vain B-solut voivat tuottaa vasta-aineita ja jokainen solu tuottaa vain yhdenlaisia vasta-aineita. Solut erittävät vasta-aineita ulos solusta sekä ilmentävät niitä solukalvolla. Kun vasta-aine on kiinnittynyt solukalvoon, se toimii antigeenireseptorina.¹ Antigeenireseptorin kohdatessa antigeenin, osa B-soluista erilaistuu plasmak soluiksi. Plasmak solut tuottavat suuria määriä vasta-aineita. Myös ne B-solut, jotka eivät muutu plasmak soluiksi, tuottavat vasta-aineita, mutta plasmak soluja vähemmän.³

Vasta-aineet kulkevat veren mukana ja ne voivat siirtyä muihin kudostenesteisiin sitomaan spesifisiä antigeenejä. Kun vasta-aineet ovat sitoutuneet mikrobeihin, ne eivät pysty sitoutumaan isäntäsolun reseptoreihin. Lisäksi vasta-aineen sitoutuminen patogeenin pintaan toimii merkinä immuunipuolustuksen fagosyyteille. Humoraalinen immuniteetti aktivoituu erityisesti virusten ja bakteerien aiheuttamissa infektioissa.¹

3 VASTA-AINEET

Kaikki immunoglobuliinit koostuvat neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta identtisestä raskasketjusta (H) ja kahdesta identtisestä kevytketjusta (L). Kevyt- ja raskasketjut ovat sitoutuneet toisiinsa kahdella sulfididisoksella (rikkisilta). Raskasketjut ovat myös sitoutuneet toisiinsa kahdella sulfididisoksella. Raskasketjujen sulfididisokset sijaitsevat alueella, jota kutsutaan saranaksi.⁴

Kaikissa neljässä polypeptidiketjussa on vakio (englanniksi constant, C) alue ja vaihteleva (englanniksi variable, V) alue. V-alueet sijaitsevat ketjujen aminopäässä (N-terminaali) ja C-alueet sijaitsevat karboksyyli-päässä (C-terminaali). Kevyt- ja raskasketjuissa on kummassakin yksi V-alue. Kevytketjussa on yksi C-alue, kun taas raskasketjussa on kolme C-aluetta. Kummakin ketjun V-alueet muodostavat kaksi identtistä antigeenin sitomisaluetta, eli sen osan vasta-ainetta, mikä sitoo antigeenin. Sitomisaluetta kutsutaan epitoopiksi.⁴ Kuvassa 1. on esitetty pelkistetty kuva vasta-aineesta.



Kuva 1. Pelkistetty kuva vasta-aineesta.⁵

Immunoglobuliinit jaetaan viiteen eri pääluokkaan: IgA(α), IgD(δ), IgE(ϵ), IgG(γ) ja IgM(μ). Jako perustuu raskasketjujen komponentteihin, jotka on merkitty

kreikkalaisilla kirjaimilla suluissa. Kevytketjuja on kahta tyyppiä: κ ja λ . Yhdellä vasta-aineella voi olla joko tyyppiä κ tai λ , mutta ei koskaan molempia.⁴

IgA ja IgG jaetaan edelleen alaluokkiin. Jako perustuu pieniin eroihin raskasketjujen aminohapposekvenssissä. Ihmisellä on neljä eri IgG alaluokkaa: IgG₁, IgG₂, IgG₃ ja IgG₄. Hiiren IgG:llä on myös neljä alaluokkaa: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} ja IgG₃. Nämä raskasketjut ovat suurin piirtein samankokoisia ja niillä on samat elektroforeesiset ominaisuudet, mutta eroavat toisistaan huomattavasti aminohapposekvenssien perusteella. Ihmisellä on kaksi IgA:n alaluokkaa, IgA₁ ja IgA₂, kun taas hiirellä on vain yksi IgA:n alaluokka.⁴

Vasta-aineita voidaan pilkkoa entsyymien avulla. Pilkkomisen seurauksena saadaan aktiivisia vasta-aineen osia, joiden avulla voidaan saada selville tietoa vasta-aineen rakenteesta, tai joita voidaan käyttää spesifisinä reagensseina.⁴

Kun vasta-aine pilkkotaan papaiini entsyymillä, saadaan kaksi identtistä Fab-fragmenttia (fragment-antigen-binding) ja yksi Fc-fragmentti (fragment-crystallisable). Vasta-ainetta voidaan myös käsitellä pelkistävillä reagensseilla, kuten merkaptotetanolilla, jolloin rikkisillat katkeavat ja näin saadaan erotettua kevyt- ja raskasketjut toisistaan.⁶

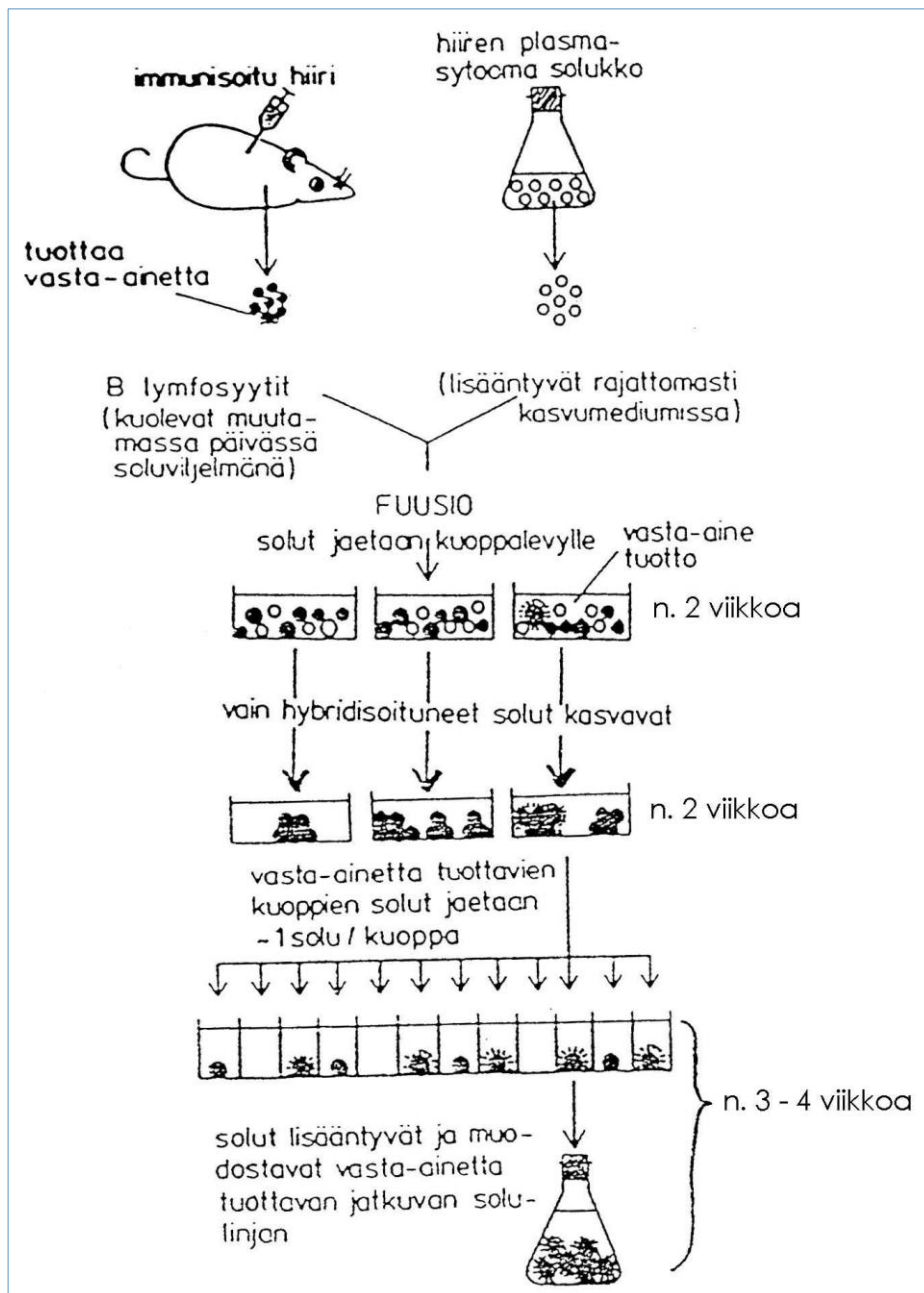
4 VASTA-AINEIDEN TUOTTO JA PUHDISTUS

4.1 Tuotto

Monoklonaalista vasta-aineita tuottavien solulinjojen valmistus aloitetaan ensin immunisoimalla koe-eläin, yleensä hiiri. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa myös rotassa. Hiirtä käytetään koe-eläimenä, koska se on tehokas ja nopea lisääntymään, halpa tuottaa ja ylläpitää sekä pienen koon vuoksi helppo käsitellä. Lisäksi sisäsiittoisten hiirten tuotanto on mahdollistanut geneettisesti erittäin samanlaisten hiirten saannin tutkimuskäyttöön.⁷

Hiiri voidaan immunisoida joko *in vivo*- tai *in vitro*-immunisaatiolla. *In vitro*-immunisaatiossa kateenkorvansoluista eristettyä T-solufaktoria ja antigeeniä immunisoidaan suoraan nukutetun hiiren pernaan.⁷

In vivo-immunisaatiossa antigeeni ja adjuvantti immunisoidaan hiiren vatsaonteloon (i.p. intraperitoneal). Hiirelle annetaan tehosterokotteet eli boosterit kolmen viikon välein, vähintään kaksi kertaa. Antigeenivastetta seurataan verinäytteiden avulla. 36 – 72 tunnin kuluttua viimeisestä tehosteesta pernasolut tai imusolut otetaan talteen fuusiota varten. Pernasolut/imusolut fuusoidaan myelomasolujen kanssa. Myelomasolut ovat B-syöpäsoluja, jotka eivät tuota omia vasta-aineita. Fuusioituneet solut muodostavat hybridomasoluja, jotka jaetaan kuoppalevyille. Levyjä testaan immunologisin menetelmin ja levyiltä valitaan ne kuopat, jotka tuottavat haluttua vasta-ainetta. Kuoppien solut laimennetaan, siten että yhteen kuoppaan tulee vain yksi solu. Näin saadaan monoklonaalinen solulinja, jossa kaikki kuopan solut ovat peräisin samasta emosolusta ja tuottavat samaa monoklonaalista vasta-ainetta kuin alkuperäinen solu.^{4,7} Kuviossa 1. on esitetty monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto käyttämällä immunisoitua hiirtä.



Kuvio 1. Vasta-aineiden tuotto.

Monoklonaalisilla vasta-aineilla on huomattava etu etenkin lääkinnällisissä menetelmissä, johtuen niiden korkeasta spesifisyydestä. Hybridoomasolumenetelmä on ollut erittäin tehokas tapa tuottaa hiiren monoklonaalisia vasta-aineita, mutta käytettäessä näitä vasta-aineita

lääkinnällisissä menetelmissä mukana on aina ollut riski immunogeenisistä reaktioista. Vain ihmisen vasta-aineet ovat ei-immunogeenisiä ihmisille.⁴

Wallac Oy:ssä monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa soluja kasvatetaan vasta-ainetuotantoa varten ensin soluviljelypulloissa kasvatustilakameroissa. Mediumiin on lisätty kunkin solulinjan vaatimat lisäravinteet ja lisäaineet. Kun soluviljelypulloissa on saatu kasvatettua riittävä määrä vasta-aineita tuottavia soluja, ne kerätään ja siirretään aseptisesti bioreaktoriin, jossa varsinainen vasta-ainetuotanto tapahtuu *In vitro* tuottona ontelokuiduissa (Hollow-fiber). Solut kiinnittyvät kuitujen ulkopinnalle. Mediumit virtaavat kuitujen sisä- ja ulkopuolella huolehtien solujen hyvinvoinnista. Soluille varmistetaan otolliset olosuhteet laitteeseen asetetuilla arvoilla. Solut tuottavat monoklonaalista vasta-ainetta, joka kerätään pulloon. Tapahtumaa kutsutaan harvestoinniksi ja kerättävää erää harvestiksi. Harvestit siirretään varastoon odottamaan testauksia ja jatkokäsittelyä.⁷

Vasta-aineita voidaan myös tuottaa geenitekniikan avulla. Vasta-aineita voidaan tuottaa bakteeri-, hyönteis- sekä kasvisoluissa. Rekombinanttitekniikkaa käytetään yhä kasvavassa määrin vasta-aineiden ja niiden fraktioiden tuottamiseen ja muokkaamiseen. Jotta vasta-aineet olisivat mahdollisimman tehokkaita lääkitäisinä reagensseina, niillä tulee olla pitkä puoliintumisaika verenkierrossa, korkea affiniteetti antigeenin suhteen, niiden tulee vaikuttaa mahdollisimman vähän ihmisen omaan immuunipuolustukseen sekä niiden pitää pystyä neutraloimaan antigeenin aktiivisuus. Näitä kaikkia ominaisuuksia pystytään parantamaan geenimuokkauksen avulla.⁴

4.2 Puhdistus

Ennen puhdistusta tulee ottaa huomioon, miten vasta-aine on tuotettu. Eri lähteistä saadaan eri määrät vasta-ainetta ja jokaisella lähteellä on omat kontaminaationsa. Esimerkiksi bakteereista eristetyt vasta-aineet sisältävät bakteerien proteiineja.⁶ Puhdistettavaa näytettä täytyy usein esikäsitellä ennen puhdistusta. Esikäsitelyn päävaiheet ovat spesifisten ja karkeiden epäpuhtauksien poisto ja puskurinvaihto ja suolanpoisto, jolloin saadaan näyte

oikeisiin olosuhteisiin (pH ja suolakonsentraatio) ja samalla päästää eroon ei-halutuista pienistä molekyyleistä. Epäpuhtauksia voidaan esimerkiksi poistaa sentrifugoimalla. Muita esikäsittelymenetelmiä ovat esimerkiksi suodatus ja dialyysi.⁴ Joskus näyte täytyy myös konsentroida ennen puhdistusta.⁶

Yleisin puhdistusmenetelmä on affiniteettikromatografia. Affiniteettikromatografiassa käytetään yleensä joko proteiini A:ta tai proteiini G:tä sitomaan vasta-aine pylvääseen. Proteiini A ja G sitoutuvat eri voimakkuuksilla eri vasta-aineisiin. Esimerkiksi proteiini G sitoutuu voimakkaasti ihmisen IgG₃ vasta-aineeseen, kun taas proteiini A ei sitoudu kyseiseen vasta-aineeseen ollenkaan. Tämän takia tulee tietää monoklonaalisen vasta-aineen luokka ennen puhdistusta. Taulukossa 1. on esitetty eri vasta-aineluokkien sitomisvoimakkuuksia proteiini A:n ja G:n kanssa.

Taulukko 1. Proteiini A:n ja G:n sitomisvoimakkuuksia.⁵

Laji	Alaluokka	Affiniteetti proteiini A:n kanssa	Affiniteetti proteiini G:n kanssa
Ihminen	IgG ₁	vahva	vahva
	IgG ₂	vahva	vahva
	IgG ₃	ei sitoudu	vahva
	IgG ₄	vahva	vahva
Hiiri	IgG ₁	heikko	vahva
	IgG _{2a}	vahva	vahva
	IgG _{2b}	keskivahva	keskivahva
	IgG ₃	kohtalainen	keskivahva

Affiniteettikromatografia ei ole ainoa tapa puhdistaa vasta-aineita. Muita tapoja on esimerkiksi ioninvaihtokromatografia ja geelisuodatus. Joskus voi olla myös tarpeen yhdistää kaksi eri tapaa, jotta saavutetaan riittävän puhdas lopputuote.⁴

5 CLEANING-IN-PLACE

Pylvään puhdistus ja sanitointi on hyvä ottaa huomioon pylvään ylläpidossa. Usein kromatografiapylväät poistetaan käytöstä ja pakataan mieluummin uusi pylväs, jotta säästytään puhdistusmenetelmän validointikustannuksilta. Kuitenkin pylväiden uudelleenkäyttö puhdistusmenetelmän avulla vähentää kustannuksia pitkällä aikavälillä.⁸

Sopivaa puhdistusmenetelmää kehitettäessä täytyy ottaa huomioon mitä epäpuhtauksia pylväs saattaa sisältää. Tyypillisiä epäpuhtauksia ovat liukoiset hydrofiiliset proteiinit, hydrofobiset proteiinit ja lipidit, saostuneet proteiinit, nukleiinihapot, endotoksiinit ja virukset. Taulukossa 2 on esimerkkejä puhdistusreagensseista eri epäpuhtauksille. Taulukosta välittyvät tiedot ovat hyödyksi puhdistusmenetelmää kehitettäessä, mutta usein täytyy ottaa huomioon, että puhdistuksen tulee poistaa epäpuhtauksien seoksia. Lisäksi menetelmässä tulee ottaa huomioon erilaiset vuorovaikutukset. Sen takia puhdistusmenetelmä tulee optimoida juuri omaan tuotantoon sopivaksi.⁸

Taulukko 2. Puhdistusreagensseja eri epäpuhtauksille.⁸

Liukoiset proteiinit	NaCl, vesi, vähä-ioniset puskurit
Saostuneet proteiinit	NaOH, HAc, NaCl, vesi
Hydrofobiset proteiinit	NaOH
Lipidit	Etanoli, isopropanoli, asetonitrili, ionittomat detergentit
Nukleiinihapot	NaOH, NaCl, DNAasit
Endotoksiinit	NaOH
Virukset	NaOH

Puhdistusmenetelmä tulee valita siten, ettei menetelmä vahingoita pylväiden matriisia. Viimeisten vuosien aikana on panostettu kromatografiamatriisien valmistuksessa niiden kykyyn sietää puhdistus- ja sanitoitinkäsittelyä. Etenkin huomiota on kiinnitetty materiaalien natriumhydroksidin sietokykyyn.

Natriumhydroksidilla, yksinään tai yhdessä natriumkloridin kanssa, voidaan puhdistaa ja sanitoida pylväs yhdellä ajolla, minkä takia siitä on tullut tärkeä osa puhdistusprosessia. Pylvään puhdistaminen ja sanitoiminen samanaikaisesti säästää aikaa ja reagensseja.⁸

6 MENETELMÄT

6.1 Affiniteettikromatografia

Biomolekyyliä puhdistetaan yleensä tekniikoilla, jotka perustuvat erilaisiin spesifisiin ominaisuuksiin, kuten koko, varaus ja hydrofobisuus. Affiniteettikromatografian erotusprosessi perustuu proteiiniin (tai proteiinijoukon) ja kromatografiamatriisiin sidotun spesifisen ligandin vuorovaikutuksiin. Biologiset vuorovaikutukset, kohdemolekyylin ja ligandin välillä, voivat olla hydrofobisia tai sähköstaattisia vuorovaikutuksia, vetysidoksia tai van der Waalsin voimia. Jotta kohdemolekyyli saadaan eluoitua matriisista, täytyy vuorovaikutuksen olla palautuva. Molekyyli voidaan eluoida joko spesifisesti kilpailevalla ligandilla, tai ei-spesifisesti muuttamalla ioninvahvuutta, pH:ta tai polaarisuutta.⁹

Onnistuneeseen affiniteettikromatografiaan tarvitaan biospesifinen ligandi, joka pystytään sitomaan kovalenttisesti kromatografiamatriisiin. Sidotun ligandin täytyy säilyttää sen kyky sitoutua spesifisesti kohdemolekyyliin. Lisäksi ligandin ja kohdemolekyylin sidoksen täytyy olla palautuva, jotta kohdemolekyyli voidaan eluoida sen aktiivisessa muodossa. Mitä tahansa komponenttia voidaan käyttää ligandina puhdistamaan sen vastaavaa sidospartneria. Usein affiniteettikromatografiassa käytettyjä biologisia vuorovaikutuksia ovat:

- entsyymi ↔ substraatti, inhibiittori, kofaktori
- hormoni, vitamiini ↔ reseptori, kantajaproteiini
- nukleiinihappo ↔ komplementaarinen emäsekvenssi, histonit, nukleiinihappopolymeraasi
- vasta-aine ↔ antigeeni, virus, solu

Affiniteettikromatografialla saavutetaan korkea selektiivisyys ja korkea resoluutio. Sitä voidaan käyttää joko lopullisen tuotteen erottamiseen tai puhdistusprosessin välivaiheessa. Tekniikkaa voi aina soveltaa, kun löytää sopivan ligandin kohdemolekyyliin.⁹

Affiniteettikromatografiassa kohdemolekyyli kerätään puhdistetussa ja konsentroituneessa muodossa. Konsentroitumisen ansiosta suuria määriä voidaan puhdistaa kerralla. Kohdemolekyylejä voidaan puhdistaa monimutkaisista biologisista seoksista, saman yhdisteen natiivimuodot voidaan erottaa denaturoituneista muodoista ja pieniä määriä biologista materiaalia voidaan puhdistaa kontaminoivien yhdisteiden joukosta. Affiniteettikromatografian päävaiheet on esitetty alla.⁹

Affiniteettimatriisi tasapainotetaan sitomispuskurilla (kuva 2.).



Kuva 2. Matriisin tasapainotus.⁹

Tasapainottamisen jälkeen näyte applikoidaan olosuhteissa, jotka suosivat kohdemolekyylien ja ligandien välistä spesifistä sitoutumista. Kohdemolekyylit sitoutuvat palautuvasti ja sitoutumaton materiaali kulkeutuu läpi kolonnin (kuva 3.).⁹



Kuva 3. Näytteen applikointi ja sitoutumattoman materiaalin pesu.⁹

Kohdemolekyylit saadaan eluoitua ulos kolonnista muuttamalla olosuhteita eluoitumista suosiviksi (kuva 4.). Olosuhteita voidaan muuttaa muuttamalla

esimerkiksi pH:ta, ioninvahvuutta tai polaarisuutta. Kun kohdemolekyylit ovat eluoituneet, matriisi tasapainotetaan uudelleen.⁹



Kuva 4. Näytteen eluointi.⁹

6.1.1 rProtein A Sepharose Fast Flow

rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) on monoklonaalisten ja polyklonaalisten vasta-aineiden puhdistukseen tarkoitettu affiniteettimatriisi. Sitä voi käyttää niin laboratorio- kuin tuotantomittakaavassa. Proteiini A sitoutuu spesifisesti pääasiassa vasta-aineen Fc-alueelle, jättäen näin antigeenin sitoutumisalueet vapaaksi.¹⁰

Rekombinanttiproteiini A on valmistettu antamaan mahdollisimman korkean sitomiskapasiteetin. Proteiini tuotetaan *E. coli*ssa ja puhdistetaan monivaiheisella kromatografisella menetelmällä. Puhdistuksessa ei käytetä IgG:tä tai muita proteiineja. Puhdistettu rekombinanttiproteiini A testataan ja sen tulee täyttää asetetut spesifikaatiot ennen kuin sitä voidaan käyttää rProtein A Sepharose FF:n valmistuksessa.¹⁰

Perusmatriisi, Sepharose 4 FF, on erittäin ristiksidottu agarosijohdannainen. Sillä on hyvät kemialliset ja fyysiset ominaisuudet, joten se soveltuu hyvin jopa tuotantomittakaavan menetelmiin. Puhdistettu rekombinanttiproteiini A ja perusmatriisi sidotaan toisiinsa pysyvällä tioetterisidoksella. Sidostekniikalla saadaan aikaiseksi IgG:n korkea sitomiskapasiteetti.¹⁰

rProtein A Sepharose FF:n korkean kemiallisen pysyvyyden vuoksi se kestää hyvin ankariakin puhdistus- ja sanitointimenetelmiä.¹⁰

6.2 DELFIA immunoassay

DELFIA-määritys perustuu europiumkelaatin fluoresenssiin. Signaali mitataan vasta pienen aikaviiveen jälkeen virityksestä, eli mittaustapa on aikaerotteinen. Näin päästään eroon epäspesifisestä taustafluoresenssista. DELFIA-määritykseen kuuluvat komponentit ovat mikrolevy, vasta-aineet, leima, standardi, näytepuskuri (assay buffer), pesuliuos (wash concentrate) ja mittaliuos (enhancement solution). Komponenttien tehtävät määrittämisessä ovat:

- levyssä on reaktiokuopat, mihin toinen vasta-aine kiinnitetään
- vasta-aineet määrittelevät mikä analyytti mitataan
- leima on merkkiaine, jota voidaan mitata. Eli toiseen vasta-aineeseen kiinnitetään europium (tai mahdollisesti samarium, terbium, jne)
- standardi on mitattava analyytti tunnetuissa pitoisuuksissa
- näytepuskurilla saadaan aikaan oikeat reaktio-olosuhteet
- pesuliuoksella pestään häiritsevät tekijät pois
- mittaliuos muuttaa europiumin mitattavaan muotoon

Ennen mittausta mikrolevy pestään pesurilla. Kontaminaation välttämiseksi levyn jokainen kuoppa pestään erikseen. Pesun aikana kuopasta poistuu kaikki ylimääräinen ja kuoppaan jää vain sen pintaan kiinnittyneet leimatut vasta-aineet tai antigeenit. Tämän jälkeen kuoppiin annostellaan mittaliuosta, joka irrottaa eli dissosioi kuopan seinämille kiinnittyneen europiumin. Europiumista muodostuu tällöin fluoresoiva kelaatti. Tämän jälkeen levyt voidaan mitata aikaerotteisella mittausrakenteella, kuten DELFIA fluorometrillä tai Victor-määrityslaitteella.⁷

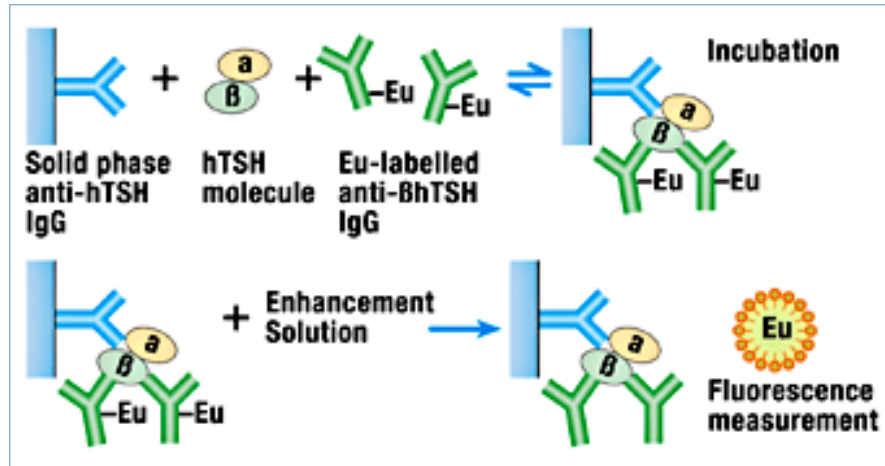
Mittauksen aikana näytelevyn kuopassa oleva liuos eksitoidaan eli viritetään lampun valopulsseilla. Kun europiumkelaatti viritetty, sen energiataso kasvaa hetkellisesti. Liuos säteilee eli emittoi valoa viritystilan purkautuessa. Valon emittoimista kutsutaan fluoresenssiksi. Mikrolevyn ja lampun välissä on

suodattimia ja linsejä. Niiden avulla saadaan viritysvaalo oikean suuntaiseksi ja oikeaksi aallonpituudeksi. Myös kuopasta emittoituva säteily ohjataan linssien ja suodattimien läpi. Säteily johdetaan valomonistimelle, jossa valomonistinputki monistaa pienen valomäärän noin miljoonakertaiseksi ja muuttaa sen sähköisiksi pulsseiksi eli signaaleiksi. Aikaerotteisen mittaustavan mukaan valomonistimelta saatua pulssimäärää aletaan mitata vasta 400 μ sekunnin kuluttua virityspulssin aloittamisesta. Mittaus kestää myös 400 μ sekuntia ja mittauksen jälkeen on 200 μ sekunnin tauko ennen kuin uusi virityspulssi alkaa. Mittauksia tulee noin 1000 yhtä näytekupaa kohden. Saatu signaaliarvo on kuopan kaikkien mittauksien summa. Aikaerotteisella menetelmällä päästään eroon taustaemissiovalosta ja myös ns. ”nopeasta fluoresenssista”, jota monet aineet emittoivat niitä viritettäessä. Näin mitataan vain halutun kelaatin emittoimaan valoa.⁷

Delfia-määritykset voivat olla joko IFMA-tyyppisiä, jossa signaali kasvaa pitoisuuden kasvaessa tai FIA-tyyppisiä, jossa signaali laskee määritettävän yhdisteen pitoisuuden kasvaessa. IFMA-määrityksissä vasta-ainetta on suuri ylimäärä antigeeniä kohti, kun taas FIA-määrityksissä leimattu antigeeni kilpailee näytteen kanssa.⁷

6.2.1 IFMA-määritys

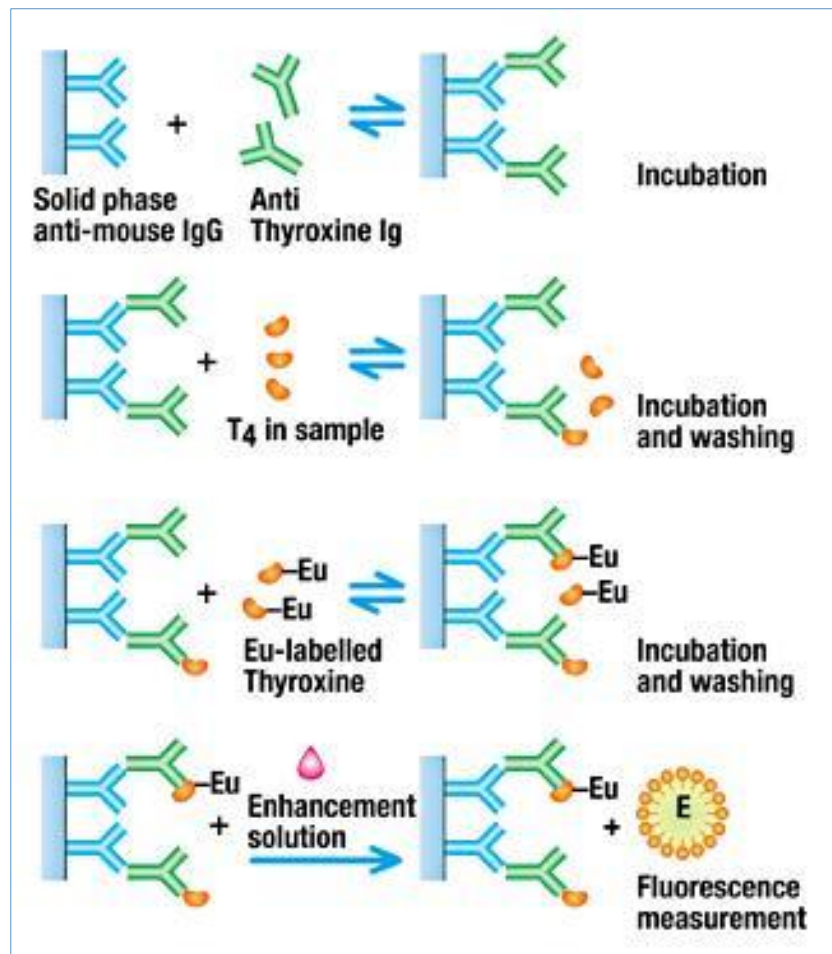
IFMA-määrityksissä on mikrolevyn kuopan pintaan kiinnitetty spesifinen vasta-aine (kuvassa 5. solid phase eli kiinteä faasi). Standardia tai näytettä lisättäessä siinä oleva antigeeni sitoutuu spesifisesti pinnan vasta-aineeseen. Antigeenin sitouduttua kuoppaan lisätään europiumilla leimattu toinen spesifinen vasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin. Näytteen sisältämä antigeenipitoisuus on suoraan verrannollinen pintaan sitoutuneen leimatun vasta-aineen määrään. IFMA-määrityksille on tyypillistä matala tausta ja standardikuvaajan lineaarisuus laajalla alueella. Lisäksi määrityksissä antigeenin koon on oltava niin suuri, että se pystyy sitomaan kaksi eri vasta-ainetta.⁷



Kuva 5. IFMA-määritys.¹¹

6.2.2 FIA-määritys

FIA-määrityksessä, eli kilpailevassa määrityksessä, tietty määrä spesifistä vasta-ainetta sidotaan mikrolevyn kuopan pintaan (kuvassa 6. solid phase eli kiinteä faasi). Vasta-aine sidotaan joko toisen vasta-aineen tai streptaviini-biotiini -reaktion avulla. Standardissa tai näytteessä oleva antigeeni kilpailee europium-leimatun antigeenin kanssa spesifisen vasta-aineen sitomispaikoista. Näytteen antigeenipitoisuuden mukaan määräytyy, kuinka paljon leimattua antigeeniä sitoutuu. Eli mitä korkeampi näytteen antigeenipitoisuus on, sitä vähemmän leimattua antigeeniä sitoutuu. FIA-määrityksissä olennaista on, että hyvin pieni signaalitason muutos voi aiheuttaa suuren muutoksen pitoisuudessa. Lisäksi standardikuvaajan muoto on erittäin tärkeä. Määrityksiä käytetään enimmäkseen pienimolekyylisillä yhdisteillä.⁷



Kuva 6. FIA-määritys.¹¹

6.2.3 Työn FIA-määritys

Tässä työssä määritettiin pylvään läpi tulleen materiaalin vasta-ainepitoisuutta FIA-määrityksellä. Määritys tehtiin kaupallisilla Neonatal IRT kit -reagensseilla (Wallac, KA005-110), joita käytettiin soveltuvien osin.

6.3 Isoelektrinen fokusointi

Isoelektrinen fokusointi (IEF) on elektroforeesin muoto, missä erotetaan molekyylejä niiden isoelektrisen pisteen mukaan. IEF suoritetaan yleensä geelissä, jossa on pH-gradientti. Katodilla on korkeampi pH kuin anodilla.¹²

pH:ta, missä molekyylillä ei ole varausta, sanotaan isoelektriseksi pisteeksi (pI). Proteiinit ovat positiivisesti varautuneita pH:ssa, joka on alle niiden pI:n, ja negatiivisesti varautuneita pH:ssa, joka on yli pI:n.¹² Proteiinit liikkuvat varauksensa mukaan kunnes ne saavuttavat pH:n missä niiden varaus on nolla, eli niiden isoelektrisen pisteen. Tässä pH:ssa proteiinit eivät enää etene geelillä vaan konsentroituvat tai fokusoituvat kapeiksi vyöhykkeiksi geelille.¹³

IEF:ää ei yleensä käytetä puhdistusprosessin seurantaan, mutta se on yleisesti käytetty menetelmä lopullisen puhdistetun tuotteen karakterisoinnissa. Proteiinin puhtaudesta saadaan paljon selville, kun menetelmää käytetään yhdessä SDS-PAGE:n kanssa. IEF:n avulla selvitetään proteiinin varauksen yhtenäisyys ja SDS-PAGE:n avulla saadaan selville proteiinin koon yhtenäisyys.

¹³

6.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE:ssa molekyylit eroavat niiden koon perusteella ja sen avulla saadaan myös selville proteiinien molekyylipaino. Ajo tapahtuu vertikaalisessa kaksiosaisessa polyakryyliamidigeelissä.¹⁴

Ennen ajoa proteiinit denaturoidaan anionisella detergentillä natriumdodekyylisulfaatilla (SDS) ja pelkistävällä reagenssilla, kuten esimerkiksi merkaptoetanolilla. Merkaptoetanolilla hajottaa proteiinien rikkisillat. Proteiinit liikkuvat geelissä molekyylipainonsa mukaisesti, koska SDS-molekyylien suuri negatiivinen varaus peittää proteiinien alkuperäisen varauksen.¹⁴

Ajon jälkeen geeli värjätään proteiinia sitovilla väriaineilla, jolloin nähdään syntyneet vyöhykkeet. Geeli voidaan värjätä myös hopeavärillä. Proteiinien molekyylipainot saadaan selville, vertaamalla niiden liikkuvuutta tunnettujen proteiinien, eli molekyylipainostandardien, liikkuvuuteen samassa ajossa.¹⁴

SDS-PAGE:n pelkistävässä oloissa vasta-aineen kevyt- ja raskasketjut eroavat toisistaan, jolloin geelillä on nähtävissä kummastakin yksi vyöhyke. Jos vasta-aine on puhdasta, geelillä on nähtävillä vain kaksi vyöhykettä.⁶

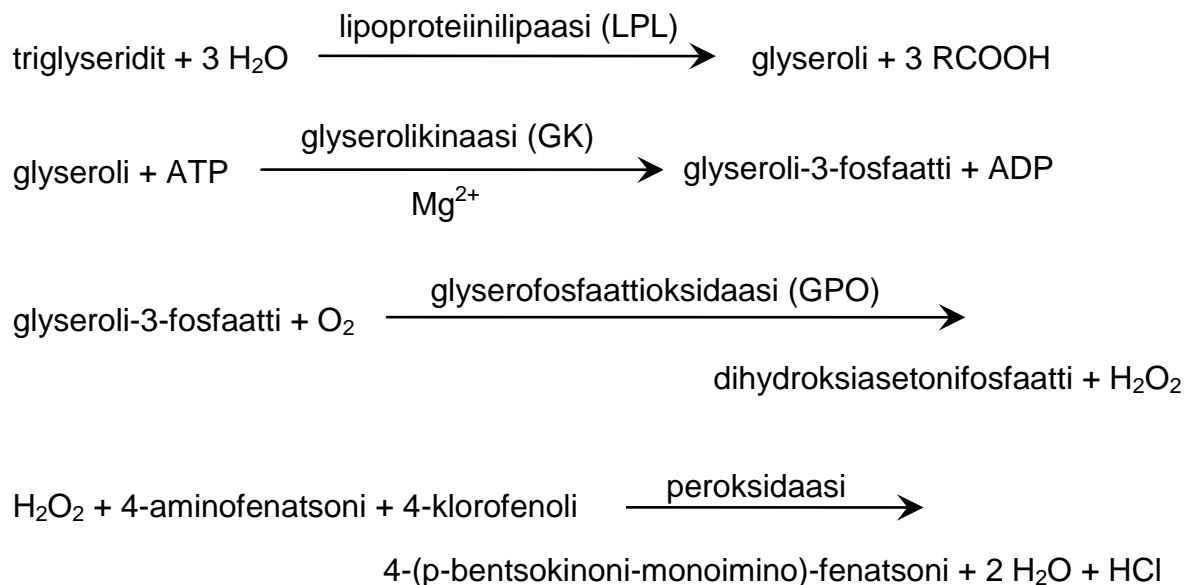
6.5 Proteiinien määrittäminen Bradfordin menetelmällä

Bradfordin menetelmä perustuu Coomassie® Brilliant Blue G-250 -värin kiinnittymiseen proteiinissa. Happamassa liuoksessa vapaan värin absorptiomaksimi on 465 nm:ssä. Kun väri kiinnittyy proteiiniin, niin absorptiomaksimi siirtyy 595 nm:iin. Värimuodostus on pysyvä ja nopea. Coomassien sininen väri sitoutuu pääasiassa emäksisiin ja aromaattisiin aminohappotähteisiin. Määrittämenetelmä on kolorimetrinen.¹⁵

Tässä työssä määrittämiseen käytettiin kaupallista proteiini-reagenssisarjaa Bio-Rad Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad Laboratories).

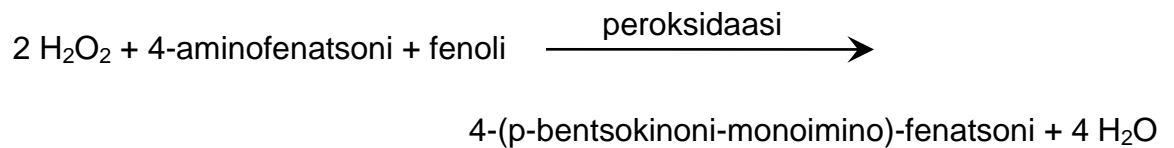
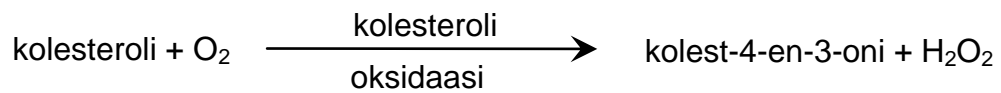
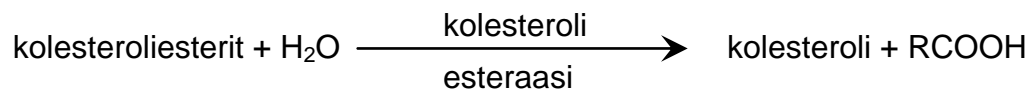
6.6 Triglyseridien määrittäminen

Triglyseridit määritettiin tässä työssä GPO-PAP -menetelmällä, käyttämällä kaupallista triglyseridireagenssia TG Cobas® (Roche Diagnostics). Reaktiossa syntyvä lopputuote mitattiin aallonpituudella 500 nm. Menetelmä on entsymaattinen:



6.7 Kolesterolin määrittäminen

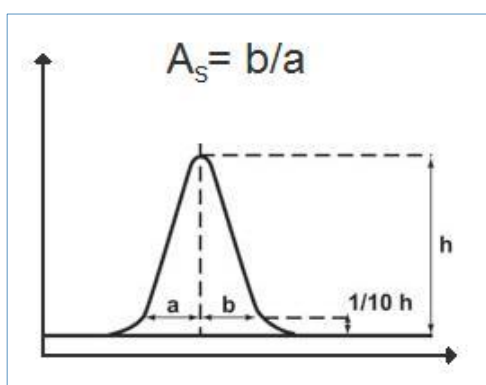
Kolesterolia määritettiin tässä työssä CHOD-PAP -menetelmällä, käyttämällä kaupallista kolesterolireagenssia CHOL Cobas® (Roche Diagnostics). Reaktiossa syntyvä lopputuote mitattiin aallonpituudella 500 nm. Menetelmä on entsyymaattinen:



7 TYÖN SUORITUS

CIP-menetelmää testattiin pylväällä, jolla puhdistetaan anti-IRT 14F10 vastaainetta (35 ml:n rProtein A FF pylväs). IRT on lyhenne sanoista immunoreaktiivinen trypsiini. Määrityksissä immunoreaktiivista trypsiiniä käytetään toteamaan vastasyntyneestä kystinen fibroosi, joka on geneettinen sairaus, mikä aiheuttaa häiriöitä keuhkojen ja munuaisten toiminnassa.¹⁶

Työ aloitettiin tasapainottamalla pylväs säilytyspuskurilla. Pylvään kunnon määrittämiseksi tehtiin testaus ajamalla pylvääseen 1 % asetonia näytteeksi. Asetonin piikistä laskettiin asymmetriafaktori. Asymmetriafaktori lasketaan kuvan 7. osoittamalla tavalla.



Kuva 7. Asymmetriafaktorin laskeminen.

Tämän jälkeen ajettiin pylvääseen CIP-liuosta (0,1 M NaOH 40 %:ssa etanolissa) viiden pylvään tilavuuden verran. Testaukseen valittu CIP-liuos on GE Healthcaren suositusten mukainen. Ajon aikana kerättiin fraktioita. Fraktiot mitattiin spektrofotometrillä ja jaettiin kukin fraktio kolmeen osaan jatkomäärityksiä varten. CIP-käsittelyn jälkeen pylväs tasapainotettiin ensin suodatetulla sitomispuskurilla ja sen jälkeen säilytyspuskurilla. Kummatkin puskurit suodatettiin 0,22 μ m suodattimella. Lopuksi ajettiin pylvääseen

uudestaan 1 %:sta asetonia näytteeksi ja määritettiin asymmetriafaktori uudelleen.

Seuraavaksi CIP-käsittelyllä pylväällä tehtiin normaali vasta-aine-erän puhdistus. Puhdistuksen aikana otettiin pylvään läpi tullut sitoutumaton materiaali (flow through) talteen jatkomäärittelyä varten. Puhdistetusta vasta-aineesta ajettiin IEF- ja SDS-PAGE-geelit, lisäksi yhden ja kahden viikon säilyvyysgeelit kahdessa pisteessä (+35 °C ja -20 °C). Säilyvyysgeelit olivat IEF-ajoja.

CIP-käsittelyn aikana kerätyistä fraktioista määritettiin proteiini-, triglyseridi- ja kolesterolipitoisuus. Määritykset tehtiin mikrolevyillä ja mitattiin Victor-määrityslaitteella. Fraktioista ajettiin myös massaspektrit proteiinin tunnistamiseksi. Ajot tehtiin UPLC:n (Waters Acquity) ja massaspektrometrin (Bruker micrOTOF II) yhdistelmällä. Ajoihin käytettiin UPLC BEH300 C₄ (Waters Acquity) kolonnia.

Flow through:sta määritettiin pylvään läpi tulleen materiaalin vasta-ainepitoisuus spesifisellä DELFIA immunoassay -määritysmenetelmällä.

8 TULOKSET

8.1 Asetonitesti

Testi ajetaan aina uuden pylvään pakkauksen yhteydessä ja 10 puhdistusprosessin jälkeen. Wallac Oy:n asettamat hyväksymiskriteerit asymmetriafaktorille ovat 0,8 – 1,5. Taulukossa 3. on anti-IRT 14F10 pylvään asymmetriafaktorit.

Taulukko 3. Anti-IRT 14F10 -pylvään asymmetriafaktorit.

Asetonitesti	Asymmetriafaktori, A_s
Pylvään pakkauksen jälkeen	1,1
10 puhdistusprosessin jälkeen	1,5
Ennen CIP-käsittelyä (20 puhdistusprosessin jälkeen)	1,5
CIP-käsittelyn jälkeen	1,3

8.2 Vasta-aine-erän puhdistus

Jokaisen vasta-aine-erän puhdistuksen yhteydessä määritetään puhdistukselle saantoprosentti. Normaalisaantoprosentti on yli 70 %:a ja kaikki yli 80 %:n luokitellaan hyväksi saannoksi. CIP-käsitellyllä pylväällä puhdistettaessa saantoprosentiksi saatiin 92 %. Taulukossa 4. on samalla pylväällä (pakkauspäivä 10.11.09) aikaisemmin puhdistettujen erien saantoprosentteja sekä muutama toisella pylväällä (pakkauspäivä 10.08.10) puhdistettujen erien saantoprosentit. Kaikki puhdistukset ovat samasta vasta-ainevalmistuserästä.

Taulukko 4. Vasta-aine-erien saantoprosentteja.

Anti-IRT 14F10 pylväs, pakkauspäivä	Ajokerta	Saantoprosentti, %
10.11.2009	11	81
	12	100
	13	81
	14	97
	15	97
	16	90
	17	90
	18	95
	19	98
	20	83
10.8.2010	1	95
	2	97
	3	98
	4	89
	Keskiarvo	92,2

8.3 Flow through

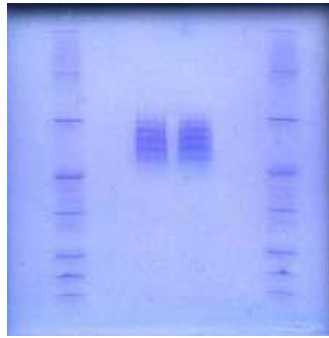
Flow through -määritys tehdään normaalisti vasta-aine-erän koepuhdistuksen yhteydessä. Tässä työssä määrityksellä selvitettiin onko pylvään sitomiskapasiteetti huonontunut CIP-käsittelyn seurauksena. Jos CIP-käsittely olisi vahingoittanut pylvään matriisia, ei vasta-aine olisi pystynyt sitoutumaan pylvääseen vaan olisi tullut liuoksen mukana pylvään läpi. Samalla DELFIA FIA-määrityksellä määritettiin kontrollina toimineen vasta-aineen sekä puhdistetun vasta-aineen pitoisuus. Taulukossa 5. on esitetty määrityksen tulokset. Pitoisuudet on esitetty keskiarvoina kolmesta rinnakkaisesta tuloksesta.

Taulukko 5. Flow through -määrityksen tulokset.

Näyte	Pitoisuus, mg/ml
Kontrolli: Anti-IRT 14F10, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine. lot. 603897	4,88
Flow through, puhdistuksen aikana talteen otettu sitoutumaton materiaali. lot.604994	0,03
Anti-IRT 14F10, CIP-käsitellyllä pylväällä puhdistettu vasta-aine. lot. 604994	4,49

8.4 IEF- ja SDS-ajot

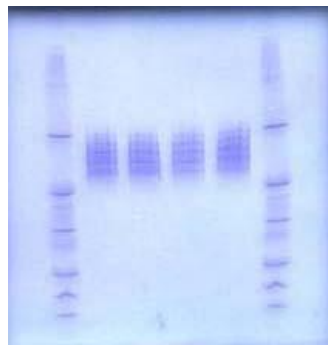
Puhdistusprosessin normaalin laadunvalvontaan kuuluu IEF-ajo. Koepuhdistuksen yhteydessä puhdistetusta vasta-aineesta ajetaan IEF ja SDS, sekä kahden viikon säilyvydet IEF-ajoina. Näitä koepuhdistuksen menettelyä sovellettiin tähän työhön laadunvalvonnan keinoiksi. Laadunvalvonnalla varmistetaan, ettei CIP-käsittely ole heikentänyt puhdistetun vasta-aineen laatua. Kuvat geeleistä ovat kuvissa 8 – 11.



Kuva 8. IEF-geeli 2769.

Kuvassa 8. näytteet ovat (järjestyksessä vasemmalta oikealle):

- pI-markkeri (GE Healthcare, 170471-01)
- anti-IRT 14F10 lot. 603897 (referenssi, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 604994 (testattava puhdistettu vasta-aine)
- pI-markkeri (GE Healthcare, 170471-01)

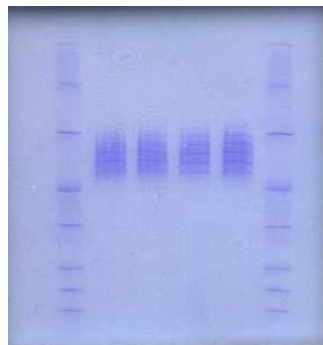


Kuva 9. IEF-geeli 2775, yhden viikon säilyvydet.

Kuvassa 9. näytteet ovat (järjestyksessä vasemmalta oikealle):

- pI-markkeri (GE Healthcare, 170471-01)

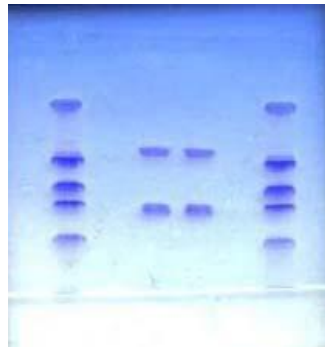
- anti-IRT 14F10 lot. 603897 (+35 °C, referenssi, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 604994 (+35 °C, testattava puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 603897 (-20 °C, referenssi, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 604994 (-20 °C, testattava puhdistettu vasta-aine)
- pI-markkeri (GE Healthcare, 170471-01)



Kuva 10. IEF-geeli 2780, kahden viikon säilyvydet

Kuvassa 10. näytteet ovat (järjestyksessä vasemmalta oikealle):

- pI-markkeri (GE Healthcare, 170471-01)
- anti-IRT 14F10 lot. 603897 (+35 °C, referenssi, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 604994 (+35 °C, testattava puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 603897 (-20 °C, referenssi, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 604994 (-20 °C, testattava puhdistettu vasta-aine)
- pI-markkeri (GE Healthcare, 170471-01)



Kuva 11. SDS-geeli 662.

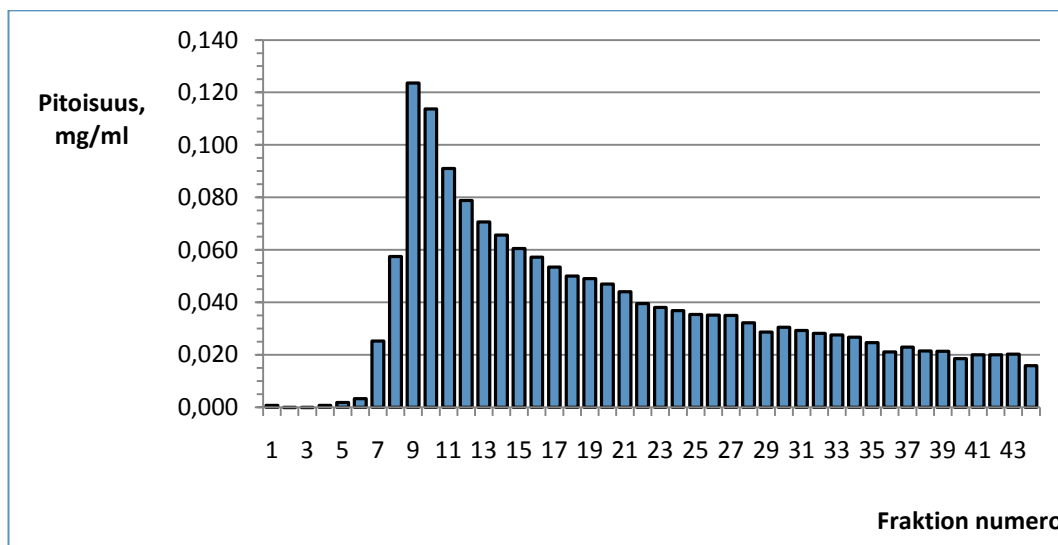
Kuvassa 11. näytteet ovat (järjestyksessä vasemmalta oikealle):

- LMW-markkeri (GE Healthcare, 17-0446-01)
- anti-IRT 14F10 lot. 603897 (referenssi, Wallac Oy:ssä tuotettu ja puhdistettu vasta-aine)
- anti-IRT 14F10 lot. 604994 (testattava puhdistettu vasta-aine)
- LMW-markkeri (GE Healthcare, 17-0446-01)

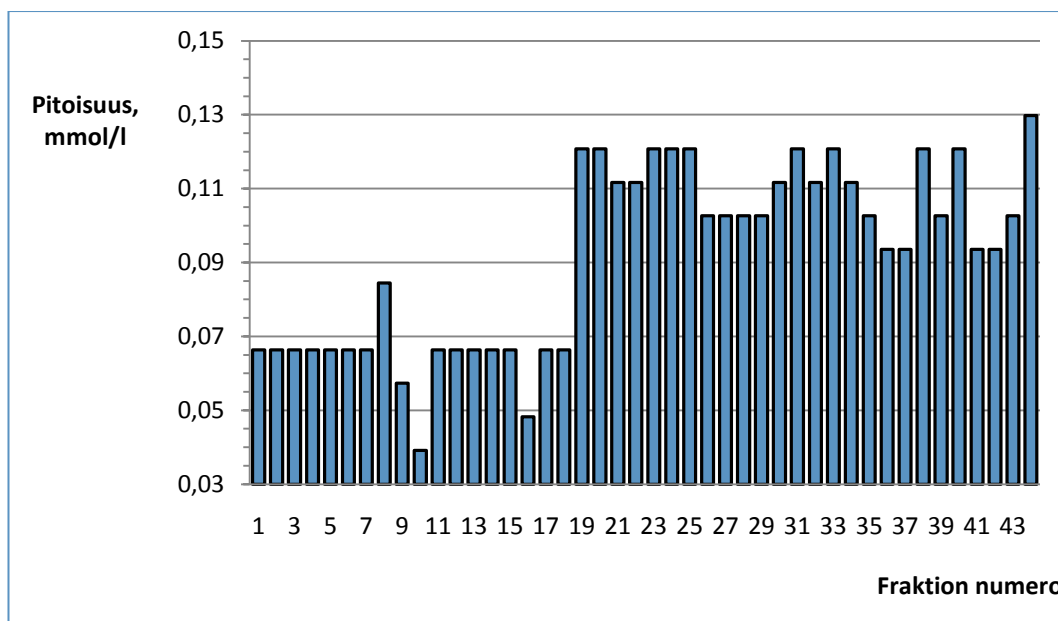
8.5 Fraktioiden määritykset

Fraktioista määritettiin proteiini-, triglyseridi- ja kolesterolipitoisuudet. Määrityksillä saatiin tietoa mitä epäpuhtauksia pylväs saattaa sisältää. Määritysten tulokset ovat taulukoissa 6 – 8.

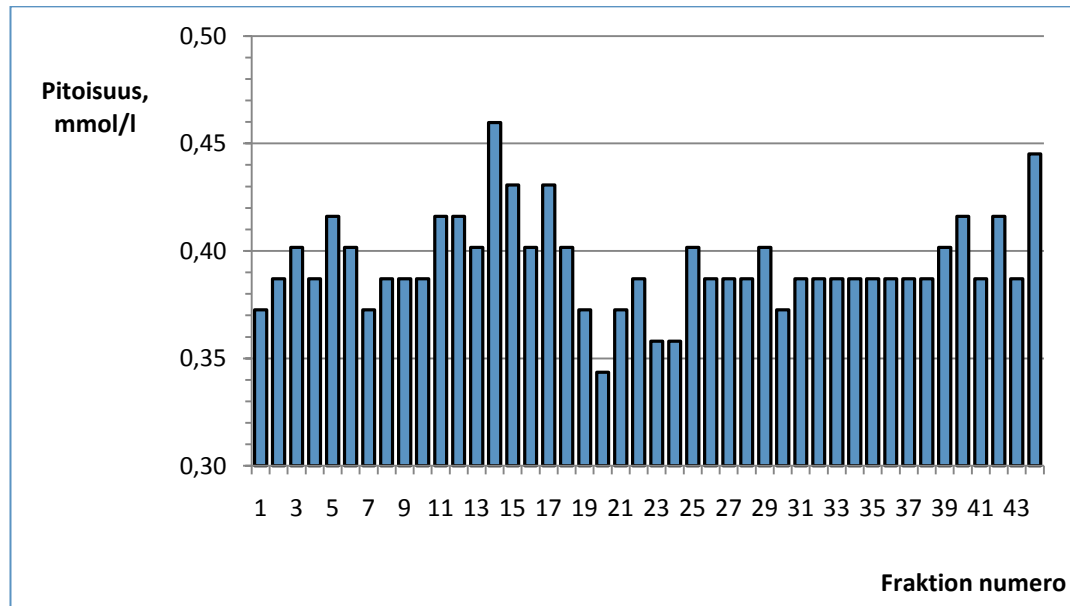
Taulukko 6. Proteiinipitoisuus.



Taulukko 7. Triglyseridipitoisuus.



Taulukko 8. Kolesterolipitoisuus.



8.6 MS-ajot

CIP-käsittelyn aikana kerätyistä fraktioista ajettiin massaspektrit. Ajoihin valittiin fraktiot, joilla olivat suurimmat proteiinipitoisuudet (fraktiot 8 – 15). Referenssinä ajoissa käytettiin pylväällä puhdistettua vasta-ainetta. Esimerkkejä ajojen massaspektreistä on liitteessä 1.

9 TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT

Asetonitestien perusteella voidaan todeta, että pylvään kunto ei ole huonontunut CIP-käsittelyn seurauksena. Kummatkin asymmetriafaktorit, ennen käsittelyä ja käsittelyn jälkeen, olivat sallituissa rajoissa, ja käsittelyn jälkeen määritetty asymmetriafaktori oli hieman parempi.

CIP-käsittelyn aikana kerätyistä fraktioista selvitettiin mahdollisia pylvään sisältämiä epäpuhtauksia. Määritysten perusteella voidaan todeta, että suurimmat epäpuhtaukset muodostavat pylvääseen jäävät proteiinit. Koska fraktioista määritetyt triglyseridi- ja lipidipitoisuudet olivat todella pieniä, voidaan todeta, että pylväässä ei ole kyseisiä epäpuhtauksia. Nämä epäpuhtaudet saadaan poistettua pylväästä normaalin regeneroinnin yhteydessä. Pylvääseen jääneet proteiinit saadaan irrotettua CIP-käsittelyllä. Fraktioista tehtyjen MS-ajojen perusteella ei pystytä varmasti sanomaan, mitä proteiinia fraktiot sisälsivät. Näytteiden välillä oli selkeitä eroja spektreissä. Osa näytteiden spektreistä muistutti referenssi vasta-aineen spektriä ja osa ei. Lisäksi muutamasta näytteestä ei saatu spektriä ollenkaan. Varmuudella ei pystytä sanomaan, että pylväästä CIP-käsittelyn aikana poistunut proteiini olisi vasta-ainetta. Jos oletetaan että kyseinen proteiini olisi vasta-ainetta, se tarkoittaisi, että kaikki pylvääseen normaalin puhdistusprosessin aikana sitoutunut vasta-aine ei poistu eluoinnin eikä regeneroinnin aikana. Tämän takia jokainen vasta-aine puhdistetaan omalla pylväällään, jolloin vältetään ristikontaminaatiolta.

Kaikki puhdistetusta vasta-aineesta ajettut IEF- ja SDS-geelit läpäisivät Wallac Oy:n laatuvaatimukset ja hyväksymiskriteerit, joten voidaan todeta, että CIP-käsittely ei vaikuta lopullisen tuotteen laatuun.

CIP-käsittelyllä pylväällä saatiin vasta-aine-erän puhdistuksessa saantoprosentiksi 92 %, joka ei poikkea normaaleista saantoprosenteista. Tästä voidaan päätellä, että CIP-käsittely ei vaikuta pylvään sitomiskapasiteettiin. Lisäksi puhdistuksen aikana talteen otettu pylvään läpi tullut sitoutumaton materiaali ei sisältänyt vasta-aineita, mistä voidaan myös päätellä sitomiskapasiteetin pysyneen normaalina.

Jos CIP-menetelmä halutaan ottaa käyttöön pylväiden normaalin huoltotoimenpiteisiin, tulee menetelmä validoida. Jotta validointiin kannattaa ryhtyä, tulisi menetelmää testata ensin monella eri pylväällä ja vaihtoehtoisesti eri puhdistusliuoksilla. Jokainen vasta-aine puhdistetaan omalla pylväällä, ja vasta-aineiden välillä on eroja, minkä takia menetelmää on hyvä testata monella pylväällä. Jos CIP-menetelmä otettaisiin käyttöön, saataisiin sillä aikaan huomattava kustannusten säästö. Pylväillä, joita käytetään paljon ja pakataan useita vuoden aikana, säästöt olisivat kymmeniä tuhansia euroja. Jos näiden pylväiden käyttöikä saataisiin kaksinkertaistettua, säästöt olisivat jo yli 15000 euroja. Jos käyttöikä saataisiin jopa kolminkertaistettua, säästöjä kertyisi yli 20000 euron verran. Niillä pylväillä, joita pakataan vain yksi pylväs kahden vuoden aikana, ei saada aikaan merkittäviä säästöjä CIP-menetelmällä pylvään geelin vanhenemisen takia. Liitteessä 2. on esitetty arvioituja kustannusten säästöjä.

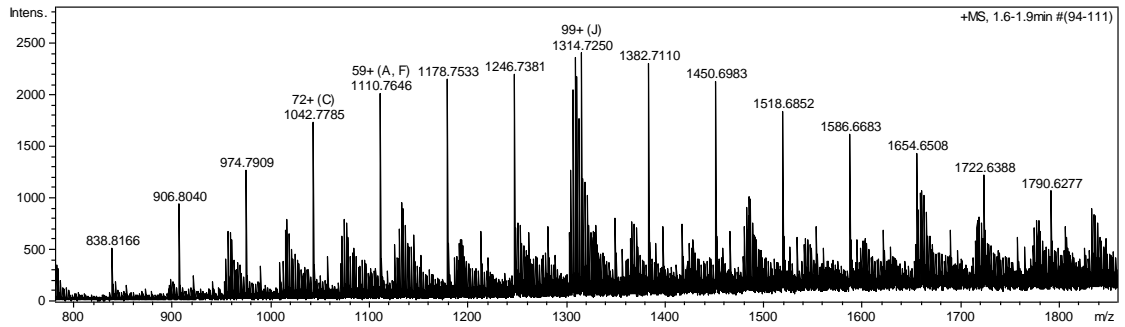
Lopputuloksena voidaan todeta, että rProtein A Sepharose FF kromatografiapylväs voidaan puhdistaa cleaning-in-place -menetelmällä.

LÄHTEET

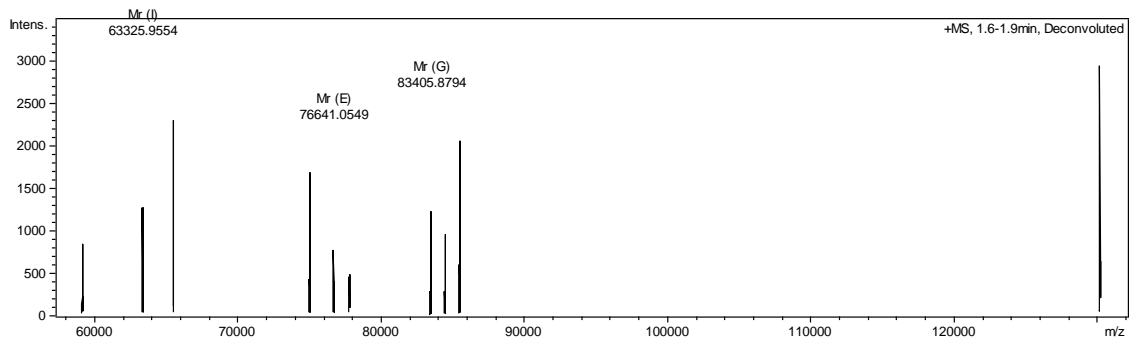
1. Immuunivaste [online, viitattu 01.11.10]. Saatavilla www-muodossa: <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/immuunipuolustus/>>
2. Valkosolut [online, viitattu 16.11.10] Saatavilla www-muodossa: <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/leukosyytit/>>
3. Mäkelä, O., Mäkelä P., Wager, O., Vaheri, A., Valtonen, V. (1983) Lääketieteellinen mikrobiologia. 4. painos, ss. 4 – 41. Suomalainen Lääkäriseura Duodecium, Suomi
4. Antibody Purification, 18-1037-46, Handbook Collection, GE Healthcare, CD-ROM
5. Vasta-aine [online, viitattu 1.11.10]. Saatavilla www-muodossa: <http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/16_adaptive_immune.htm>
6. Dr English, L. S. et al. (1994) Technological Applications of Immunochemicals. 1. painos, ss. 20 – 213. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, UK
7. Koulutusmateriaali, Wallac Oy
8. Hagel, L., Jagschies, G., Sofer, G. (2008) Handbook of Process Chromatography. 2. painos, ss. 147 – 158. Academic Press, London, UK
9. Affinity Chromatography, 18-1022-29, Handbook Collection, GE Healthcare, CD-ROM
10. rProtein A Sepharose Fast Flow, Instructions 71-5000-09 AC, GE Healthcare
11. DELFIA assay [online, viitattu 28.10.10]. Saatavilla www-muodossa: <<http://las.perkinelmer.de/applicationssummary/applications/DELFIAdesign.htm>>
12. Janson, J-C., Rydén, L. (1998) Protein Purification. 2. painos, ss.496, John Wiley & Sons, New York, USA
13. Harris, E.L.V., Angal, S. (1989) Protein Purification Methods. 5. painos, ss. 29. Oxford University Press, Oxford, UK

14. SDS-PAGE [online, viitattu 11.11.10] Saatavilla www-muodossa:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/
15. Proteiinien määrittäminen Bradfordin menetelmällä, työohje, Wallac Oy
16. Heinonen, S. (2005) Isoelektrisen fokuksionnin menetelmävalidointi vasta-aineiden laadunvalvontaan. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, Laboratorioalan koulutusohjelma

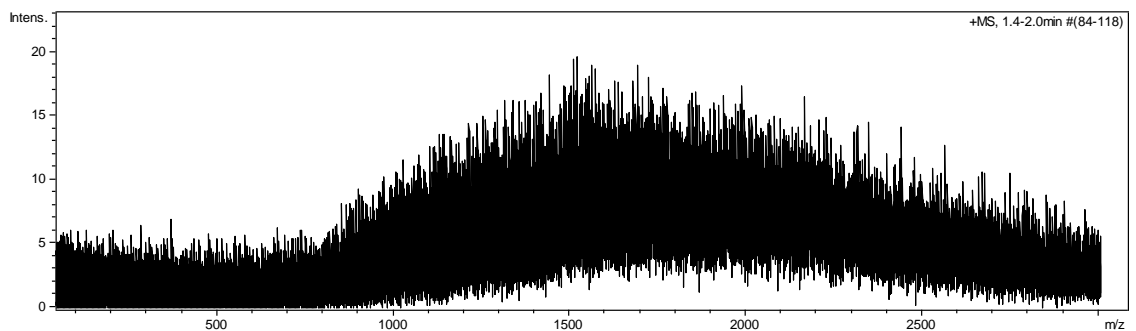
CIP-fraktioiden massaspektrit



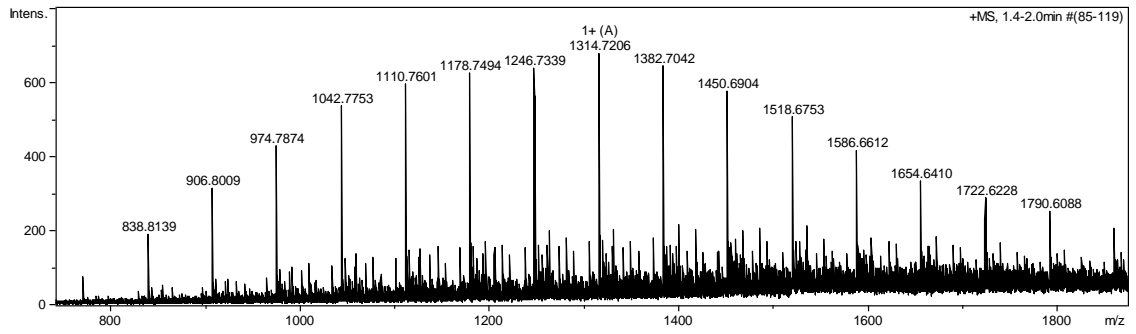
Spektri 1. Referenssi, anti-IRT 14F10, CIP-käsitellyllä pylväällä puhdistettu vasta-aine, lot. 604994.



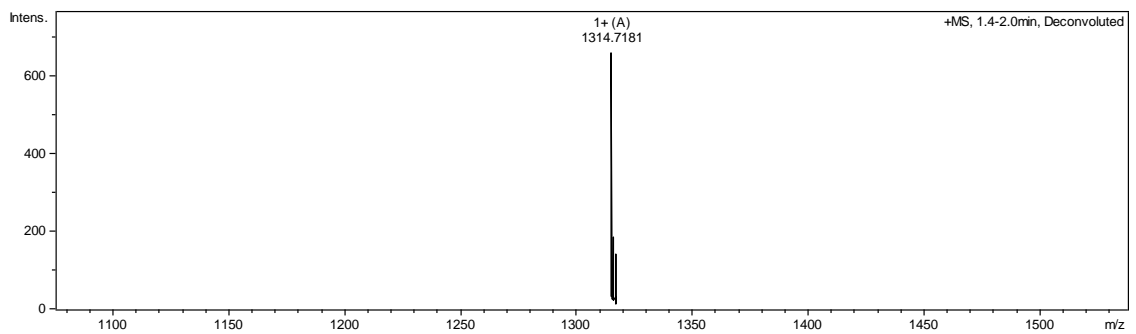
Spektri 2. Referenssi, anti-IRT 14F10, CIP-käsitellyllä pylväällä puhdistettu vasta-aine, lot. 604994.



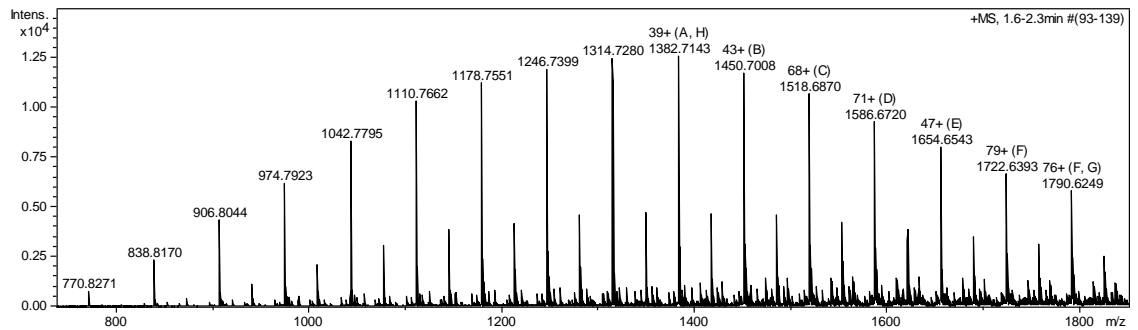
Spektri 3. CIP-fraktio numero 8.



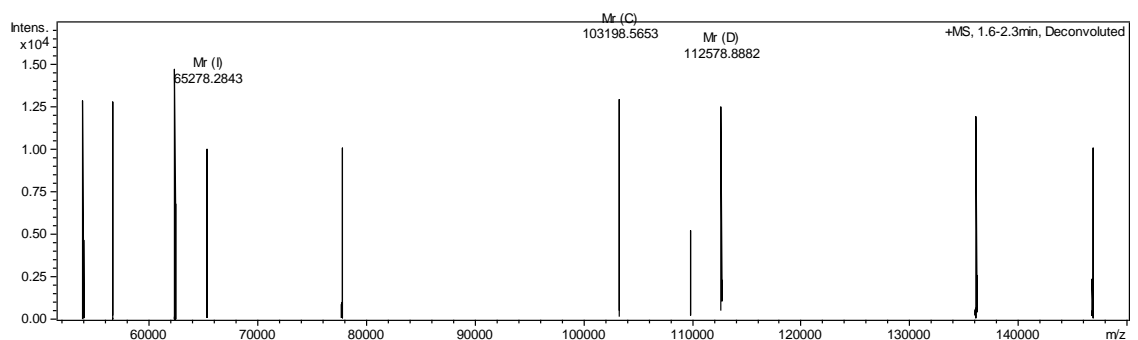
Spektri 4. CIP-fraktio numero 10



Spektri 5. CIP-fraktio numero 10.



Spektri 6. CIP-fraktio numero 13.



Spektri 7. CIP-fraktio numero 13.

rProtein A Sepharose Fast Flow geelin kulutus

Geelin hinta: 2062.25 € / 30 ml

Isojen pylväiden pakkaamiseen tarvitaan 35 ml / pylväs eli
pylvään kertapakkaamiskustannus on 2405.96 €

15 nimikkeellistä vasta-ainetta puhdistetaan tätä geeliä käyttäen:

7 vasta-ainetta näistä on sellaisia, joiden geelikulutus on suurta eli
2-3 pylvästä pakataan / v / vasta-aine eli yhteensä 14 – 21 pylvästä / v
Kustannus 33683.44 – 50525.16 € / v

Muilla 8 vasta-aineella 1 pylväs pakataan / 2 v → 0.5 / v

Kustannus 9623.84 € / v

Näiden pylväiden kohdalla ei merkittävästi säästöä saada geelin
vanhenemisesta johtuen.

Geelin vuosikustannus 7 eniten käytetyn pylvään osalta:

33683 - 50525 €	Nyt
16842 - 25263 €	Jos pakatun pylvään käyttöikä saataisiin 2-kertaiseksi →
<u>16841 - 25262 €</u>	SÄÄSTÖ
11789 - 16842 €	Jos käyttöikä 3-kertaiseksi →
<u>21894 - 33683 €</u>	SÄÄSTÖ

**Geelin vuosikustannus eniten käytetyn pylvään IRT 21-4:n osalta (5
pylvästä pakat. 3x / 2 v):**

18045 €	Nyt
9023 €	Jos pakatun pylvään käyttöikä saataisiin 2-kertaiseksi →
<u>9022 €</u>	SÄÄSTÖ
6015 €	Jos käyttöikä 3-kertaiseksi →
<u>12030 €</u>	SÄÄSTÖ