



Linnea Kivekäs

Puhdistusprosessin kehittäminen monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

15.5.2021

Tiivistelmä

Tekijä:	Linnea Kivekäs
Otsikko:	Puhdistusprosessin kehittäminen monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa
Sivumäärä:	32 sivua + 3 liitettä
Aika:	15.5.2021
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Prosessipäällikkö Anita Kopperi Lehtori Tiina Soininen

Natriumatsidia (NaN_3) käytetään yleisesti kemiallisena säilöntäaineena laboratorioissa. Sen käyttöön liittyy kuitenkin turvallisuusriskejä kemikaalin myrkyllisyyden kannalta. Natriumatsidi aiheuttaa pitkäaikaisessa altistumisessa vähäisillekin määriille terveyshaittoja ja kuormittaa ympäristöä. Opinnäytetyö toteutettiin monoklonaalisia vasta-aineita tuottavassa suomalaisessa yrityksessä, jossa natriumatsidia käytetään lopputuotteiden ja puskuriliuosten säilöntäaineena.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, voidaanko vasta-aineiden puhdistusvaiheessa käytettävä natriumatsidi jättää pois puskuriliuoksista ja lisätä se vasta lopputuotteeseen. Tavoitteen onnistuessa prosessimuutoksen myötä voitaisiin vähentää merkittävästi natriumatsidin kulutusta ja samalla työturvallisuus paranisi. Toisena tavoitteena oli tutkia, kuinka pitkään tutkittava puskuriliuos säilyy ilman natriumatsidia.

Työ koostui validointisuunnitelmasta, työn teoreettisen taustan tarkastelusta ja kvalitatiivisesta tutkimuksesta laboratoriossa. Tutkimuksia varten tehtiin yhteensä 12 puhdistusta kahdella eri vasta-ainepitoisuudella ja näytemäärällä. Kaikista näytteistä otettiin laadunvalvontanäytteet laadunvalvontalaboratoriolle analysoitavaksi. Jokaisen näytteen tuli olla näytekohtaisten tuotespesifikaatioiden mukainen. Puskuriliuoksista valittiin neljä yrityksessä käytetyintä liuosta reaaliaikaisiin säilyvyyskoemittauksiin. Näytteet lähetettiin SynLabille analysoitavaksi neljän viikon välein kolmen kuukauden ajan.

Tutkimuksessa havaittiin, ettei natriumatsidin lisäys lopputuotteisiin aiheuttanut tuotteiden laatuun merkittäviä muutoksia. Suurimmat eroavaisuudet tuloksissa tulivat immunoreaktiivisuusmäärityksissä, kun tuloksia verrattiin nykyisen menetelmän mukaan tuotettuun vasta-ainereferenssiin. Kaikki laadunvalvonnan testit tutkittavien näytteiden kohdalla olivat kuitenkin tuotespesifikaatioiden mukaiset. Myös puskuriliuosten reaaliaikaisten säilyvyyskokeiden tulokset kolmen kuukauden ajalta olivat negatiiviset. Säilyvyyskokeita jatketaan vielä kolmen kuukauden ajan, mutta prosessimuutoksen hyväksymisen jälkeen, uusi prosessikaavio voidaan ottaa käyttöön laboratoriossa saatujen testitulosten perusteella.

Avainsanat: monoklonaaliset vasta-aineet, affiniteettikromatografia, natriumatsidi

Abstract

Author: Linnea Kivekäs
Title: Process Development
in Monoclonal Antibody Purification
Number of Pages: 32 pages + 3 appendices
Date: 15 May 2021

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Instructors: Anita Kopperi, Process Manager
Tiina Soininen, Senior Lecturer

Sodium azide (NaN_3) is commonly used as a chemical preservative in laboratories. It is extremely toxic and will cause health issues and harm to the environment. This thesis work was conducted in the production unit of monoclonal antibodies in a Finnish biotechnology company where sodium azide is used in antibody purification process with buffer solutions preservative.

The aim of the thesis work was to investigate whether sodium azide could be omitted from the buffer solutions and be added to the final product at the end of the process. With this process change, the consumption of sodium azide in the laboratory would be significantly reduced and safety at work would be improved. The second aim was to investigate how long the shelf life in the buffer solutions without sodium azide is.

This thesis work consisted of validation project, literature review and empirical research at the laboratory. The antibody samples used in the research were selected in the validation project. There were 12 samples with two different concentrations and milligram amount of antibody. Test samples were taken from all the samples to quality control laboratory and each sample had to be within the product specifications. The four most used buffer solutions were selected to a real-time shelf life testing and the samples were sent to SynLab every four weeks for three months.

It was found that adding the sodium azide to the final product did not cause any changes in product quality. Only immunoreactivity in samples was lower when the results were compared to a reference sample. However, all samples met the quality specifications in every quality control test. The results of a real-time shelf life test were negative in all buffer solutions for a period of three months. Shelf-life tests will be continued for another three months. Based on the test results, a new process can be used after the process change is accepted.

Keywords: Monoclonal antibodies, Affinity chromatography, Sodium azide

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työturvallisuus ja kemikaalit	2
2.1	Työturvallisuus	2
2.2	Natriumatsidi (NaN_3)	3
3	Vasta-aineet	4
3.1	IgG-vasta-aineet ja alaluokat	4
3.2	Monoklonaalisten vasta-aineiden (MAb) tuotto ja puhdistus	6
3.3	Vasta-aineiden käyttö	8
4	Vasta-aineiden puhdistusprosessin muutostavoitteet	9
5	Laadunvalvonta (QC)	11
5.1	Laadunvalvonta ja sen merkitys	11
5.2	Yrityksessä käytettävät laadunvalvontatestaukset	12
6	Projektissa käytetyt materiaalit ja menetelmät	13
6.1	Vasta-aineen puhdistus ja lopputuotteen valmistus	13
6.1.1	Puskuriliuos ilman natriumatsidia	14
6.1.2	Supernatantin käsittely	15
6.1.3	Vasta-aineiden puhdistus affiniteettikromatografisesti (AC)	15
6.1.4	Fraktion käsittely ja dialysointi	17
6.1.5	Lopputuotteen käsittely ja natriumatsidin lisäys	18
6.2	Laadunvalvonnan testaukset näytteille	18
6.3	Reaaliaikaiset säilyvyyskokeet puskuriliuoksille	19
7	Tulokset	20
7.1	Tutkittavan vasta-aineen puhdistustulokset	20
7.2	Laadunvalvonnan (QC) tulokset	22
7.2.1	Immunoreaktiivisuus	23
7.2.2	IEF-profiili (Iso Electric Focusing)	23
7.2.3	IgG-puhtausmääritys	26

7.2.4	Homogeenisuusmääritys	27
7.3	Reaaliaikaiset säilyvyyskokeet puskuriliuoksille	28
8	Yhteenveto ja päätelmät	30
	Lähteet	32
	Liitteet	
	Liite 1: Laadunvalvonta-testit ja tuotespesifikaatiot puhdistettavalle vasta-aineelle	
	Liite 2: Lopputuotteen konsentraation raja-arvot	
	Liite 3: Yhteenveto laadunvalvonnan testituloksista	

Lyhenteet

- AC: *Affinity Chromatography*. Affiniteetikomatografia.
- ATP: *Adenosine triphosphate*. Adenosiinitrifosfaatti.
- Cfu: *Colony-forming unit*. Pesäkkeen muodostava yksikkö mikrobiologiassa.
- cIEF: *Capillary Isoelectric Focusing*. Kapillaari-isoelektrinen fokusointi.
- CIP: *Clean-in-place*. Puhdistusmenetelmä, esimerkiksi laitteiden automaattiseen puhdistamiseen.
- CLED: *Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar*. Kystiini-laktoosi-agar elatusaine.
- CRP: *C-reactive protein*. C-reaktiivinen proteiini.
- CV: *Column volume*. Kromatografiapylvään tilavuus.
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*. Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.
- Fab: *Fragment Antigen-binding*. Antigeenin sitoutumiskohta vasta-aineessa.
- Fc: *Fragment Crystallizable*. Vasta-aineen rakenneosajoka koostuu raskasketjuista.
- FDA: *Food and Drug Administration*. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto.
- HC: *Heavy chain*. Vasta-aineen rakenteen raskasketju.

- HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
- Ig: *Immunoglobulin*. Immunoglobuliini.
- IVD: *In vitro* -diagnoosiikka.
- LC: *Light chain*. Vasta-aineen rakenteen kevytketju.
- MAb: *Monoclonal Antibodies*. Monoklonaaliset vasta-aineet.
- PDA: *Photodiode Array Detector*. Diodirividetektor.
- QC: *Quality Control*. Laadunvalvonta.
- QSR: *Quality System Regulation*. Laatujärjestelmän säätely.

1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin suomalaisessa bioteknologia-alan yrityksessä monoklonaalisten vasta-aineiden tuotanto-osaston kromatografian laboratoriossa. Yritys tuottaa ja kehittää immunodiagnostisia raaka-aineita sekä diagnostisia testejä, joita käytetään esimerkiksi terveydenhuollossa. Yritys toimii maailmanlaajuisesti, se on sertifioitu kansainvälisen ISO 13485 -standardin mukaisesti ja se noudattaa toiminnassaan FDA:n (Food and Drug Administration) QSR-vaatimuksia (Quality System Regulation). [1.]

Natriumatsidi (NaN_3) on myrkyllinen ja terveydelle haitallinen kemikaali, minkä vuoksi sen käsittely vaatii erityistä huomiota. Se on kuitenkin yleisesti käytetty säilöntäaine laboratorioissa, sillä se estää tehokkaasti mikrobikasvustojen muodostumista [2]. Vasta-ainetuotannossa käytetään natriumatsidia puskuriliuoksissa parantamaan liuosten ja vasta-aineiden säilyvyyttä. Tällä hetkellä natriumatsidia lisätään puskuriliuoksiin liuosten valmistusvaiheessa, jolloin käsiteltävien puskuriliuosten määrät voivat olla useita kymmeniä litroja. Työssä tehtiin koeasetelma, jossa puhdistettiin tutkimukseen valittua vasta-ainetta affiniteetikromatografia-menetelmällä ja laadunvalvonnassa määritettyjä tuloksia analysoitiin kvalitatiivisesti.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, voidaanko natriumatsidi lisätä lopulliseen lopputuotteeseen vasta puskurinvaihdon jälkeen, jolloin natriumatsidia ei tarvitsi lisätä suuriin puskuriliuosmääriin ja natriumatsidin kulutus sekä käsittelyaika laboratoriossa saataisiin lyhyemmäksi. Tämän tavoitteen toteutuessa saataisiin turvallisempi työympäristö ja työvaiheet laboratorion työntekijöille sekä kehitettyä ympäristöystävällisempi menetelmä natriumatsidin käyttömäärän vähentyessä. Työn toisena tavoitteena oli määrittää ilman natriumatsidia olevien puskuriliuosten säilyvyysaika. Tätä varten tehtiin reaaliaikaiset säilyvyyskoemittaukset valituille puskuriliuoksille neljän viikon välein kolmen kuukauden ajan ja näyttöiden ottoa tullaan vielä jatkamaan opinnäytetyön jälkeen.

2 Työturvallisuus ja kemikaalit

2.1 Työturvallisuus

Työssä käyvistä ihmisistä yli puolet altistuu kaasuille, pölyille tai kemiallisille aineille. Suurin ammattitauteihin altistava tekijä sekä terveysuhka on työpaikoilla käytettävät kemikaalit. Vaikka kemiallisille aineille altistuminen työympäristössä aiheuttaa harvoin äkillisiä oireita, pitkäaikaisella altistumisella kemiallisille aineille pienissäkin pitoisuuksissa voi olla kroonisia sairauksia aiheuttava vaikutus. [3.]

Turvallisen työskentelyn edellytyksenä on laboratoriossa käytössä olevien kemikaalien turvalliset käyttötavat sekä niiden ominaisuuksien tunteminen. Kemikaaleilla voi olla ympäristölle sekä terveydelle haitallisia vaikutuksia, ja ne voivat aiheuttaa räjähdys- tai tulipalovaaran, esimerkki tällaisesta kemikaalista on natriumatsidi. Vaarallisuus riippuu käytettävän kemikaalin käyttötavoista, -määristä sekä sen yleisistä ominaisuuksista. Jokaisella kemikaalilla on olemassa käyttöturvallisuustiedote, joka tulee olla nähtävillä työpaikalla. Käyttöturvallisuustiedotteesta selviää ohjeet kemikaalin käytöstä sekä hävittämisestä turvallisesti, ja sitä tarvitaan työpaikalla myös kemikaaliriskiarvioinnissa [4]. Vaaralliset kemikaalit tulee aina säilyttää laboratoriossa lukollisessa kemikaalikaapissa.

Työpaikalla tulee tunnistaa kemialliset vaaratekijät sekä työntekijöiden mahdollinen altistuminen kemikaaleille. Kemialliset riskit tulee arvioida ja laittaa tärkeysjärjestykseen ja päättää sekä toteuttaa mahdolliset toimenpiteet vaaratilanteiden ja altistumisten ennaltaehkäisemiseksi. Lisäksi tulee varmistaa, että kemikaaleja käsittelevillä työntekijöillä on tarpeeksi riittävä perehdytys sekä ohjeet kemikaaliturvallisuudesta ja työtavoista. Kemikaaleja käsittelevässä työpaikassa tulee seurata jatkuvasti edellä mainittuja asioita turvallisuuden ylläpitämiseksi [4]. Kemikaalien kanssa toimimiseen on asetettu myös *kemikaalilaki* (744/1989), jonka tavoitteellisena tehtävänä on torjua ja ennalta ehkäistä kemikaaleista aiheutuvia terveys- tai ympäristöhaittoja [5].

2.2 Natriumatsidi (NaN_3)

Natriumatsidia käytetään yleisesti sairaaloissa sekä laboratorioissa kemiallisena säilöntäaineena. Se on voimakas hapettaja ja ehkäisee näin ollen tehokkaasti mahdollisten bakteerikasvustojen muodostumista [2]. Natriumatsidi on atsidi-suola ja epäorgaaninen yhdiste, joka on kiinteässä muodossaan hajuton ja väritön. Sillä on korkea kiehumispiste ja sen sulamispiste on 275°C . Korkean kiehumis- ja sulamispisteensä vuoksi syntyville aerosoleille altistuminen on yleistä laboratorioissa, joissa natriumatsidia käytetään. Happamissa olosuhteissa natriumatsidi voi muodostaa kaasumaista ja vaarallista vetyatsidia. Muodostunut höyry on vaarallisinta suljetuissa paikoissa, joissa ilma ei vaihdu kunnolla eikä kaasu pääse poistumaan tilasta. Natriumatsidi on myrkyllinen ja terveydelle sekä ympäristölle haitallinen aine, ja se voi aiheuttaa räjähdysvaaran joutuessaan kosketuksiin kiinteiden metallien kanssa [6]. Natriumatsidia pidetään myös metabolisena inhibiittorina [7]. Se inhiboi oksidatiivista fosforylaatiota eli solujen aineenvaihduntaa ja estää solujen hapen saantia, jolloin esimerkiksi elektronien siirtäminen substraatilta hapelle häiriintyy ja energian saanti ATP:n eli adenosiinitrifosfaatin valmistamiseksi estyy [8].

Yleisimpiä lyhytaikaisen altistumisen oireita, jotka ilmenevät lyhytkestoisen natriumatsidipölylle tai kaasulle altistumisen seurauksena ovat päänsärky, yskä, kirkkaan liman erityys nenästä, silmien punotus, ihoärsytys, pahoinvointi sekä heikotus [6]. Pitkän aikajakson jatkuvalla altistumisella voi olla herkistäviä vaikutuksia, jolloin oireita saattaa jatkossa ilmetä jo pienille määrille altistumisen seurauksena.

Natriumatsidin myrkyllisyyden vuoksi, sen käyttöä on hyvä pyrkiä välttämään mahdollisuuksien mukaan. Vaikka natriumatsidi on kemiallisena säilöntäaineena tehokas, sen tilalle voitaisiin harkita toista säilöntäainetta, joka ei aiheuttaisi vakavia terveys- tai ympäristöhaittoja. Tällaisia säilöntäaineita ovat esimerkiksi erilaiset biosidivalmisteet, kuten ProClinTM joita käytetään *in vitro* -diagnostiikassa (IVD). Esimerkiksi Lee Biosolutions käyttää ProClinia säilöntäaineena

tuotteissaan [9]. Ne ovat vesiliukoisia ja käyttövalmiita nesteitä, joilla ei ole terveyshaittoja, toksikologisia ongelmia tai hävittämisiongelmiä suositelluilla käyttö-tasoilla. Ne eivät estä vasta-aineiden sitoutumista, ja ne pysyvät vakaana laa-jalla pH-alueella [10]. Biosidivalmisteiden sisältämien tehoaineiden avulla este-tään haitallisten mikrobien kasvu tuotteessa. On kuitenkin huomioitava, että bio-sidiasetusta täydentävät säädökset, jotka koskevat biosideja, sisältyvät kemi-kaalilainsäädäntöön Suomessa. Ainoastaan biosidiasetuksen vaatimusten mu-kaisia biosidivalmisteita saa myydä ja käyttää Suomessa [11].

3 Vasta-aineet

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) ovat kiinteitä proteiineja, jotka sitoutuvat niille vastaaviin antigeeneihin ja ovat tärkeä osa immuunipuolustusjärjestelmää. Esimerkiksi bakteerilla tai viruksella voi olla useita epitoopeja eri antigeeneille, jotka aiheuttavat erilaisten vasta-aineiden tuoton solussa [12, s.498]. Monoklo-naalisilla vasta-aineilla (MAb) tarkoitetaan vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä yh-den antigeenin tietylle epitoolle. Nämä vasta-aineet ovat identtisen solukloonin tuottamia ja peräisin yhdestä B-solusta [13].

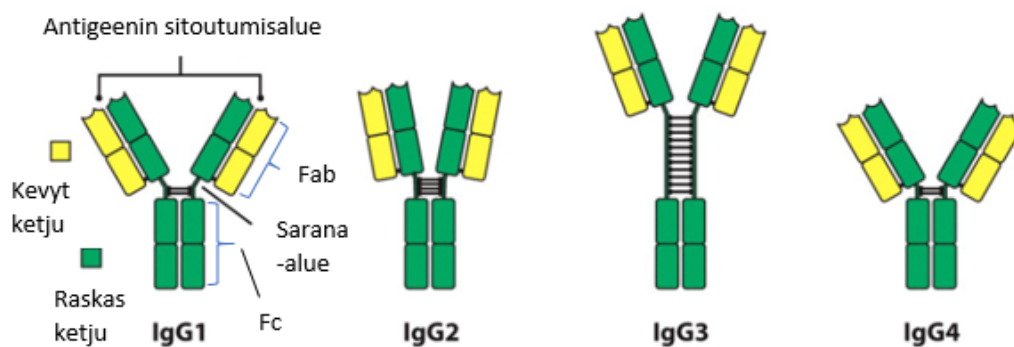
Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa hybridoomatekniikalla, jonka löy-sivät Georges Köhler, Niels Kaj Jerne sekä César Milstein. He jakoivat fysiolo-gian ja lääketieteen Nobelin palkinnon vuonna 1984 tekniikan löytämisestä [13]. Hybridoomasoluilla tarkoitetaan keinotekoisia soluja, jotka muodostetaan eristä-mällä plasmaselujen esiasteet ja fuusioimalla ne kuolemattomiin myelooma-soluihin [14].

3.1 IgG-vasta-aineet ja alaluokat

Vasta-aineet ovat glykoproteiineja, joiden perusrakenne on Y:n mallinen. Run-gossa on kaksi raskasketjua (HC) sekä kevytketjua (LC), jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa rikkisilloilla sekä nonkovalenttisilla sidoksilla. Kuvassa 1 näkyvien Y:n mallisten molekyylien sakaroita kutsutaan Fab-osiksi (antigen-binding frag-ments), joiden kaksi paikkaa toimivat antigeenin sitoutumisalueina. Fab-osat

ovat liittyneet molekyylin Fc-osaan (Crystallizable Fragments) sarana-alueella [15]. Monomeerit ovat yhdestä perusrakenneyksiköstä koostuvia immunoglobuliineja.

Immunoglobuliinit (Ig) voidaan luokitella viiteen eri luokkaan niiden rakenteessa esiintyvien raskasketjujen mukaan. IgG-, IgE- ja IgD-luokan immunoglobuliinit ovat yhdestä perusrakenneyksiköstä koostuvia monomeerejä kun taas IgA- ja IgM-immunoglobuliineihin on liittynyt kaksi tai viisi monomeeriä. Näistä immunoglobuliini G (IgG) muodostaa noin 80 % vasta-aineiden kokonaismäärästä. IgG vasta-aineet muodostavat humoraalisen immuunivasteen viruksia ja bakteereita sekä erilaisia toksiineja vastaan. Ne aktivoivat komplementtijärjestelmää, joka kuuluu yleiseen immuunivasteeseen. Sitoutuessaan antigeenin kanssa ne indusoivat fagosytoosia eli solusyöntiä [12, s. 499]. IgG-vasta-aineet varmistavat myös vastasyntyneen lapsen immuunipuolustuksen ensimmäisten elinkuukausien ajan, sillä ne ovat ainoita immunoglobuliineja, jotka läpäisevät istukan raskausaikana [16]. Immunoglobuliini G esiintyy neljässä erilaisessa alaluokassa, jotka ovat IgG₁, IgG₂, IgG₃ sekä IgG₄ (kuva 1).



Kuva 1. Vasta-aineiden rakenne ja IgG-vasta-aineiden alaluokat, joista IgG₁ on yleisin. [Muokattu 17.]

Alaluokat eroavat toisistaan toiminnoiltaan, mihin vaikuttavat rikkisiltojen määrä ja sijainti raskasketjujen välissä. IgG₁- sekä IgG₃-vasta-aineet aktivoivat tehokkaasti komplementtia, toisin kuin IgG₂, joka aktivoi sitä vain heikosti ja IgG₄, joka

ei aktivoi komplementtia ollenkaan. Kun jonkun antigeenin stimulaatio on toistuvaa ja pitkäaikaista, IgG₄ vasta-aineet vastaavat tähän reagoimalla. IgG₂-vasta-aineet taas muodostavat immunoreaktion polysakkaridikapselin omaaville bakteereille. [15.]

3.2 Monoklonaalisten vasta-aineiden (MAb) tuotto ja puhdistus

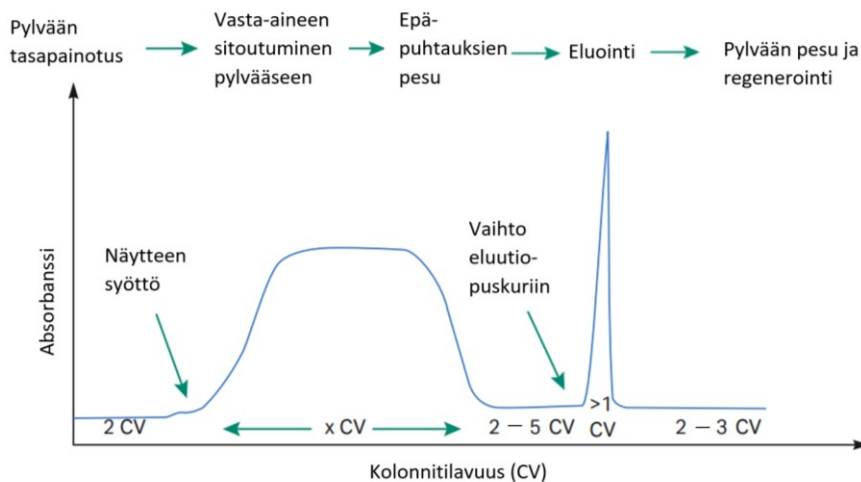
Hybridoomatekniikassa hiiri immunisoidaan halutulla kohdeantigeenillä, jolloin eläin alkaa tuottamaan kohdeantigeenille vastaavia vasta-aineita. Tuottamisen jälkeen hiiren perna poistetaan ja se lysataan yksittäisiksi soluiksi. Hybridoomasolut muodostetaan fuusioimalla hajotuksesta saadut yksittäiset solut jatkuvasti jakautuvien myeloomasolujen kanssa. Fuusioituneiden solujen erottelemisen fuusioitumattomista soluista tapahtuu selektiivisellä kasvatusliuoksella. Selektiivisellä kasvatusliuoksella pystyvät jakaantumaan ainoastaan tavoitellut fuusioituneet hybridisolut. Pernakudoksen B-solut tuottavat saman antigeenin eri epitoppeja kohtaan vasta-aineita, joten yksittäisten hybridoomasolujen syntyneet solukloonit tulee testata ja solukloonit tulee viljellä erillään muista kloonista [14]. Valittuja ja eristettyjä hybridoomasoluja voidaan kasvattaa tuottamaan suuria määriä monoklonaalisia vasta-aineita solumediumiin.

Soluviljely ja kasvatus toteutetaan aina erillisissä puhdastiloissa, joissa aseptinen työskentely on erityisen tärkeää kontaminaatioiden välttämiseksi. Yksi tärkeimmistä vaiheista monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa on solulinjan valitseminen. Solujen on oltava stabiileja ja eritettävä haluttua vasta-ainetta oikeassa muodossa riittävässä määrissä. Yksinkertaisin monoklonaalisten vasta-aineiden soluviljelytapa on tuotanto, jossa solut siirrostetaan bioreaktoriin, joka on steriloitu ja valmisteltu kasvatusmedialla. Media sisältää kaikki solujen kasvuun ja vasta-aineiden valmistukseen tarvittavat ravintoaineet. Ravinteiden alkuperäisyys ja jätteen tuotto määräävät enimmäispitoisuuden, jonka solut voivat saavuttaa mediassa. Saavuttaessaan enimmäistiheyden solujen elinkyky heikkenee nopeasti. Tuotantoprosessi voi kestää 4–7 päivää tai useamman kuukauden, jolloin tuottavuus saavuttaa halutun pisteen [18]. Soluviljelyä voidaan to-

teuttaa bioreaktoreissa myös seuraamalla solujen kasvuvaihetta sekä tilaa ja lisäämällä mediaan ravintoaineita sen mukaisesti. Tuoton jälkeen solumedia harvestoidaan, erät konsentroidaan ja ne voidaan siirtää pakkaseen

-20 °C:seen ennen harvestointierien poolausta. Kun poolaus on tehty, pooli voidaan jakaa pienempiin eriin ja pakastaa myöhempää puhdistamista varten [19].

Vasta-aineiden puhdistaminen voidaan toteuttaa affiniteettikromatografisesti rekombinanttiproteiini-A:lla, joka toimii spesifisenä ligandina ja sitoo nonkovalenttisesti IgG-vasta-aineita niiden Fc-osasta [20]. Kromatografian ajo-olosuhteet säädetään aina spesifiselle sitoutumiselle suotuisiksi. Affiniteettikromatografia-ajon kromatogrammin malli on nähtävissä kuvassa 2.



Kuva 2. Affiniteettikromatografia-ajon tyypillinen kromatogrammi. Kuvaajassa näkyy UV (ultravioletti) -tason vaihtelu ajovaiheiden aikana sinisenä viivana. Näytteesyötön kesto eli kolonnitilavuuksien (CV) määrä riippuu puhdistettavan näytteen määrästä. [Muokattu 20.]

Eluutiovaiheessa pylvääseen sitoutunut kohdeproteiini saadaan kerättyä talletteen, kun pylvääseen syötetään sitraattipuskuria oikeassa suhteessa. Jokaisella vasta-aineella on spesifinen pH-arvo, jossa ne eluoituvat ulos pylväästä. pH-arvoa voidaan säätää sitraattipuskurin määrällä suhteessa natriumfosfaattipusku-

rin määrään. Tarvittava sitraattipuskurin määrä, joka tarvitaan pH:n alentamiseksi ja siten vasta-aineen eluoitumiseksi pylväästä happamuuden myötä, on vasta-ainekohtainen. Eluointi tapahtuu epäspesifisesti pH-arvon muuttuessa alhaisemmaksi sitraattipuskurin vaikutuksesta. Kohdeproteiini eluoituu pylväästä puhdistettuna, ja kerätyn liuoksen konsentraatio on riippuvainen pylvään koosta. [19.]

3.3 Vasta-aineiden käyttö

Kyky tuottaa juuri haluttua vasta-ainetta suuria määriä mahdollistaa myös vasta-aineiden laajat käyttömahdollisuudet [21]. Monoklonaalisten vasta-aineiden suuri spesifisyys on hyödyllistä etenkin terapeuttisissa sovelluksissa [19]. Monoklonaalisia vasta-aineita on käytetty terveydenhuollossa ihmisissä jo vuosikymmenen ajan. Huomattavia edistysaskelia on tehty syöpätutkimuksissa, jotka koskevat endogeenisen immunologisen aktiivisuuden manipulointia kasvaimia vastaan ja erilaisten sytotoksisten aineiden kohdistamista syöpiin. Vasta-aineilla on edelleen tärkeä merkitys monien sairauksien hoidossa. Esimerkiksi vesirokkoa, kurkkumätää, jäykkäkouristusta, hepatiitti B:tä ja vesikauhua ehkäistään ja hoidetaan vasta-aineiden avulla yhä [22].

Vasta-aineet, joita käytetään potilaiden hoitamisessa, ovat yleensä peräisin hiirestä. Niiden käyttöön liittyy kuitenkin haasteita. Yksi näistä haasteista on ihmisen elimistöön kohdistuva immuunireaktio, joka aiheutuu vieraan eläinlajin proteiinista ja voimistuu toistuvassa käytössä. Tällaista immunogeenisuutta pystytään kuitenkin jonkin verran vähentämään kemiallisesti manipuloimalla hiiren vasta-aineita. Geenitekniikka mahdollistaa haluttujen immunoglobuliinigeenien osien yhteen liittämisen, jotka voivat olla peräisin eri eläinlajeista. Ihmisen vasta-aineen pysyvät osat voivat olla yhdistettynä esimerkiksi hiiren vasta-aineiden vaihteleviin osiin, jolloin kyseessä on kimeerinen, ”humanisoitu” vasta-aine. Nämä vasta-aineet aiheuttavat vähemmän immuunireaktioita ihmisessä kuin eläinperäiset, vieraat vasta-aineet. [21.]

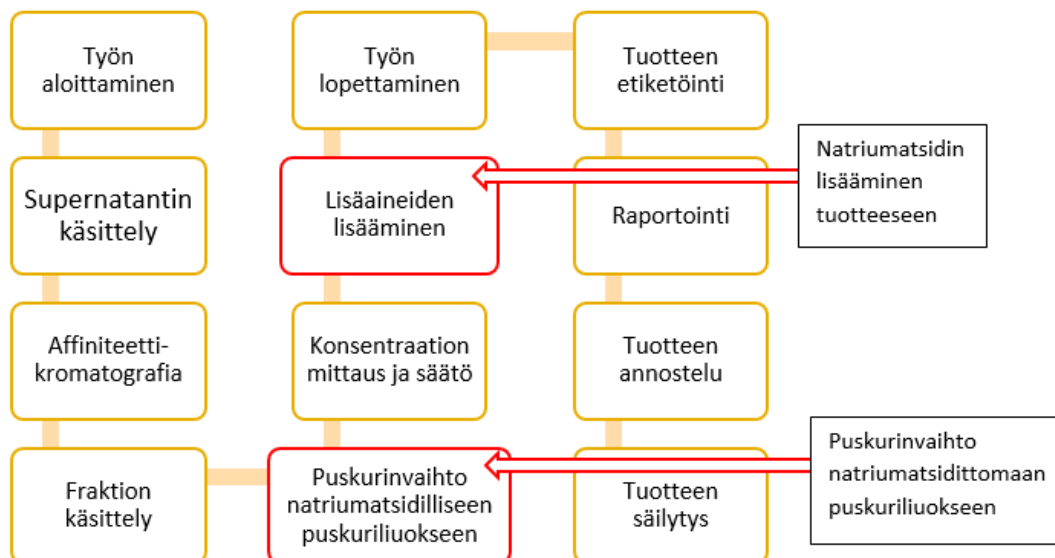
Monoklonaaliset vasta-aineet eivät ole käytössä vain terapeuttisissa sovelluksissa, vaan ne ovat yksi laboratoriotutkimuksissa yleisimmin käytetyistä välineistä. Ne ovat monien tekniikoiden ja lähestymistapojen perustana [23]. Valmiita vasta-aineita voidaan käyttää myös erilaisten pikatestien tuotannossa. Pikatestejä on kehitetty Suomessa esimerkiksi veritestauksiin ja niitä on olemassa raskauden seurantaan, ruoansulatushäiriöiden seulontaan sekä esimerkiksi tartuntatautien tunnistamiseen ja diagnosointiin [24].

Raskauden seurantatesteillä voidaan tunnistaa ja poissulkea ennenaikaisen synnytyksen riskejä sekä diagnosoida ennenaikainen lapsivedenmeno. Ruoansulatuselimistön testeillä voidaan diagnosoida akuutti haimatulehdus, tunnistaa ulosteen piilevä veri ja mahasuolikanavan verenvuoto ja suoliston tulehdustila. Tartuntatautitesteillä voidaan tehdä CRP-testi (C-reaktiivinen proteiini) nopeasti tai tunnistaa influenssavirus. Lisäksi maailmanlaajuisen pandemian aiheuttanut koronavirus-infektio COVID-19 (corona virus disease) voidaan testata aiemmin sairastuneelta henkilöltä pikatestin avulla tunnistamalla spesifisesti kehoon erittyneitä vasta-aineita. [24.]

4 Vasta-aineiden puhdistusprosessin muutostavoitteet

Vasta-aineiden tuotanto koostuu ”upstream”- eli tuottovaiheesta ja ”downstream”- eli puhdistusvaiheesta sekä lopputuotteen laadunvalvontatestauksista. Koko tuotantoprosessi tapahtuu aina valvotuissa ja säädellyssä laboratorio-olosuhteissa, joissa ei esiinny eläinperäisiä tuotteita.

Yrityksen nykyisen vasta-aineiden puhdistusprosessin vaiheet sekä uuden puhdistusprosessin mukana tulevat muutokset ovat kuvattuna kuvassa 3.



Kuva 3. Lopputuotteen nykyinen puhdistusprosessi yrityksessä ja prosessimuutoksen mukana tulevat muutokset, jotka on merkitty kuvaan punaisella.

Nykyisessä prosessissa natriumatsidia lisätään puskuriliuoksiin liuosten valmistusvaiheessa. Kromatografiapuhdistuksen jälkeen, vasta-aineen loppupuskuri vaihdetaan diasuodatuksella tai dialyysimenetelmällä. Puskuriliuoksen määrä verrattuna pylväästä eluoituneen vasta-aineliuoksen määrään, on noin 20-kertainen ja diasuodatuksessa 6-kertainen. Puskuriliuosten valmistuksessa sekä kummassakin puskurinvaihtomenetelmässä, työntekijä joutuu käsittelemään suuria määriä natriumatsidia sisältäviä liuoksia, jolloin myös terveysriskit kasvavat.

Puskuriliuoksia valmistetaan usein suurempia eriä samalla kertaa, minkä seurauksena säilytettävien liuosten määrät ovat usein useita kymmeniä litroja. Puskuriliuoksia säilytetään laboratoriossa huoneenlämmössä suurissa suljetuissa astioissa, mutta astioiden ei voida olettaa olevan täysin tiiviitä. Natriumatsidia voi päästä höyrystymään laboratorion huoneilmaan astioista. Työntekijä voi altistua päivän aikana näille syntyneille höyryille, vaikka huoneessa onkin tehostettu ilmanvaihto.

Prosessimuutosten myötä natriumatsidi lisätään vasta lopputuotteeseen 10-prosenttisesta natriumatsidikantaliuoksesta ja puskuriliuokset valmistetaan ilman natriumatsidia. Näin ollen natriumatsidin kulutus laboratorioissa saadaan pienemmäksi ja työvaiheet turvallisemmiksi sekä käsittelyaikaa lyhyemmäksi. Muutoksen seurauksena, natriumatsidin vuosikulutusta saataisiin pienennettyä 10-kertaisesti nykyisestä kulutuksesta. Ennustettu kulutusmäärä on laskettu yrityksen aikaisemman vuoden tuotantomäärien avulla.

5 Laadunvalvonta (QC)

5.1 Laadunvalvonta ja sen merkitys

Vasta-aineet ovat bioteknologia-alalla yleisimmin käytettyjä välineitä. Niiden käytössä voi esiintyä kuitenkin ongelmia, kuten ristireaktiivisuus, jossa vasta-aine sitoutuu kohdeproteiininsa lisäksi muihin proteiineihin sekä vasta-aineen vaihtelevuus, jossa eri vasta-aine-erät voivat toimia eri tavalla. Lisäksi erilaiset kokeet ja koeolosuhteet voivat muuttaa proteiinin ulkomuotoa ja siten sen sitoutumiskykyä. Nämä ongelmat voivat johtaa valheellisiin testituloksiin tai erilaisten projektien hylkäämiseen sekä tuhata aikaa, rahaa ja raaka-aineita. Huonosti karakterisoidut vasta-aineet vaikuttavat kokeiden toistettavuuteen ja luotettavuuteen ja näihin perustuvat päätelmät voivat olla perusteettomia. [25].

On kuitenkin selvää, että kiinnostus monoklonaalisia vasta-aineita kohtaan kasvaa niiden laajojen käyttömahdollisuuksien myötä. Tämän vuoksi, vasta-aineiden laadunvalvonta on erityisen tärkeää niitä tuottavissa laboratorioissa ja vasta-aineiden kehitykseen, tuotantoon ja jakeluun liittyviä prosesseja on valvottava jatkuvasti. Tuotteiden laatuun liittyy usein kysymyksiä, kun mietitään esimerkiksi kuinka toistettavissa olevat erät ovat. Kuinka puhdas vasta-aine on? Kuinka homogeeninen tuote on? Onko tuotteessa olemassa joitain modifikaatioita eli muunnoksia, kuten translaation jälkeisiä modifikaatioita? Mikä on vasta-aineen konsentraatio? Muun muassa näitä kysymyksiä tutkitaan laadunvalvonnassa.

Korkean toistettavuuden, spesifisyyden, herkkyuden ja laajojen ominaisuuksien perusteella, massaspektrometriasta (MS) on tullut hyvin käytetty tekniikka myös monoklonaalisten vasta-aineiden laadunvalvonnassa [23]. Tämän lisäksi laadunvalvonnassa käytetään yleisesti myös muita menetelmiä vasta-aineiden laadun tarkastamisessa, kuten korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Vasta-aineita, tai muita tuotteita valmistava yritys, voi hakea tuotteelleen CE-merkintää. Merkinnällä vakuutetaan, että tuote täyttää sitä koskevien EU:n direktiivien ja asetusten vaatimukset. Kun tuote on CE-merkitty, se voi liikkua EU:n alueella vapaasti. [26.]

5.2 Yrityksessä käytettävät laadunvalvontatestaukset

Yrityksen laadunvalvonnassa, vasta-aineista testataan immunoreaktiivisuutta, tuotteen puhtautta, homogeenisuutta, isoelektristä aluetta sekä vasta-aineen konsentraatiota. Tuotteen konsentraation eli proteiinipitoisuuden määrittäminen tehdään spektrofotometrisesti laskemalla ja mittaamalla tuotteen absorbanssia aallonpituudella 280. [27.]

Immunoreaktiivisuutta testataan ELISA-testillä, eli entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä, josta saatua fluoresenssisignaalia mitataan aikarajoitteisella fluoresenssilla. Immunoreaktiivisuustestissä määritetään se vasta-ainelaimennos, joka sitoo 50 % leimatusta antigeenistä verrattuna immunoreaktiiviseen totaaliin. Testattavan vasta-aineen 50-prosenttista laimennosta verrataan referenssivasta-aineen vastaavaan laimennokseen ja näiden suhde lasketaan. [27.]

Tuotteen puhtausmäärityksessä vasta-aine denaturoidaan, eli hajotetaan lämmöllä erillisiksi kevyeksi ja raskasketjuksi. Näyte injektoidaan polymeerigeelillä täytettyyn kapillaariin sähkövirran avulla, jonka seurauksena kevyt ja raskas ketju erottuvat toisistaan sähkökentässä koon perusteella. Monitorointiin käytetään diodirividetektoria (PDA) aallonpituusalueella 190–400 nm. Kevytketjut ja

raskasketjut synnyttävät elektroforeesilaitteelle tulevaan kuvaajaan erilliset piikit, joiden lisäksi näkyvissä ei saa olla muita piikkejä tuotteen ollessa puhdas. [27.]

Isoelektrisessä fokuoinnissa käytetään iCE-kapillaarielektroforeesilaitetta kapillaari-iselektriseen fokuointiin (cIEF). Menetelmää käytetään vasta-aineiden isoelektrisen alueen (pI-alueen) määrittämiseen. Kapillaarielektroforeesissa piillä pinnoitettuun kapillaariin ajetaan vasta-ainetta sähkövirran suuntaisesti, jolloin vasta-aine asettuu sen isoelektriseen pisteeseen (pI). Vasta-aineelle saadaan aikaan profiili, jossa näkyy piikkejä vasta-aineen eri isoformeille pI-arvojen mukaan, sillä vasta-aineessa saattaa olla variaatiota siitä minkälainen nettovaraus sillä on. [28.]

Homogeenisuusmäärittämiseen käytetään HPLC-laitetta eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia-laitetta ja sillä tutkitaan, sisältääkö tuote monomeerimuodon lisäksi aggregaattimuotoja, kuten dimeerimuotoja, jotka voivat vaikuttaa haitallisesti antigeenin sitoutumiseen. Homogeenisuuden määrittäminen on hyvin tärkeää, sillä se kertoo tuotteen toimivuudesta halutulla tavalla. [28.]

6 Projektissa käytetyt materiaalit ja menetelmät

6.1 Vasta-aineen puhdistus ja lopputuotteen valmistus

Projekti aloitettiin validointisuunnitelmalla, jonka laati kromatografialaboratorion prosessipäällikkö. Suunnitelmassa päätettiin kokeellisiin testauksiin tuleva vasta-aine ja näytemäärät sekä kirjattiin koko projektin suoritus. Näytteiksi valittiin näytteet A, B, C ja D, jotka olivat kaikki samaa vasta-ainetta ja ne valittiin yrityksen tarpeiden mukaisesti. Katsottiin, että natriumatsidin lisääminen pieniin lopputuotetilavuuksiin on haastavampaa kuin isoihin määriin lisääminen, sillä natriumatsidiliuos voi vaikuttaa lopputuotteen laatuun herkemmin pienissä tilavuuksissa.

Edellisten vuosien myynnin perusteella laskettiin ja ennustettiin, valitun vasta-aineen menekki tulevina vuosina. Suurien vasta-ainemäärien varastoimisen ei todettu olevan kustannustehokasta, ja näin ollen isoimmat näytemäärät jätettiin pois koeasetelmasta. Valitun vasta-aineen näytemäärät ovat kuvattuna taulukossa 1.

Taulukko 1. Puhdistettavan vasta-aineen ja rinnakkaisnäytteiden määrät.

Näyte	Puhdistettava vasta-aine määrä (mg)	Alaluokka	Lopputuotteen vasta-aine pitoisuus (mg/ml)	Rinnakkaisnäytteiden määrä
A	100	IgG ₁	1	3
B	1000	IgG ₁	1	3
C	100	IgG ₁	5	3
D	1000	IgG ₁	5	3

Jokaisesta vasta-aine määrästä (mg) ja pitoisuudesta (mg/ml) tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä. Jokaisesta näytteestä tehtiin laadunvalvonnassa testaukset, joista saatuja tuloksia verrattiin referenssinäytteen tuloksiin, joka oli saman vasta-aineen edellistä erää pitoisuudella 5 mg/ml. Saatujen tulosten perusteella katsottiin, vaikuttaako natriumatsidin lisäys puhdistusprosessin loppuvaiheessa tuotteen laatuun. Puhdistettavan vasta-aineen tuotespesifikaatiot ovat nähtävissä liitteessä 1.

6.1.1 Puskuriliuos ilman natriumatsidia

Samalla vasta-aineella voidaan käyttää monia eri puskuriliuoksia esimerkiksi eri pH-arvoilla. Koeasetelman lopputuotteiden puskuriliuokseksi valittiin yrityksessä eniten käytetty puskuriliuos, joka soveltui tutkittavalle vasta-aineelle. Puskuriliuoksen tiedot ovat nähtävissä taulukossa 2.

Taulukko 2. Puskuriliuoksen koostumus ilman natriumatsidia.

Liuos	Reagenssit
Natriumsitraattiliuos	50 mM Trinatriumsitraatti ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) Natriumkloridi (NaCl) 0,9 %
Sitruunahappoliuos	50 mM Sitruunahappomonohydraatti ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) Natriumkloridi (NaCl) 0,9 %

Natriumsitraatin pH säädettiin sitruunahappoliuoksella pH-arvoon 6,04.

6.1.2 Supernatantin käsittely

Supernatantin käsittely tehtiin yrityksen ohjeen mukaisesti. Ennen työn aloittamista varmistettiin, että työskentelytilat ovat puhtaat eikä työskentelypisteessä ole muita tuotteita. Supernatanttia sulatettiin puhdistukseen tarvittava määrä. Ennen kromatografista puhdistusta, supernatantti suodatettiin ja suodoksesta mitattiin pH, jonka arvo piti olla yli 7,5 vasta-aineen pylvääseen sitoutumisen varmistamiseksi.

6.1.3 Vasta-aineiden puhdistus affiniteettikromatografisesti (AC)

Kromatografiapylväs valittiin puhdistettavan vasta-aineen milligrammamäärän mukaisesti ja pylvään vasta-aineen sitomiskapasiteetin mukaan. Kromatografiapylväät olivat itse pakattuja. Puhdistettavan proteiinimäärän suhde pylvään tilavuuteen ei saanut ylittää kloonikohtaista sitoutumista, joka on IgG₁ alaluokan vasta-aineilla 15 mg/ml proteiini-A -geeliä. Vasta-ainepuhdistukset tehtiin ÄKTA Purifier -kromatografialaitteistolla. Käytetyt pylväät eri vasta-ainemäärissä ovat nähtävissä taulukossa 3.

Taulukko 3. Kromatografiapuhdistuksissa käytetyt pylväät.

Pylväs numero	1	2
Vasta-ainemäärä (mg)	100	1000
Pylvään tilavuus (ml)	22	72
Virtausnopeus (ml/min)	3	10
Maksimikapasiteetti (mg)	330	1080

Puhdistuksissa käytetyt puskurit olivat pH-arvolla 8,2 oleva natriumfosfaattipuskuri (0,1 M) sekä pH-arvolla 2,9 oleva sitraattipuskuri (50 mM). Ajo-ohjelma ja vaiheiden kestot ovat nähtävissä taulukossa 4.

Taulukko 4. Kromatografiapuhdistusten ajo-ohjelma. Eluoinnin sekä näytteen-syötön aika vaihtelivat riippuen syötettävän näytteen määrästä ja käytetystä virtausnopeudesta pylvään mukaan (taulukko 3).

Vaihe	CV	Aika (min)
Tasapainotus	3	22
Näytteesyöttö	-	-
Pesu natriumfosfaattipuskurilla	10	72
Eluointi	6	-
Jälkipesu (100 % sitraattipuskuria)	3	22
Tasapainotus natriumfosfaattipuskurilla	3	22
CIP-pesu natriumhydroksidilla (NaOH)	2	15
Regenerointi natriumfosfaattipuskurilla	7	51
Regenerointi natriumfosfaattipuskurilla (sis. NaN ₃)	3	22

Vasta-aineen eluointi tapahtui natriumfosfaattipuskurin ja sitraattipuskurin sekoitussuhteella, jossa sitraattipuskurin suhdeosuus oli 75 %. Eluoinnin jälkeen laite pestiin sitraattipuskurilla (pH 2,9), jolloin pylvästä irtosivat jäljelle jääneet

vasta-ainejäämät ja mahdolliset epäpuhtaudet. Jälkipesun jälkeen pylväs tasapainotettiin natriumfosfaattipuskurilla (pH 8,2). Seuraavaksi pylväälle tehtiin CIP-pesu (Clean In Place) natriumhydroksidilla, jossa irtosivat erityisen tiukasti sitoutuneet epäpuhtaudet ja sitoutuneet vasta-ainejäämät ja estettiin pylvään tukkeutuminen sekä vasta-aineiden ristikontaminaatiot. Lopuksi pylväs regeneroitiin natriumfosfaattipuskurilla, johon oli lisätty natriumatsidia mikrobikontaminaatioiden ehkäisemiseksi pylväässä. Pylväs irrotettiin laitteesta ja laitteen letkusto pestiin vielä natriumhydroksidilla, jonka pitoisuus oli 0,2 M ja joka viidennellä pesukerralla 1 M.

6.1.4 Fraktion käsittely ja dialysointi

Kromatografialaitteistolta saadun fraktion tilavuus katsottiin, tuotteen ulkonäkö arvioitiin ja tuotteen pH mitattiin. pH-mittauksen jälkeen fraktion konsentraatio määritettiin spektrofotometrisesti absorbanssin avulla. Spektrofotometrimääritykseen näyte laimennettiin pitoisuuteen 1 mg/ml, jolloin aallonpituudella A_{280} molaarinen absorptiokerroin proteiinille on 1,4, joka on saatu Beerin ja Lambertin laista seuraavasta yhtälöstä:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

jossa A on absorbanssi
 ε on molaarinen absorptiokerroin
 b on kyvetin paksuus
 c on mitattavan aineen konsentraatio.

Fraktion konsentraatio laskettiin edellä mainitun kaavan mukaan. Ennen dialyysia määritettiin vielä fraktion proteiinimäärä sekä puhdistusvaiheessa syntynyt hävikki.

Tämän jälkeen näyte siirrettiin Medicell-dialysointiletkuun (DTV.12000.06 Size No.6, halkaisija 21,5 mm) dialyysia varten. Letku laitettiin erlenmeyeriin, johon lisättiin natriumatsiditonta puskuriliuosta vähintään 20-kertainen määrä fraktion

tilavuuteen nähden niin, että letku peittyi puskuriliuoksella. Näyte siirrettiin dialysoitumaan kylmiöön (+8 °C) ja dialyysissä käytettiin magneettisekoittajaa. Kolmen tunnin dialyysin jälkeen, erlenmeyeriin vaihdettiin puskuriliuos ja dialysointia jatkettiin yön yli (o/n) sekoituksen kanssa.

6.1.5 Lopputuotteen käsittely ja natriumatsidin lisäys

Yönyli-dialysoinnin jälkeen, näytteen pH mitattiin. pH-arvon ollessa noin 6,0 voitiin varmistua dialysoinnin onnistumisesta eli puskuriliuoksen vaihtumisesta näytteessä. Näytteestä määritettiin konsentraatio spektrofotometrillä, laskettiin proteiinimäärä sekä saanto samalla tavoin kuin ennen dialyysia. Määritysten jälkeen, näyte laimennettiin haluttuun loppupitoisuuteen lisäämällä puskuriliuosta. Laimentamisen jälkeen, lopputuotteeseen lisättiin 10-prosenttista natriumatsidiliuosta niin, että natriumatsidipitoisuus oli 0,095 %.

Natriumatsidiliuosta lisättäessä, näytteen tuli olla magneettisekoituksessa, jotta natriumatsidi sekoittuu tuotteeseen mahdollisimman tasaisesti. Näytteen pH mitattiin sekä laimentamisen että natriumatsidin lisäyksen jälkeen. Lopuksi näyte suodatettiin säilöpulloon 0,2 µm:n membraanisuolettimen läpi, joka suodatti lopputuotteesta mikrobit ja tuotteen lopullinen konsentraatio määritettiin spektrofotometrillä. Lopputuotteen konsentraation tuli olla määritetyissä tavoiterajoissa (liite 2). Lopuksi näytteen ulkonäkö arvioitiin ja siitä otettiin laadunvalvontanäytteet ja näytevarastonäytteet.

6.2 Laadunvalvonnan testaukset näytteille

Jokaisesta puhdistetusta lopputuote-erästä toimitettiin testausnäyte laadunvalvontalaboratoriolle. Laadunvalvontatesteillä eli QC-testeillä (Quality Control) varmistettiin, että tuote täyttää sille asetetut tuotespesifikaatiot ja se voidaan vapauttaa myyntiin. Laadunvalvontatesteihin kuului konsentraation tarkastaminen, immunoreaktiivisuuden määrittäminen, IEF eli isoelektrinen fokuointi (Isoelectric Focusing), puhtausmäärittäminen, homogeenisuusmäärittäminen sekä tuotteen ulkonäön arvi-

ointi. Kaikissa testeissä näytteitä verrattiin samaan referenssinäytteeseen laadunvalvontalaboratorion käytäntöjen mukaisesti. Referenssinäytteenä käytettiin edellistä loppuerää samasta vasta-aineesta, ja se oli pitoisuudeltaan 5 mg/ml. Laadunvalvonnalliset testaukset näytteille suorittivat laadunvalvontalaboratorion laborantit.

6.3 Reaaliaikaiset säilyvyyskokeet puskuriliuoksille

Reaaliaikaisiin säilyvyyskoemittauksiin valittiin neljä laboratoriossa yleisimmin käytettyä puskuriliuosta, joissa kaikissa on tällä hetkellä natriumatsidia. Jokaisesta puskuriliuksesta tehtiin kolme erilaista versiota, jotka olivat seuraavanlaiset:

- 1) Liuoksesta jätettiin pois natriumatsidi ja sitä ei suodatettu.
- 2) Liuoksesta jätettiin pois natriumatsidi mutta se suodatettiin 0,2 µm:n membraanisuolettimen läpi.
- 3) Laboratoriossa käytössä oleva puskuriliuos, jossa natriumatsidia.

Puskuriliuokset X ja Y olivat samaa puskuria, jotka tehtiin pH-arvoilla 6,0 sekä 7,0. Tätä puskuriliuosta on laboratoriossa näissä molemmissa pH-arvoissa ja haluttiin tietää, vaikuttaako eri pH-arvo tuotteen säilyvyyteen. Testattavia puskuriliuoksia oli yhteensä 12 kappaletta.

Jokaista puskuriliuosta valmistettiin 1 l ja ne säilytettiin huoneenlämmössä. Jokaisesta pullosta otettiin 600 µl näytettä ja lähetettiin analysoitavaksi SynLabille bioburden-testiä varten. Bioburden testauksella tutkittiin tuotteen tai sen sisältämän mikrobikontaminaation taso yksiköllä cfu (pesäkkeen muodostava yksikkö). Testauksessa käytettiin elatusaineena kystiini-laktoosi-agaria, eli CLED-maljaa. Uudet näytteet lähetettiin SynLabille neljän viikon välein ja pulloja sekoitettiin aina ennen näytteiden ottamista.

7 Tulokset

7.1 Tutkittavan vasta-aineen puhdistustulokset

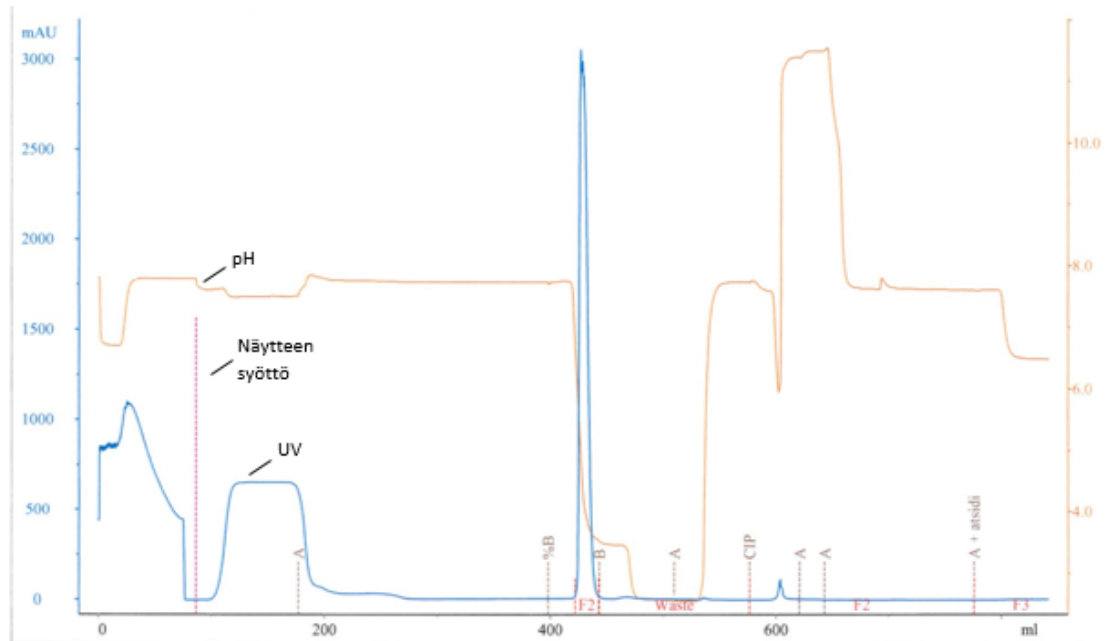
Jokaisen puhdistetun näytteen lopulliset saannot olivat hyvät. Hävikki sai olla enintään 30 % eikä hävikkimäärä ylittänyt tätä määrää minkään tuotteen kohdalla. Lopputuotteiden määrittystulokset ovat nähtävissä taulukossa 5.

Taulukko 5. Tutkittavan vasta-aineen lopputuotteiden saannot ja hävikki.

Näyte	Saanto (mg)	Kokonaishävikki (mg)	Kokonaishävikki (%)
A1	95	19	17
A2	106	22	17
A3	97	15	13
B1	876	124	12
B2	887	113	11
B3	847	153	15
C1	82	28	26
C2	84	28	25
C3	86	26	23
D1	912	88	9
D2	857	143	14
D3	828	172	17

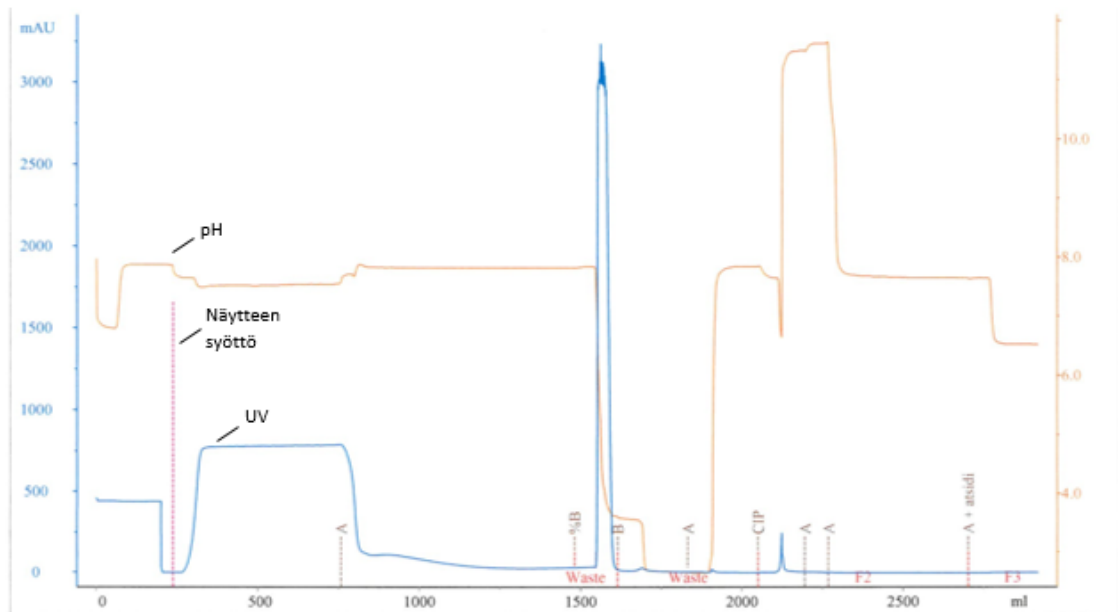
Lopputuotteiden C1–C3 kokonaishävikki oli selvästi suurin. Ero kokonaishävikki määrissä johtuu todennäköisesti loppupitoisuuksien erosta. Näytteet A1-A3 sekä B1-B3 laimennettiin pitoisuuteen 1 mg/ml, jolloin loppusuodatuksessa saatiin suodattimeen jäävä näytemäärä paremmin huuhdeltua. Näytteiden C1-C3 sekä D1-D3 loppupitoisuus oli noin 5 mg/ml, eikä lopputuotteita tarvinnut laimentaa dialyysin jälkeen. Laimentamattomana vasta-ainetta jäi luultavimmin enemmän suodattimeen loppusuodatusvaiheessa, sillä suodatinta ei voitu

huuhdella suodatuksen jälkeen, jottei näyte laimenisi liikaa. Kromatografialaitteen piirtämät esimerkkikuvaajat affiniteetikromatografiapuhdistuksista näytteille C1 ja D1 on nähtävissä kuvissa 4 ja 5.



Kuva 4. Näytteen C1 kromatografiapuhdistuksen kuvaaja. Näytteen vasta-ainemäärä oli 100 mg ja fraktion keräys tapahtui automaattisesti (kuvan kohta F2) UV-tason noustessa yli 20mAU.

Näytteissä A1-A3 sekä C1-C3 käytettiin pienempää pylvästä, jossa maksimikapasiteetti oli 330 mg. Pylväs ei ylikuormittunut ja eluointi tapahtui automaattisesti laitteen ohjelmiston toimesta UV-tason noustessa yli 20 mAU.



Kuva 5. Näytteen D1 kromatografiapuhdistuksen kuvaaja. Näytteen vasta-ainemäärä oli 1 000 mg ja eluointi jouduttiin tekemään manuaalisesti.

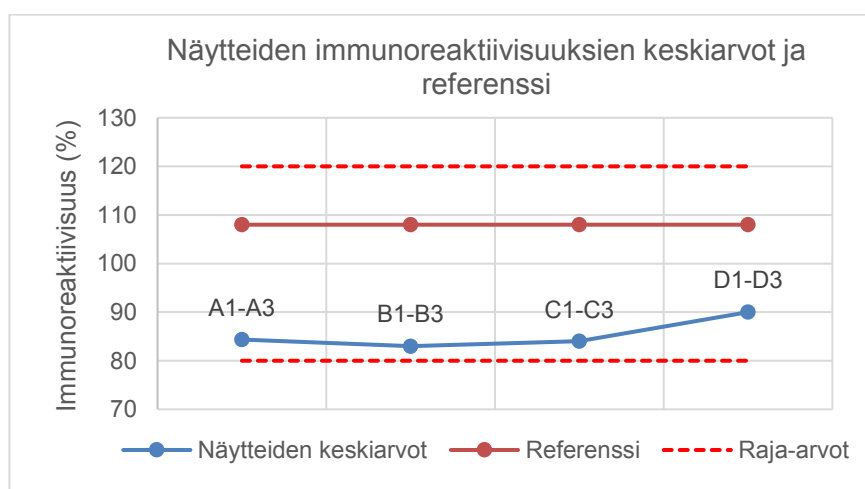
Näytteissä B1-B3 sekä D1-D3 käytettiin samaa kromatografiapylvästä, jossa maksimikapasiteetti oli 1 080 mg, mutta pylväs ylikuormittui kromatografia-ajon aikana. Tämän takia eluinnit tehtiin manuaalisesti ajon aikana, sillä UV-taso oli jo eluinnin alkaessa yli 20 mAU, jolloin laite aloittaa fraktion keräyksen automaattisesti.

7.2 Laadunvalvonnan (QC) tulokset

Kaikki tutkittavat näytteet läpäisivät laadunvalvontatestit tuotespesifikaatioiden mukaisesti. Tulosten perusteella voitiin todeta, ettei natriumatsidin lisäys ole aiheuttanut vasta-aineen laatuun merkittäviä muutoksia. Laadunvalvonnasta saattujen tulosten yhteenveto on nähtävissä liitteessä 3.

7.2.1 Immunoreaktiivisuus

Kaikissa näytteissä immunoreaktiivisuus oli tuotespesifikaation mukainen (80–120 %). Näytteiden ja referenssin arvojen välillä oli kuitenkin pientä eroavaisuutta, joka ei ollut tässä tapauksessa merkitsevää. Referenssinäytteenä käytetty edellinen loppuerä samasta vasta-aineesta, aiheuttaa ajoittain eroavaisuutta ja pitkällä aikavälillä myös liukuvuutta tuloksiin. Rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista ja referenssinäytteen arvoista piirretty kuvaaja on nähtävissä kuvassa 6.



Kuva 6. Näytteiden immunoreaktiivisuuksien keskiarvot ja referenssi.

Tuotteen kyky sitoutua immunologisesti vasta-aineeseen on näin ollen tavoitteiden mukainen, vaikka näytteiden immunoreaktiivisuudet ovat lähempänä alemmaa raja-arvoa kuin referenssinäyte. Aikaisemmissa tuloksissa ei kuitenkaan ole ollut havaittavissa näin suurta yhtäkkistä eroavaisuutta referenssin ja näytteen välillä ja syytä tämänhetkisellem alenemalle tullaan vielä miettimään tarkemmin.

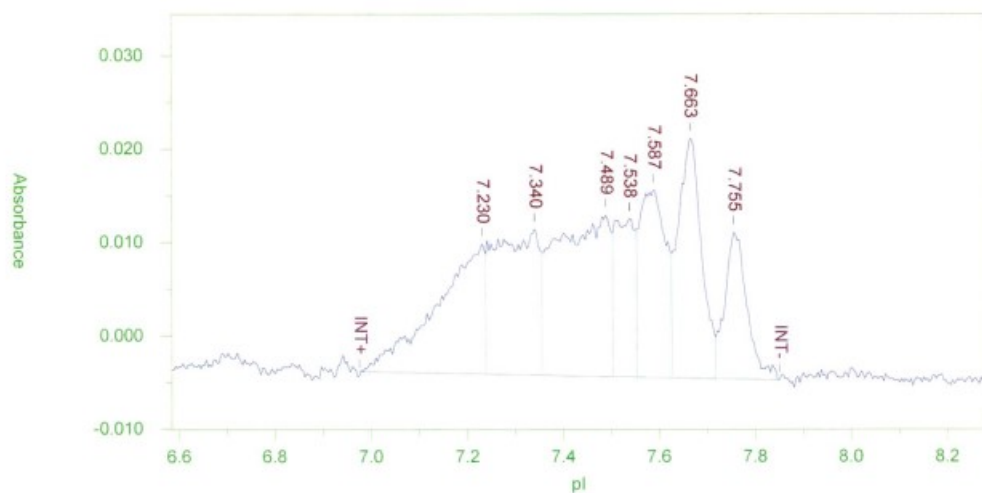
7.2.2 IEF-profiili (Iso Electric Focusing)

Isoelektrisessä fokuoinnissa näytteiden pI-arvot olivat tuotespesifikaatioiden mukaiset (7,0-7,9). Saadut pI-arvot näytteille ovat kuvattuna taulukossa 6.

Taulukko 6. Näytteiden pI-arvot isoelektrisessä fokusoinnissa.

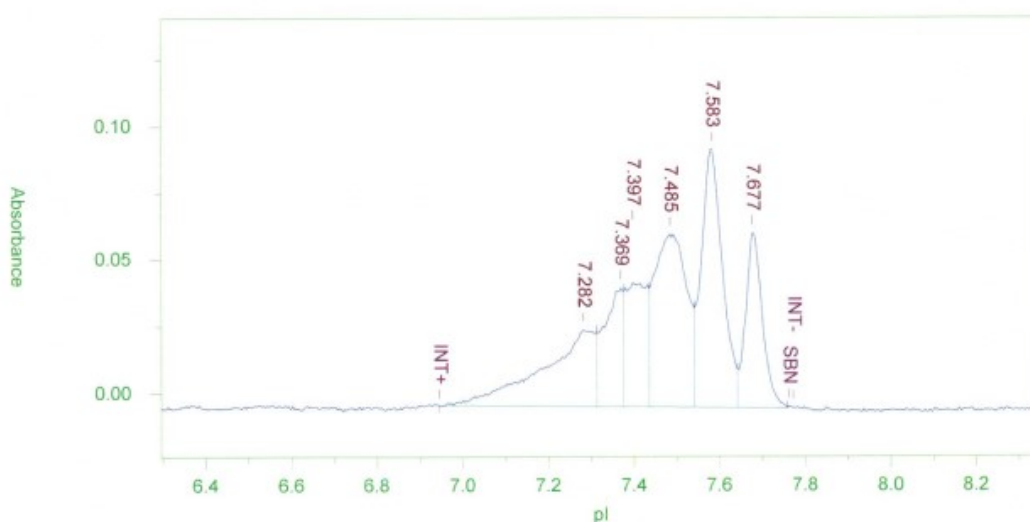
Näyte	pI-arvo
A1	7,2–7,7
A2	7,2–7,8
A3	7,3–7,8
B1	7,2–7,8
B2	7,3–7,8
B3	7,2–7,8
C1	7,3–7,7
C2	7,3–7,7
C3	7,3–7,7
D1	7,3–7,7
D2	7,3–7,7
D3	7,3–7,7

Näytepitoisuuksissa 1 mg/ml eli näytteissä A1-A3 ja B1-B3 IEF-profiilin kuvaajassa piikit fokusoituivat hieman eri tavalla kuin näytepitoisuudessa 5 mg/ml. Kuvassa 7 on nähtävissä näytteen B1 IEF-profiili.



Kuva 7. Näytteen B1 IEF-profiili, jossa kuvaajan alkupään piikit fokusoituivat heikommin vasta-ainepitoisuuden ollessa 1 mg/ml.

Näytteiden A1-A3 ja B1-B3 kaikkien näytteiden IEF-profiilit olivat kuvan 6 kaltaisia. Eroavaisuus näytepitoisuuksien 5 mg/ml ja 1 mg/ml IEF-profiilien välillä on tutkittavalle vasta-aineelle ominaista. Yleisesti menetelmästä tiedetään, että mitä matalampi vasta-aineen konsentraatio on, sitä hankalampi piikkien varausprofiilin erottelu yleensä on. Laadunvalvonnan menetelmäohjeessa on myös mainittu, että pitoisuuksilla 1 ja 2 mg/ml olevat tuotteet ajetaan matalammassa Ig-pitoisuudessa kuin pitoisuudella ≥ 5 mg/ml olevat tuotteet. Tämä johtuu lopputuotteiden sisältämästä suolasta. Isoelektrinen fokuointi on todella herkkä menetelmä ja siitä saaduissa tuloksissa on lähes aina havaittavissa pieniä eroavaisuuksia. Näytteen C1 IEF-profiili on nähtävissä kuvassa 8.

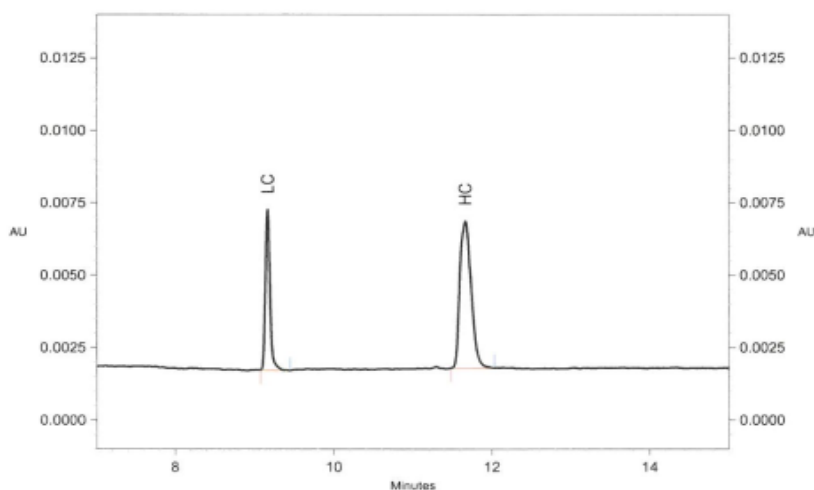


Kuva 8. Näytteen C1 IEF-profiili, jossa piikit ovat fokuoituneet paremmin pitoisuuden ollessa 5 mg/ml.

IEF-profiileita tarkastelemalla ja vertailemalla referenssinäytteen profiiliin, voitiin todeta, että näytteet koostuvat halutusta vasta-aineesta eivätkä ne sisällä ylimääräisiä komponentteja. Kaikissa näytteissä oli havaittavissa referenssinäytteen mukaiset, vasta-aineelle ominaiset kolme selkeintä piikkiä kuvaajan loppupäässä.

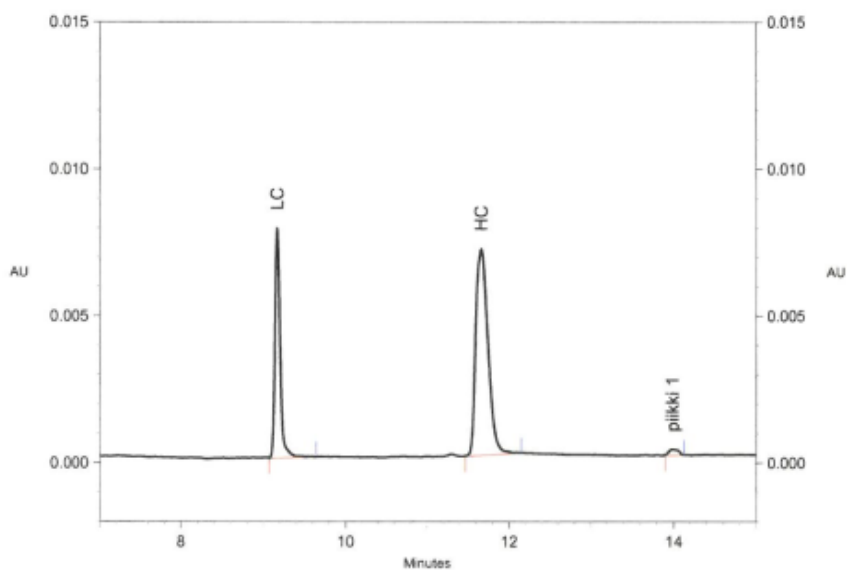
7.2.3 IgG-puhtausmääritys

Kaikissa lopputuotteissa puhtaus oli tuotespesifikaatioiden mukainen (≥ 95 %). Näytteen A1 puhtausmäärityksestä elektroforeesilaitteella saatu kuvaaja on nähtävissä kuvassa 9.



Kuva 9. Näytteen A1 puhtausmäärityksen kuvaaja, joka on saatu elektroforeesilla. Kuvaajassa näkyy absorbanssiarvot ajan funktiona muodostaen piikit kevyt ketjulle (LC) ja raskasketjulle (HC). Kuvaajassa ei ole havaittavissa muita piikkejä, jotka kertoisivat tuotteen sisältämistä epäpuhtauksista.

Tutkittavien näytteiden puhtausmääritysten tulokset olivat referenssinäytteen kanssa samanlaiset. Lukuun ottamatta yhtä näytettä, kaikissa näytteissä sekä referenssinäytteessä IgG-puhtaus oli 100 %. Näytteessä D3 IgG-puhtaus oli 98,6 % ja näytteen kuvaajassa oli havaittavissa ylimääräinen piikki kevyt- ja raskasketjun piikkien lisäksi. Näytteen D3 kuvaaja on nähtävissä kuvassa 10.

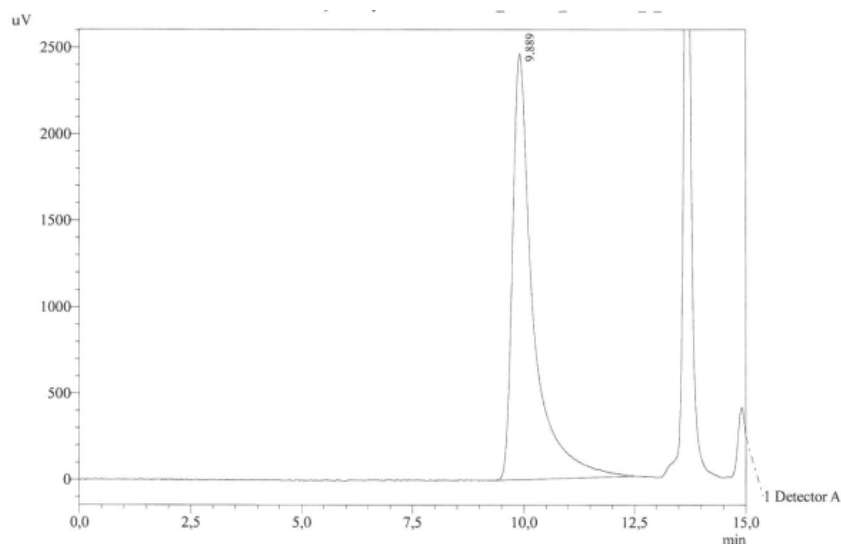


Kuva 10. Näytteen D3 puhtausmäärityksen kuvaaja, jossa on havaittavissa ylimääräinen piikki (piikki 1) kevyt- ja raskasketjun piikkien lisäksi.

Näytteen D3 kuvaajassa esiintyvä piikki saattaa johtua esimerkiksi menetelmän satunnaisvaihtelusta, eikä se aiheuta merkittävää epäpuhtautta näytteessä, sillä näytteen puhtausprosentti täytti tuotespesifikaation hyväksytysti.

7.2.4 Homogeenisuusmääritys

Kaikkien näytteiden homogeenisuus eli monomeerien osuus tuotteessa oli tuotespesifikaatioiden mukainen ($\geq 95\%$). Tutkittavien näytteiden sekä referenssinäytteen monomeerien osuudet olivat 100 %. Näytteen A1 HPLC-laitteella saatu kuvaaja on nähtävissä kuvassa 11.



Kuva 11. HPLC-laitteelta saatu kuvaaja näytteelle A1, jossa näkyy monomeerien UV-taso ajan funktiona. Näytepiikin retentioajan 9,889 vieressä näkyy puskurista peräisin olevat piikit, joilla ei ole näytteen tuloksen kannalta merkitystä.

Tulokset osoittavat, ettei tutkittavien näytteiden monomeerien osuus eroa referenssinäytteen monomeerien osuuksista. Lopputuotteissa ei siis esiinny aggregaattimuotoja, jotka vaikuttaisivat haitallisesti vasta-aineen haluttuun toimivuuteen.

7.3 Reaaliaikaiset säilyvyyskokeet puskuriliuoksille

Reaaliaikaisten säilyvyyskoemittausten cfu-tulokset kolmen kuukauden ajalta olivat kaikkien puskuriliuosten kohdalla negatiivisia. Nykyinen säilyvyysaika natriumatsidia sisältämättömille puskuriliuoksille on 3 kk ja natriumatsidia sisältäville 6 kk. Kolmen kuukauden ajalta olevat säilyvyyskokeiden tulokset ovat nähtävissä taulukossa 7. Raja-arvona Bioburden testaukselle ja hyväksytylle tulokselle pidetään arvoa 0–100 cfu. Kaikkien näytteiden kohdalla arvo on ollut tähän mennessä 0 cfu.

Taulukko 7. Reaaliaikaisten säilyvyyskoemittausten tulokset puskuriliuoksille.

Puskuriliuos	Koostumus	pH	Tulos (30vrk)	Tulos (60vrk)	Tulos (90vrk)
X1	ilman natrium-atsidia ilman suodatusta	6.01	neg.	neg.	neg.
X2	ilman natrium-atsidia suodatettu	6.01	neg.	neg.	neg.
X3	sisältää natriumatsidia	6.01	neg.	neg.	neg.
Y1	ilman natrium-atsidia ilman suodatusta	6.99	neg.	neg.	neg.
Y2	ilman natrium-atsidia suodatettu	6.99	neg.	neg.	neg.
Y3	sisältää natriumatsidia	7.07	neg.	neg.	neg.
T1	ilman natrium-atsidia ilman suodatusta	-	neg.	neg.	neg.
T2	ilman natrium-atsidia suodatettu	-	neg.	neg.	neg.
T3	sisältää natriumatsidia	-	neg.	neg.	neg.
Z1	ilman natrium-atsidia ilman suodatusta	6.02	neg.	neg.	neg.
Z2	ilman natrium-atsidia suodatettu	6.02	neg.	neg.	neg.
Z3	sisältää natriumatsidia	6.02	neg.	neg.	neg.

Vaikka tähänastiset testitulokset ovat olleet kaikkien puskuriliuosten kohdalla negatiivisia, säilyvyyskokeiden jatkuessa liuosten säilyvydessä voi ilmetä eroavaisuuksia pidemmällä aikavälillä, joka selvitetään kokeiden jatkamisella.

8 Yhteenveto ja päätelmät

Opinnäytetyön tarkoituksena oli saada aikaan monoklonaalisten vasta-aineiden puhdistusprosessiin prosessimuutos, jossa natriumatsidia ei lisättäisi puskuriliuoksiin, vaan vasta lopputuotteeseen. Prosessimuutos onnistui odotetulla tavalla ja kaikki testatut tuotteet läpäisivät laadunvalvonnassa tehdyt testit tuotespesifikaatioiden mukaisesti. Prosessimuutoksen hyväksymisen jälkeen, natriumatsidin vuosikulutus vähenee 10-kertaisesti nykyisestä kulutusmäärästä. Puskuriliuosten valmistusvaiheessa ei tarvitse enää lisätä natriumatsidia liuoksiin, vaan liuokset valmistetaan ilman natriumatsidia. Natriumatsidi tullaan lisäämään 10-prosenttisesta natriumatsidiliuoksesta lopputuotteeseen uusien ohjeiden mukaisesti niin, että tuotteen natriumatsidipitoisuus lopussa on noin 0,095 %.

Kromatografiapuhdistukset tutkittavalle vasta-aineelle onnistuivat hyvin. Vaikka 1 000 mg:n puhdistuksissa käytetty pylväs ylikuormittui ja eluointi jouduttiin suorittamaan koneella manuaalisesti, saannot olivat jokaisen näytteen kohdalla kuitenkin suhteellisen hyvät ja hävikkimäärät olivat pienet. Natriumatsidin lisääminen lopputuotteeseen onnistui ongelmitta jokaisen tuotteen kohdalla. Ainoa haaste lisäämisen kannalta oli loppukonsentraatio ja laimennosten laskeminen. Laimennettavien näytteiden kohdalla tuli varmistaa laskemalla, että konsentraatio osuu tavoiterajoihin. Laskemisesta huolimatta, konsentraatio saattoi jäädä osassa näytteistä liian korkeaksi ensimmäisen laimennoksen jälkeen, jonka vuoksi näytettä piti laimentaa vielä lisää. Näin ollen, laimentamiseen käytettävään natriumatsidittomaan puskuriliuokseen tuli lisätä 10-prosenttista natriumatsidiliuosta niin, että näytteen natriumatsidipitoisuus pysyisi pitoisuudessa 0,095 %. Tämä toi työhön oman haasteensa käytännön ja ajan kannalta.

Jatkotutkimuksena voitaisiin esimerkiksi miettiä natriumatsidin lisäyksessä käytettävän sekoituksen validointia sekä vaihtoehtoista säilöntäainetta natriumatsidille, kuten biosideja, jolloin natriumatsidin käyttö laboratoriossa voitaisiin jättää kokonaan pois. Tämä vaatisi kuitenkin laajempia tutkimusasetelmia ja muutoksia sekä vaikutuksia asiakkaiden kannalta. Vaikka analysoidut näytteet läpäisi-

vät laadunvalvonnalliset testit tuotespesifikaatioiden mukaisesti ja prosessimuutos voidaan käsittelyn jälkeen hyväksyä, olisi prosessivalidointia voitu jatkaa vielä useammilla näytteillä. Esimerkiksi tekemällä puhdistuksia eri vasta-ainekilooneille ja käyttämällä eri puskuriliuoksia ja katsoa, onko eri vasta-aineiden tai puskuriliuosten välillä eroavaisuuksia laadunvalvonnan testitulosten kohdalla.

Lopputuotteeseen lisättävä natriumatsidin määrä on laskennallinen ja sen määrä saattaa heitellä pyöritysten mukaan pieniä määriä, sillä pipettien tarkkuus ei riitä pienimpiin desimaaleihin. Vaikka uuden prosessikaavion mukaan valmistettu tuote on pääsääntöisesti samanlainen kuin nykyisen prosessikaavion mukaan tuotettu tuote, olisi hyvä ottaa myös testatuista näytteistä säilyvyysseurattava erä säilyvyyden varmistamiseksi.

Tähänastiset kolmen kuukauden Bioburden-testin tulokset puskuriliuoksille ovat olleet negatiivisia. Säilyvyysseuranta tullaan jatkamaan puskuriliuosten kohdalla vielä ainakin 3 kuukauden ajan, jotta varmistutaan natriumatsidittomien puskuriliuosten säilyvyydestä. Projektissa saatiin tärkeää tietoa siitä, että lähitulevaisuudessa voidaan siirtyä natriumatsidittomiin puskuriliuoksiin ja vähentää natriumatsidin käyttöä laboratoriossa merkittävästi ja saada turvallisempi työympäristö ja työvaiheet työntekijöille.

Lähteet

- 1 Manual v.8.0. Yrityksen sisäinen dokumentti.
- 2 Lahtinen, Ulla. 2012. Vasta-aineen elinkaari laadunvalvonnan näkökulmasta. Opinnäytetyö. Oulun seudun Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
- 3 Vainio, Harri; Liesvuori, Jyrki; Lehtola, Marika; Louekari, Kimmo; Engström, Kerstin; Kauppinen, Timo; Kurppa, Kari; Riipinen, Hannu; Savolainen, Kai & Tossavainen, Antti. 2005. Kemikaalit ja työ. E-kirja. Työterveyslaitos
- 4 Kemikaaliturvallisuus. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<https://www.ttl.fi/tyoymparisto/altisteet/kemikaaliturvallisuus/>>. Luettu 20.3.2021
- 5 Rautanen. Jenni. 2011. Kemikaalien riskinarviointi ja kemikaalikortiston luominen. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Theseus tietokanta.
- 6 Facts About Sodium Azide. 2018. Verkkoaineisto. CDC. <<https://emergency.cdc.gov/agent/sodiumazide/basics/facts.asp>>. Päivitetty 4.4.2018. Luettu 20.1.2021.
- 7 Sodium azide. Verkkoaineisto. Sigma Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/s2002?lang=fi®ion=FI&gclid=Cj0KCQjwI9GCBhDvARIsA-FunhslQ4rv4pkPooblx_ZP5Yx8HWuCHUZEuEGHAOjFiC6MyRCIprQNMmMaAhqeEALw_wcB>. Luettu 25.3.2021.
- 8 Oksidatiivinen fosforylaatio. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/oksidatiivinen_fosforylaatio/>. Luettu 25.3.2021.
- 9 Immunoglobulin G Fab. Verkkoaineisto. Lee Biosolutions. <<https://www.leebio.com/product/4998/immunoglobulin-g-fab-igg-fab-340-27>>. Luettu 25.3.2021
- 10 BioCide ProClin. Verkkoaineisto. Sigma Aldrich. <Biocide-ProClin-Sigma-Aldrich-Hyberlink>. Luettu 2.4.2021.
- 11 Biosidit. Verkkoaineisto. TUKES. <<https://tukes.fi/kemikaalit/biosidit#8afdff33>>. Luettu 2.4.2021.
- 12 Tortora, Gerard J.; Funke, Berdell R. & Case, Christine L. 2016. Microbiology. An introduction. 12th ed. England: Edinburgh gate.

- 13 Monoclonal Antibodies. Verkkoaineisto. Diagnostics Discovery Laboratory. <<https://med.unr.edu/ddl/technology/monoclonal-antibodies>>. Luettu 10.3.2021.
- 14 Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten_vasta-aineiden_tuottaminen/2/>. Luettu 10.3.2021.
- 15 Jaatinen, Kirsi. 2009. IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen määrittäminen immunisoituneiden äitien raskaudenaikaisista plasmanäytteistä. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
- 16 Immunoglobuliini G. Verkkoaineisto. SynLab. <<https://www2.synlab.fi/laboratoriokasikirja/tutkimuskuvaukset/immunoglobuliini-g-1676-s-igg/>>. Luettu 15.3.2021
- 17 Immunoglobulin G. 2018. Verkkoaineisto. Microbe Notes. <<https://microbenotes.com/immunoglobulin-g-igg-structure-subclasses-and-functions/>>. Päivitetty 4.2.2021. Luettu 15.3.2021
- 18 Carvalho, Lucas Silva; da Silva, Otávio Bravim; de Almeida, Gabriela Carneiro; de Oliveira, Juliana Davies; Parachin, Nadia Skorupa ja Carmo, Talita Souza. 2017. Production Processes for Monoclonal Antibodies. Verkkoaineisto. IntechOpen. <<https://www.intechopen.com/books/fermentation-processes/production-processes-for-monoclonal-antibodies>>. Luettu 20.4.2021.
- 19 Lähde. 2021. Laboratorioanalyttikko. Keskustelu 11.3.2021
- 20 Affinity Chromatography Vol. 1: Antibodies. Verkkoaineisto. Cytiva. <<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11660>>. Luettu 11.3.2021.
- 21 Vasta-aineiden puhdistaminen proteiini A.IIa. Yrityksen sisäinen dokumentti.
- 22 Kurki, Pekka & Jalanko, Hannu. Vasta-aineet lääkkeinä. Verkkoaineisto. Duodecim. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo50189>>. Luettu 25.4.2021.
- 23 Khazaeli; Conry; LoBuglio. Human immune response to monoclonal antibodies. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8110730/>>. Luettu 23.4.2021.
- 24 Severino, Valeria. 2016. Monoclonal Antibodies - Quality Control and Quantification through Mass Spectrometry. Verkkoaineisto. Labome. <<https://www.labome.com/method/Monoclonal-Antibodies-Quality-Control-and-Quantification-through-Mass-Spectrometry.html>>. Päivitetty 2.6.2020. Luettu 25.4.2021.
- 25 Actim® Pikatestit. Verkkoaineisto. </pikatestit/>. Luettu 20.3.2021.

- 26 Baker, Monya. 2015. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. Verkkoaineisto. Nature News Feature. <<https://www.nature.com/news/reproducibility-crisis-blame-it-on-the-antibodies-1.17586>>. Luettu 25.4.2021.
- 27 CE-merkintä. Verkkoaineisto. TUKES. <<https://tukes.fi/tuotteet-ja-palvelut/ce-merkinta#a4c03fbd>>. Luettu 25.4.2021.
- 28 MVA-tuotteiden laadunvalvonta testaus. Yrityksen sisäinen dokumentti.
- 29 Miinalainen. 2021. Laadunvalvonta insinööri. Keskustelu 12.4.2021.

Laadunvalvonta-testit ja tuotespesifikaatiot puhdistettavalle vasta-aineelle

Testi	Menetelmä	Spesifikaatio
Ulkonäkö	Silmämääräisesti	Kirkas
Immunoreaktiivisuus	FIA (Fluorometric immunoassay)	80–120 %
IEF (Iso Electric Focusing) profiili	cIEF (capillary isoelectric focusing)	7,0–7,9 pI
IgG-puhtaus	CE (kapillaarielektroforeesi)	≥ 95 %
Monomeerien osuus tuotteessa	HPLC-SEC	≥ 95 %
Proteiinikonsentraatio	Absorbanssi (280 nm)	Laadunvalvonnan (QC) mittaus/vasta-ainetuotannon (MVA-tuotanto) mittaus =95–105 % (±5 %)

Lopputuotteen konsentraation raja-arvot

Konsentraatio ja ilmoitustarkkuus mg/ml	Hyväksyntäraajat tuotannossa mg/ml	Tavoiterajat tuotannossa mg/ml
0,9 – 1,1 (1,0 ± 10 %)	0,90 – 1,10	0,95 – 1,05
1,0 – 1,1	1,01 – 1,10	*)1,05
1,0 – 3,0	1,00 – 3,0	1,05 – 2,86
≥ 2,1	≥ 2,1	≥ 2,21
2,0 – 2,5	2,00 – 2,50	2,11 – 2,38
2,3 – 2,8 (2,5 ± 10 %)	2,25 – 2,75	2,37 – 2,62
≥ 2,6	≥ 2,6	≥ 2,74
2,0 – 4,0	2,0 – 4,0	2,11 – 3,81
3,0 – 6,0	3,0 – 6,0	3,16 – 5,7
4,5 – 5,5 (5,0 ± 10 %)	4,5 – 5,5	4,7 – 5,2
> 6,0	> 6,1	> 6,4
> 8,0	> 8,1	> 8,5
> 9,0	> 9,1	> 9,6
9,0 – 11,0 (10,0 ± 10 %)	9,0 – 11,0	9,5 – 10,5
≥ 10,0	≥ 10,0	≥ 10,5
> 11,0	> 11,1	> 11,7

Yhteenveto laadunvalvonnan testituloksista

Testattavat tuotteet: A, B, C ja D

Testi	Pitoisuus	Immuno-reaktiivisuus (FIA)	Isoelektrinen fokusointi	IgG Purity	Homogeenisuus
Vaatus	QC/MVA 95 - 105 %	Test/Ref 80 - 120 %	pl: 7,0-7,9 Profiili vastaa referenssiä	≥ 95 % puhtaus	≥ 95 % monomeeria
A1	100 %	86 %	7,2-7,7 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
A2	100 %	83 %	7,2-7,8 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
A3	100 %	84 %	7,3-7,8 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
B1	100 %	81 %	7,2-7,8 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
B2	100 %	84 %	7,3-7,8 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
B3	100 %	96 %	7,2-7,8 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
C1	100 %	86 %	7,3-7,7 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
C2	98 %	82 %	7,3-7,7 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
C3	100 %	84 %	7,3-7,7 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
D1	96 %	93 %	7,3-7,7 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
D2	98 %	89 %	7,3-7,7 Profiili vastaa referenssiä	100 %	100 %
D3	98 %	90 %	7,3-7,7 Profiili vastaa referenssiä	98,6 %	100 %

Testaustulos:

- Tuote-erät täyttävät laadunvalvontavaatimukset.
- Referenssieränä käytettiin aiemmin testattua samaa tuote-erää.
- Näytteestä D1 laadittiin poikkeama 240002692, koska näytteen ensimmäiset pitoisuusmittaukset eivät täyttäneet hyväksymiskriteeriä QC/MVA 95 - 105 % MVA:n uusintamittauksen ja erän pitoisuuden päivityksen jälkeen hyväksymiskriteeri täyttyi.
- Alkuperäiset testausdokumentit arkistoidaan laadunvalvonnessa.