

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja Elintarviketekniikan ko.

Laboratoriotekniikka

2017

Heidi Antinmaa

ÄKTA PRIME PLUS – LAITTEISTON KVALIFIOINTI JA VASTA-AINEIDEN LEIMAUSPROSESSISSA KÄYTETTÄVÄN PUSKURIN KORVAAMINEN

Heidi Antinmaa

ÄKTA PRIME PLUS –LAITTEISTON KVALIFIOINTI JA VASTA-AINEIDEN LEIMAUSSPROSESSISSA KÄYTETTÄVÄN PUSKURIN KORVAAMINEN

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kvalifioida ÄKTA Prime Plus -kromatografialaitteisto ja korvata vasta-aineiden leimausprosessissa käytettävä lisääntymiselle vaaralliseksi luokiteltu boraattipuskuri. Opinnäytetyö suoritettiin Wallac Oy:n laatu- ja validointipolitiikkaa noudattaen.

ÄKTA Prime Plus –laitteistoa käytetään leimattujen vasta-aineiden puhdistukseen mahdollisesta proteiiniaggregaatista ja vapaasta leimasta. Laitteiston kvalifiointi sisälsi asennuksen kvalifioinnin (IQ), toiminnan kvalifioinnin (OQ), sekä suorituskyvyn kvalifioinnin (PQ).

Boraattipuskurille oli jo aiemmin löydetty korvaava vaihtoehto, jonka toiminta prosessissa oli osoitettu karakterisoinnilla. Projektia oli tarkoitus jatkaa valmistamalla verifiointierät uudella puskurilla kaikista leimakannoista, joiden valmistuksessa on käytetty boraattipuskuria. Tässä opinnäytetyössä valmistettiin verifiointierä yhdestä näistä kantaliuoksista. Leimakannan valmistuksessa käytettiin kvalifioitua laitteistoa.

Kvalifioinnin tulosten perusteella voitiin todeta, että laitteisto oli oikein asennettu ja toimi ennalta asetettujen vaatimusten mukaisesti. Kvalifioinnin jälkeen laitteisto oli valmis käytettäväksi normaalissa tuotannossa. Uuden puskurin verifiointiin valmistetulle leimakannalle tehtiin normaali prosessin aikainen laadunvalvontatesti, jonka tulokset menivät hyväksymisrajoihin. Tulosten perusteella voidaan todeta, että leimaus uutta puskuria käyttäen onnistui halutulla tavalla. Erälle tehdään vielä myöhemmin kombinaatiotesti ja aloitetaan kiihdytetty ja reaaliaikainen säilyvyysseuranta.

ASIASANAT:

kvalifiointi, geelisuodatuskromatografia, boraattipuskuri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2017 | 51

Instructors: Ilari Suominen, Turku University of Applied Sciences and Veli-Matti Mikkala, PerkinElmer Wallac Oy

Heidi Antinmaa

QUALIFICATION OF ÄKTA PRIME PLUS SYSTEM AND REPLACEMENT OF BUFFER USED IN ANTIBODY LABELLING PROCESS

The objective of the thesis was to qualify an ÄKTA Prime Plus chromatography system and replace the reprotoxic borate buffer used in the antibody labelling process. The thesis was performed complying with the company quality and validation policy.

The ÄKTA Prime Plus system is used for purifying labelled antibodies from protein aggregate and free chelate. The qualification of the system consisted of installation qualification (IQ), operational qualification (OQ) and performance qualification (PQ).

An alternative for borate buffer had already been found and its performance in the process had been shown with characterization. The project was meant to be continued by preparing verification batches with the new buffer of each tracer solution labelled in the borate buffer. In this thesis a verification batch of one of these solutions was prepared. In the preparation of the batch the qualified chromatography system was used.

Based on the qualification results the system was installed correctly and operated fulfilling the requirements. After the qualification the system was ready for use in routine production. The verification batch prepared using the new buffer was subjected to normal in-process quality control. The results were within the acceptance limits. On the grounds of the results, the labelling using the new buffer succeeded. The verification batch will later be subjected to a combination test, an accelerated stability test and a real-time stability test.

KEYWORDS:

qualification, gel filtration chromatography, borate buffer

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	8
2 LAADUNHALLINTA	10
2.1 Laadunhallintajärjestelmä	10
2.2 Laitteiden ja prosessien validointi	11
2.3 Kvalifiointi	13
2.4 REACH ja boraattipuskuri	14
3 VASTA-AINEIDEN LEIMAUUS	17
3.1 DELFIA®-teknologia	17
3.2 Leimausprosessi	20
3.2.1 Vasta-aineiden konjugointi	20
3.2.2 Leimattujen vasta-aineiden puhdistus geelisuodatuskromatografialla	23
3.2.3 Leimausasteen laskeminen ja laadunvalvonta	25
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	26
4.1 ÄKTA Prime Plus –laitteiston kvalifiointi	26
4.1.1 Laitteisto	26
4.1.2 Kvalifioinnin vaiheet	29
4.2 Boraattipuskurin korvaaminen	33
4.2.1 Kiihdytetty säilyvyysseuranta	33
4.2.2 Kombinaatiotestit	35
4.2.3 Reaaliaikainen säilyvyysseuranta	35
5 TULOKSET	36
5.1 ÄKTA Prime Plus –laitteiston kvalifiointi	36
5.1.1 Asennuksen kvalifiointi	36
5.1.2 Toiminnan kvalifiointi	36
5.1.3 Suorituskyvyn kvalifiointi	37
5.2 Boraattipuskurin korvaaminen	39
6 LOPPUPÄÄTELMÄT	40

LIITTEET

Liite 1. Kvalifioinnissa tehdyn asetonitestin kromatogrammi

Liite 2. Kolonnin edellisen asetonitestin kromatogrammi

Liite 3. Kvalifiointierän puhdistuksen kromatogrammi

Liite 4. Verifiointierän valmistus uutta puskuria käyttäen

Liite 5. Verifiointierän puhdistuksen kromatogrammi

KUVAT

Kuva 1 Validoinnin vaiheet	12
Kuva 2 Vaarallisten kemikaalien korvaamisprosessi (14)	15
Kuva 3 Ihmisen alfafetoproteiinin (hAFP) immunomääritys Downin syndrooman riskin määrittämiseen (23)	18
Kuva 4 Ihmisen 17-OH-progesteronin (17-OHP) immunomääritys Adrenogenaalisen oireyhtymän määrittämiseen (24)	18
Kuva 5 Leimavalmistuksen prosessin vaiheet	20
Kuva 6 Kelaatin ITC-ryhmän reaktio proteiinin aminoryhmän kanssa	21
Kuva 7 Leimausreaktioon vaikuttavat parametrit	22
Kuva 8 Dimeerin muodostuminen	22
Kuva 9 Leimattujen vasta-aineiden puhdistuksen vaiheet	23
Kuva 10 Esimerkki absorbanssi-/fluoresenssikäyrästä (28)	24
Kuva 11 ÄKTA Prime Plus -laitteiston virtausreitti (30)	26
Kuva 12 Esimerkki asetonitestin kromatogrammista	31

TAULUKOT

Taulukko 1 Asetonitestin tulokset	37
Taulukko 2 14.12.2016 tehdyn asetonitestin tulokset	37
Taulukko 3 Prosessinaikaisen laadunvalvonnan tulokset	38
Taulukko 4 Kolonnin Eu-taustan mittauksen tulokset	38
Taulukko 5 Verifiointierän prosessin aikaisen laadunvalvontatestin mittaustulokset	39
Taulukko 6 Verifiointierän prosessin aikaisen laadunvalvontatestin tulokset ja hyväksymisrajat	39

KÄYTETYT LYHENTEET

As-arvo	Arvo, joka toimii indikaattorina kolonnin tiiveydelle (Asymmetria-arvo)
CLP	Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus koskien kemikaalien luokitusta, merkintöjä ja pakkaamista (Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures)
CMDCAS	Kanadalainen lääketieteellisten laitteiden vaatimusten arvoitijärjestelmä (Canadian Medical Devices Conformity Assessment)
CMR-aine	Syöpää aiheuttava, perimää vaurioittava ja/tai lisääntymiselle vaarallinen aine (Carcinogen, Mutagen and/or Reproductive toxicant)
DELFIA	PerkinElmer Wallac Oy:n aikaerotteiseen fluorometriaan ja lantanidikelaatteihin perustuva teknologia pienten yhdisteiden tai biomolekyylien määrittämiseen (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay)
DQ	Suunnitelman kvalifiointi (Design Qualification)
DTPA-puhdistettu BSA	Naudan seerumin albumiini (Bovine serum albumin), josta on poistettu raskasmetalleja dietyleenitriamiinipentaetikkahapon (DTPA) avulla
ECHA	Euroopan kemikaalivirasto (European Chemicals Agency)
EU GMP	Euroopan unionin asettama ohjeistus riittävän laatutason saavuttamiseksi (Good Manufacturing Practice)
FDA	Yhdysvaltain lääke- ja ruokaturvallisuusvirasto (Food and Drug Administration)
FIA	Immunomääritys, jossa vasta-aineeseen sitoutuneen leimatun antigeenin määrä on käänteisesti verrannollinen antigeenipitoisuuteen (Fluoro Immuno Assay)
IFMA	Immunomääritys, jossa leimatun vasta-aineen määrä on suoraan verrannollinen näytteen sisältämään antigeenipitoisuuteen (Immune Fluorometric Assay).
IQ	Asennuksen kvalifiointi (Installation Qualification)
ITC-ryhmä	Isotiosyanaattiryhmä, joka leimakelaatissa reagoi vasta-aineen aminoryhmän kanssa
OQ	Toiminnan kvalifiointi (Operational Qualification)
PQ	Suorituskyvyn kvalifiointi (Performance Qualification)

REACH	Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
SAP	Toiminnanohjausjärjestelmä (Systems, Applications and Products in data processing)
SVHC	Eriyistä huolta aiheuttavat aineet (Substances of Very High Concern)
TRF	Aikaerotteinen fluoresenssi (Time-Resolved Fluorescence)
TSA	Geelisuodatuskromatografiassa käytettävä puskuri (Tris-HCl, natriumkloridi ja natriumatsidi)
URS	Käyttäjävaatimukset (User Requirement Specification)

1 JOHDANTO

Turussa toimiva in vitro-diagnostiikan tuotteita valmistava Wallac Oy on osa kansainvälistä PerkinElmer -konsernia. Wallac Oy:n tuotteisiin kuuluvat kulutustarvikkeet tutkimustarkoitukseen, kliinisen diagnostiikan analysaattorit ja reagenssit, sekä analyttiset instrumentit, joita asiakkaat käyttävät tarpeen mukaan joko itsenäisinä tuotteina tai integroituina systeemeinä. (1) PerkinElmer on keskittynyt erityisesti vastasyntyneiden ja raskaana olevien naisten seulontajärjestelmiin. Suurimpina asiakkaina toimivat yliopistot ja sairaalat, sekä yritykset, jotka toimivat bioteknologian, terveydenhuollon, ympäristövalvonnan ja teollisuuden parissa. Tuotteita toimitetaan ympäri maailmaa. (2) 1980 -luvulla Wallac Oy kehitti aikaerotteiseen fluorometriaan ja lantanidikelaatteihin perustuvan DELFIA® -teknologian, johon yrityksen nykypäivänä valmistamat seulonta- ja diagnostiikkamääritykset perustuvat. DELFIA® -teknologialla mitataan eri kiteillä eri hormonien tai muiden biomolekyylien määrää potilasnäytteissä diagnoosia tai hoidon seuraamista varten.

Opinnäytetyö tehtiin PerkinElmer Wallac Oy:n toimeksiantona ja sen tavoitteena oli kvalifioida leimattujen vasta-aineiden puhdistukseen tarkoitettu kromatografialaitteisto. Leimavalmistuksessa käytettävät vanhat vasta-aineiden puhdistukseen tarkoitettut laitteistot halutaan korvata toimintavarmuuden takaamiseksi. Kvalifioinnin tarkoituksena oli osoittaa, että uudelle laitteistolle asetetut vaatimukset täyttyvät toistettavasti. Suoritettaviin toimenpiteisiin kuuluivat asennuksen kvalifointi (IQ), toiminnan kvalifointi (OQ), sekä suorituskyvyn kvalifointi (PQ). Kvalifointi suoritettiin laitevastaavan valmiiksi laatiman suunnitelman pohjalta. Suunnitelmassa olivat kuvattuna myös hyväksymiskriteerit.

Kvalifioinnin lisäksi opinnäytetyössä otettiin käyttöön uusi puskuri vasta-aineleimauksessa käytettävän boraattipuskurin tilalle. Puskuri haluttiin korvata vähemmän vaarallisella vaihtoehdolla sen terveydelle haitallisten vaikutusten takia. Boraattipuskurille on jo aiemmin löydetty korvaava vaihtoehto ja sen oikea toiminta prosessissa muuttamatta valmistettavaa tuotetta on osoitettu karakterisoinnilla (3). Työn tarkoituksena oli jatkaa projektia valmistamalla verifiointierä yhdestä kantaliuoksesta uuden puskurin toimivuuden varmistamiseksi. Verifiointierän leimattu vasta-aine puhdistettiin käyttäen kvalifioitua kromatografialaitteistoa. Kvalifointi ja uuden puskurin käyttöönotto

vasta-aineleimauksessa suoritettiin ja dokumentoitiin Wallac Oy:n laatu- ja validointipolitiikkaa, sekä yleisiä menettelyohjeita noudattaen.

Työn teoriaosuudessa käsitellään Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmään perustuvaa laadunhallintaa, sekä validointi- ja kvalifointipolitiikkaa. Laatujärjestelmän lisäksi teoriaosuudessa käsitellään kemikaalilainsäädäntöä keskittyen boraattipuskurin käyttöön. Työssä toteutetut kromatografialaitteiston kvalifointi ja boraattipuskurin korvaaminen toteutettiin teoriaosuuden pohjalta.

2 LAADUNHALLINTA

2.1 Laadunhallintajärjestelmä

Laadunhallinnalla tarkoitetaan koordinoituja toimenpiteitä organisaation suuntaamiseksi ja ohjaamiseksi laatuun liittyvissä asioissa (4). Laadunhallintajärjestelmän avulla voidaan luoda puitteet jatkuvalla parantamiselle ja määrittellä sellaisia prosesseja, joiden avulla saadaan asiakkaan hyväksymä tuote, sekä ohjata näitä prosesseja. Näin laadunhallintajärjestelmä antaa organisaatiolle ja sen asiakkaille luottamuksen siihen, että organisaation toimittamat tuotteet täyttävät jatkuvasti asiakkaiden ja viranomaisten vaatimukset. (5)

In vitro -diagnostiikassa laatu on erittäin tärkeässä asemassa, sillä käyttötarkoitus edellyttää tuotteilta potilasturvallisuuden varmistamiseksi luotettavia ja oikeita tuloksia. Laadunhallintajärjestelmänsä ansiosta PerkinElmer Wallac Oy pystyy osoittamaan asiakkaille ja viranomaisille tuotteiden täyttävän laatuvaatimukset ja takaamaan toimitettujen tuotteiden turvallisuuden, sekä testitulosten oikeellisuuden. PerkinElmer Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmään kuuluu muutostenhallinta, dokumenttien ja tallenteiden hallinta, riskinhallinta, resurssien hallinta, sekä tuotehallinta. Laadunhallintajärjestelmä toimii pohjana menettelyohjeille. (1)

PerkinElmer Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmä noudattaa EN ISO 13285:2012-laadunhallintajärjestelmästandardia, EN ISO 9001:2008 standardia, Euroopan IVD 98/79/EY-direktiiviä, amerikkalaisen FDA:n laatu järjestelmäsäädöksiä, 13285:2003 standardia CMDCAS -säännöksen alla, sekä muita maakohtaisia viranomaisten määräyksiä tarpeen mukaan (1). Säädösten noudattamista valvotaan mm. FDA:n suorittamalla tarkastuksilla, joilla pyritään varmistamaan, että valmistajalla on FDA:n vaatimukset täyttävät menettelyt, joita noudatetaan. Tämä edellyttää kattavaa dokumentaatiota toimintatapojen osoittamiseksi.

Muutostenhallintaprosessi on osa laadunhallintaa ja koostuu muutoksien hyväksymisestä, niistä tiedottamisesta ja käyttöön otosta osana laadunhallintajärjestelmää. Prosessin avulla varmistetaan, että laadunhallintajärjestelmään tehdyt muutokset toteutetaan vahingoittamatta tuotteita ja palveluita ja että ne täyttävät viranomaisten ja liiketaloudelliset vaatimukset. (1)

Dokumenttien hallintajärjestelmän tarkoitus on varmistaa, että laadunhallintadokumentit noudattavat liiketoiminnan ja viranomaisten vaatimuksia, kansainvälisiä laatustandardeja, sekä Wallacin omia toimintaohjeita. Laadunhallintadokumenttien tallenteet ovat dokumentteja, joiden tarkoitus on kuvata saatuja tuloksia tai varmentaa suoritettuja toimenpiteitä. Tallenteiden hallintapolitiikka varmistaa tallenteiden luomisen, ylläpidon, käytettävyyden, suojaamisen, sekä hävittämisen asianmukaisella tavalla. (1)

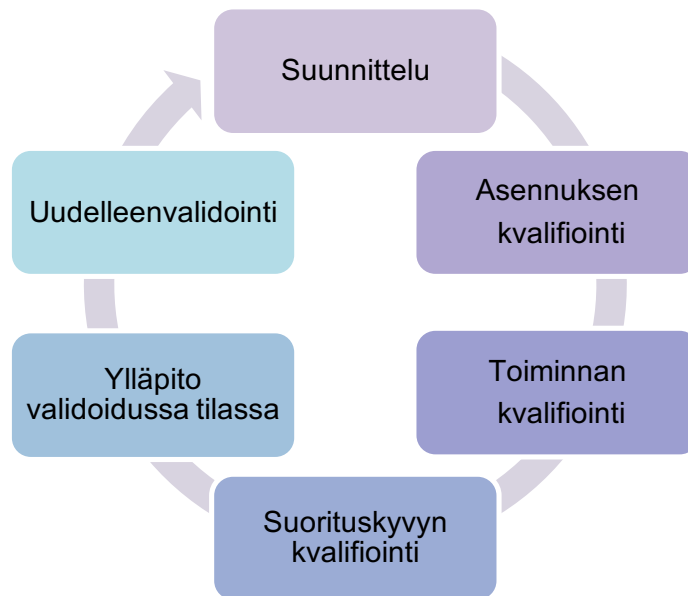
Wallac Oy:llä riskinhallintaprosessi perustuu EN ISO 14971-standardiin ja koostuu riskin arvioinnista, riskinvalvonnasta ja tuotannon jälkeisen vaiheen valvonnasta ja tiedonkeruusta. Riskit ovat jaoteltu tuoteturvallisuuteen ja tehokkuuteen liittyviin riskeihin, työturvallisuusriskeihin ja liiketoimintariskeihin. Riskinhallinta vaikuttaa prosessivalidointien tärkeysjärjestyksen luomiseen, sekä validoinneissa käytettävien hyväksymiskriteereiden tunnistamiseen. (1)

2.2 Laitteiden ja prosessien validointi

Tuotannossa käytettävien laitteiden ja prosessien on täytettävä niille käyttötarkoituksen mukaan ennalta asetetut vaatimukset, jotka on asetettu käyttötarkoituksen mukaan. Näiden kyky tuottaa halutunlaisia ja spesifikaatiot täyttäviä tuotteita varmistetaan validoinnin avulla. Yhtenä osana validointia suoritetaan kvalifointi, johon kuuluu muun muassa prosessissa käytettävien laitteiden oikean toiminnan osoittaminen. Validointitarve voi syntyä esimerkiksi uuden prosessin tai tuotteen kehittämisestä, laadussa havaituista puutteista tai muutoksista joissakin prosessin osissa. PerkinElmer Wallac Oy:llä uudet reagenssien valmistusprosessit, puhdistusprosessit, testimenetelmät, sekä tietokonejärjestelmät ja -ohjelmistot validoidaan aina ennen käyttöönottoa. Laitteiden asennus ja kvalifointi suoritetaan ja dokumentoidaan yrityksen menettelytapojen ja protokollien mukaisesti. (1) Kaikki validoinnit suoritetaan noudattaen etukäteen hyväksytyä validointisuunnitelmaa, jossa määritellään hyväksymiskriteerit (6). Validoinnin avulla voidaan vähentää prosessikontrolli- ja lopputuotteen testaustarvetta, sekä pidemmällä aikavälillä rutiinituotannon kustannuksia. Validointi varmistaa myös tuotteiden laatua. (7)

Validointi ei ole yksittäinen tapahtuma, vaan koostuu toimenpiteistä, jotka kattavat koko validointikohteen eliniän (Kuva 1). FDA:n ohjeistuksien mukaan prosessin validointi koostuu suunnittelusta, kvalifoinnista ja jatkuvasta valvonnasta. Suunnitteluvaiheessa suunnitellaan prosessi ja määritellään siihen tai tuotteisiin kohdistuvat vaatimukset.

Suunnitteluvaiheessa määritellään myös keinot hallita prosessia, esimerkiksi laadunvalvonta-analyysit. Kvalifioinnilla tarkoitetaan toimenpiteitä, joilla voidaan todentaa prosessin kyvykkyys ennalta määritetyissä toimintarajoissa. Prosessin jatkuvan valvonnan tarkoituksena on varmistaa, että prosessi pysyy validoidussa tilassa ja tuottaa spesifikaatiot täyttäviä tuotteita. Tämä tarkoittaa säännöllistä prosessin ja tuotteiden laadunvalvontadatan analysointia. (8)



Kuva 1 Validoinnin vaiheet

Koska jäljitettävyys ja trendit ovat tärkeä osa laitteiden kunnossapitoa ja seuranta, merkitään laitteet Wallac Oy:llä aakkosnumeerisilla tunnisteilla. Tämä mahdollistaa historiatietojen tarkastamisen ja suunnitelmien mukaisten puhdistusten ja huoltojen varmistamisen. Kaikki laitteiden kalibrointiin, puhdistamiseen ja kunnossapitoon liittyvät toimenpiteet dokumentoidaan ja näistä toiminnoista vastaavat henkilöt koulutetaan. (6)

Jos prosessi ei tuota jatkuvasti hyväksyttäviä tuotteita tai prosessinaikaisten parametrien arvot poikkeavat spesifikaatioista, ei prosessi tällöin ole hallinnassa eikä tuotteen toimivuutta tai turvallisuutta voida taata. Tällöin prosessi uudelleenvalidoidaan. Tarpeen uudelleenvalidoinnille voi myös aiheuttaa tuotteen koostumuksen muutos, laitemuutos, valmistusmenetelmän muutos, merkittävät muutokset prosessissa tai väliajoin tehtävä varmistus siitä, että prosessi edelleen toimii vaatimusten mukaisesti (7). Wallac

Oy:llä tarve uudelleenvalidoinnille arvioidaan riskiarvion kautta aina kun kohteeseen tehdään muutoksia (1).

Silloin kun muutos ei vaadi uudelleenvalidointia, voidaan prosessille suorittaa verifiointi. Verifiointi on objektiiviseen näyttöön perustuva osoitus siitä, että muutos ei vaikuta menetelmän kykyyn saavuttaa asetettuja toimivuusparametrien spesifikaatioita. Prosessin toimivuutta ei tällöin tarvitse osoittaa yhtä laajasti kuin validoinnissa. (6)

Prosessille suoritetaan karakterisointi, jos se ei ole tarpeeksi hyvin tunnettu. Karakterisointi suoritetaan dokumentoitujen tutkimusten avulla. Hyväksytyjen karakterisointiraporttien jälkeen voidaan aloittaa validointiprosessi, jonka tarkoituksena on todentaa karakterisoinnissa luodun prosessin toimivuus. (6)

2.3 Kvalifiointi

Kvalifiointia voidaan pitää yhtenä validoinnin osana. Kvalifioinnilla yleensä tarkoitetaan sellaisia toimenpiteitä, joilla laitteiden, hyödykkeiden ja tilojen asennus, toiminnallisuus ja suorituskyky voidaan osoittaa. Kvalifioinnin avulla varmistetaan siitä, että systeemille asetetut vaatimukset täyttyvät toistettavasti.

PerkinElmer Wallac Oy:n menettelyohjeissa laitteiden kvalifiointiin luetaan asennuksen kvalifiointi (IQ, installation qualification), toiminnan kvalifiointi (OQ, operational qualification), sekä suorituskyvyn kvalifiointi (PQ, performance qualification). Asennuksen kvalifioinnilla varmistetaan, että laitteen ja oheisjärjestelmien asennus noudattaa valmistajan hyväksymiä spesifikaatioita, ja että laitteiston toimittajan suositukset ovat otettu huomioon. Toiminnan kvalifioinnilla osoitetaan laitteiston pystyvän ylläpitämään ennalta määritetyt kontrolli- ja toimenpiderajat, ja toimivan suunnitelluissa toimintarajoissa. Suorituskyvyn kvalifiointi yhdistää prosessin ja laitteiston varmistamalla laitteen toimivan prosessin vaatimassa käyttötarkoituksessa toistettavasti. (1; 9) Joissakin tapauksissa suorituskyvyn kvalifiointi voidaan suorittaa yhdistettynä toiminnan kvalifioinnin kanssa. Ennen systeemin hankintaa luodaan käyttäjävaatimukset (URS, user requirements specification), jotka määrittelevät laitteen spesifikaatiot ja vaatimukset. Kvalifiointiin voidaan katsoa myös kuuluvaksi suunnittelun kvalifiointi (DQ, design qualification). EU GMP:n Qualification and Validation -ohjeistuksissa DQ määritellään suunni-

teltujen spesifikaatioiden ja vaatimusten tarkastamisena ja kuuluu suoritettavaksi ensimmäisenä käyttäjävaatimusten luonnin jälkeen. (10)

Kvalifiointitoiminta kattaa kaikki laitteet, hyödykkeet ja laboratorio- ja tuotantotilat. Laitteet jaetaan eri kvalifiointiluokkiin laitteen käyttötarkoituksen, laitetyypin tai teknisen toiminnan mukaan tai sen mukaan, miten laite vaikuttaa toiminnon tai tuotteen laatuun. Ryhmän mukaan määritellään kvalifioinnin laajuus. Laitteet jaetaan kvalifiointiluokkiin A, B ja C. Kvalifiointiluokkaan A kuuluvat laitteet kuuluvat kvalifioitaviin laitteisiin, mutta ovat kertaluontoisia hankintoja tai laitteesta ei ole aiemmin tehty B-luokan kvalifiointipohjaa. A-luokan laitteet ovat esimerkiksi kokonaisia linjoja tai uusia laitetyppejä. Kvalifiointiluokkaan B kuuluvat laitteet ovat ns. standardilaitteita, esim. määrityslaitteita. Kvalifiointiluokkaan C kuuluvat laitteet ovat toiminnaltaan yksinkertaisia ja niiden toiminnanosoituksena on monesti kalibrointi. (9) Tässä työssä tehtävä ÄKTA Prime Plus -laitteiston kvalifiointi kuuluu luokkaan B, sillä samanlaisia laitteita on ollut käytössä aiemmin. Kvalifiointiin sisältyivät IQ-, OQ- ja PQ-osuudet.

2.4 REACH ja boraattipuskuri

REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) on Euroopan unionin vuonna 2007 voimaan tullut asetus No 1907/2006, joka on tarkoitettu varmistamaan terveyden- ja ympäristönsuojelun korkea taso, parantamaan EU:n kemikaaliteollisuuden kilpailukykyä, sekä yhdenmukaistamaan kemikaalilainsäädäntö Euroopassa. REACH-asetuksen tarkoituksena on myös edistää vaihtoehtoisten keinojen käyttämistä kemikaalien aiheuttamien vaarojen arviointiin eläinkokeiden määrän vähentämiseksi. Asetus koskee kemikaalien rekisteröintiä, arviointia, lupamenettelyjä ja rajoituksia ja sitä sovelletaan kaikkiin Euroopan alueella valmistettaviin ja markkinoitaviin kemiallisiin aineisiin, minkä vuoksi se vaikuttaa useimpiin yrityksiin koko Euroopan unionin alueella. REACH-asetus määrää yrityksille velvollisuuden kerätä tietoja valmistamiensa tai tuomiensa aineiden ominaisuuksista ja käyttötavoista, sekä arvioitava aineeseen liittyvät vaarat ja mahdolliset riskit. Teknisten, tieteellisten ja hallinnollisten näkökohtien hallinnoimiseksi, täytäntöön panemiseksi, sekä sen yhdenmukaisuuden varmistamiseksi Euroopan unionissa ja Euroopan talousalueeseen kuuluvissa maissa, on perustettu Euroopan kemikaalivirasto (ECHA). (11; 12)

Täyttääkseen asetuksen vaatimukset yritysten on tunnistettava ja hallittava riskejä, jotka liittyvät niiden valmistamiin ja tuottamiin aineisiin. Tämän lisäksi yrityksen on osoi-

tettava miten ainetta voidaan käyttää turvallisesti ja tiedotettava käyttäjää riskinhallinta-toimenpiteistä käyttöturvallisuustiedotteilla. Jos riskejä ei voida riittävästi hallita, aineiden käyttö voidaan kokonaan kieltää tai käyttöä voidaan rajoittaa, jolloin vaaralliset kemikaalit ovat korvattava vähemmän vaarallisilla vaihtoehdoilla (Kuva 2). SVHC-aineet (substance of very high concern), eli erityistä huolta aiheuttavat aineet, lisätään aluksi luvanvaraisten aineiden kandidaattilistaan josta ne voivat päätyä luvanvaraisiksi. Luvanvaraisten aineiden käytölle määrätään siirtymäaika ja lopetuspäivä, jonka jälkeen ainetta ei saa käyttää ilman lupaa. Rajoitukset koskevat ainetta sellaisenaan, sekoituksessa tai tavarassa, mukaan lukien aineet, joita ei tarvitse rekisteröidä. Lopullisen päätöksen luvanvaraisuudesta ja rajoituksista tekee Euroopan komissio yhdessä jäsenvaltioiden kanssa ottaen huomioon Euroopan kemikaaliviraston antamat tieteelliset lausunnot. Kun rajoitus on hyväksytty, teollisuuden, mukaan lukien valmistajat, maahan-tuojat, jakelijat, loppukäyttäjät, sekä vähittäiskauppiaat, on sovellettava rajoitusta. (13)



Kuva 2 Vaarallisten kemikaalien korvaamisprosessi (14)

Euroopan unionin CLP-asetus (classification, labelling and packaging of substances and mixtures) (No 1272/2008) antaa kriteerit, joiden perusteella kemikaali luokitellaan vaaralliseksi. Jos aineen tai seoksen luokitusta ei ole selvitetty, asetus määrää toiminnanharjoittajan selvittämään itse aineen sisäiset ominaisuudet, joiden avulla luokitus tehdään. CLP-asetuksen tarkoituksena on antaa yhdenmukaistetut eli harmonisoidut luokitukset ja merkinnät perimää vaurioittaville, syöpä aiheuttaville, lisääntymiselle vaarallisille ja hengitysteitä herkistäville ominaisuuksille, sekä muille ominaisuuksille tapauskohtaisesti. Asetus antaa lisäksi ohjeet sille, miten kemikaali tulee pakata turvallisen käytön varmistamiseksi. ECHA ylläpitää luokitusten ja merkintöjen luetteloa teollisuuden ilmoituksista vaarallisten aineiden luokituksista ja merkinnöistä. (15; 16)

Dinatriumtetraboraatti ja boorihappo kuuluvat CMR-aineisiin (carcinogen, mutagen and/or reproductive toxicant) ja luokitellaan erityistä huolta aiheuttaviksi aineiksi, minkä vuoksi ne ovat luvanvaraisten aineiden kandidaattilistalla. (12; 17) CMR-aineet voivat vaikuttaa DNA:han muuttamalla sitä ja aiheuttamalla hallitsematonta solujen kasvua, eli syöpää tai häiritä sukupuolista kehitystä. Dinatriumtetraboraatti ja boorihappo luokitel-

laan CLP-asetuksen mukaan lisääntymiselle vaarallisten aineiden luokkaan 1B ja niihin on liitetty vaaralauseke H360. Aineet ovat lisääntymiselle vaarallisia ja voivat vaurioittaa perimää (mutageeninen) tai kehittyvää sikiötä (teratogeeninen). Dinatriumtetraboraatti hajoo boorihapoksi reagoidessaan veden kanssa reaktioyhtälön mukaan:



PerkinElmer Wallac Oy:llä dinatriumtetraboraattia käytetään vasta-aineiden leimausprosessissa käytettävässä boraattipuskurissa.

Puskuriliuoksiksi kutsutaan liuoksia, joiden pH ei oleellisesti muutu lisättäessä pieniä määriä happoa tai emästä. Puskuriliuos siis vastustaa pH:n muutosta. (19) Vasta-aineiden leimausprosessissa pH on tärkeässä asemassa ja boraattipuskurin avulla se on saatu säädettyä sopivaksi. Huolimatta siitä, päätyvätkö aineet luvanvaraisten aineiden listalle vai rajoitetaanko käyttöä, se halutaan korvata vähemmän vaarallisella vaihtoehdolla mahdollisten haitallisten vaikutusten takia. Uuden puskurin ominaisuuksien, kuten pH:n ja liukenevuuden täytyy olla lähellä boraattipuskurin ominaisuuksia, eikä puskuri saa vaikuttaa leimausreaktioon. Boraattipuskurille on jo löydetty korvaava vaihtoehto ja sen toimivuus prosessissa on osoitettu. Opinnäytetyössä jatketaan projektia valmistamalla verifiointierä yhdestä kantaliuoksesta uuden puskurin toimivuuden varmistamiseksi.

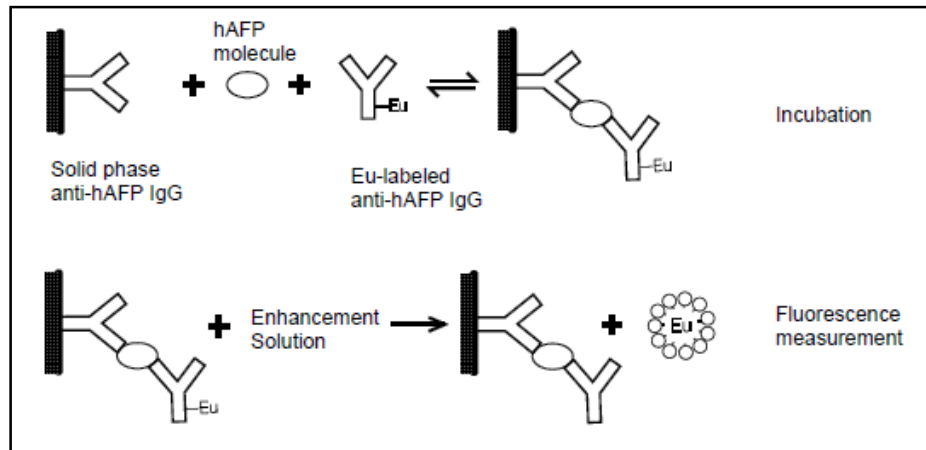
3 VASTA-AINEIDEN LEIMAUS

3.1 DELFIA®-teknologia

Vasta-ainemääritykset perustuvat spesifisen vasta-aineen sitoutumiseen määritettävään antigeeniin, joko liuoksessa tai kiinteällä pinnalla. Sitoutumista voidaan mitata esimerkiksi värimuutoksesta tai valontuotosta saatavan signaalin avulla. Vasta-ainemäärityksen etuina ovat suuri herkkyys ja spesifisyys. (20)

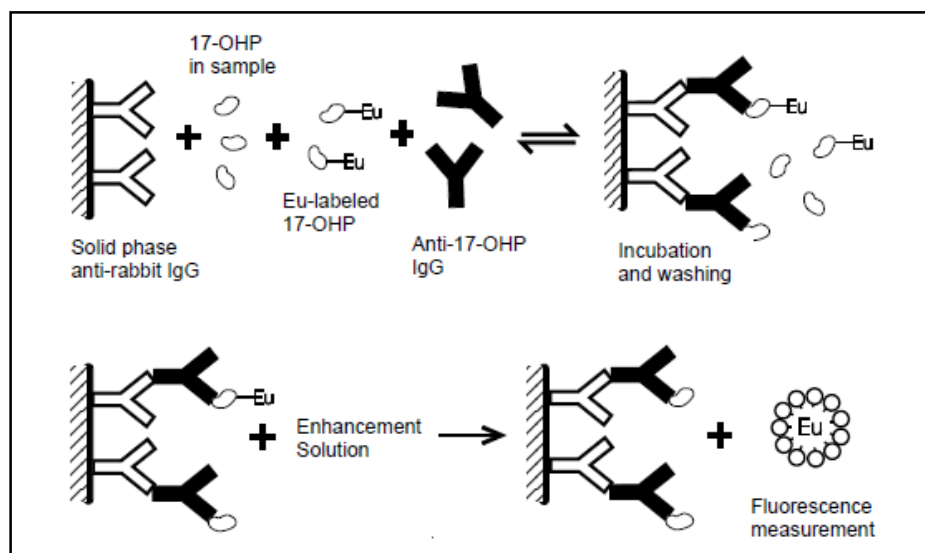
DELFIA® on PerkinElmer Wallac Oy:n teknologia yhdisteiden tai biomolekyylien määrittämiseen lantanidikelaatilla leimattujen reagenssien avulla. Määritys perustuu lantanidikelaatin fluoresenssiin. Mittaus on aikaerotteinen (Time-Resolved Fluorescence, TRF), eli signaalin mittaus tapahtuu pienen aikaviiveen jälkeen virityksestä, jolloin epäspesifinen taustafluoresenssi on poistunut. Määritykset ovat IFMA-tyyppisiä, joissa signaali kasvaa pitoisuuden kasvaessa tai FIA-tyyppisiä, joissa signaalin noustessa yhdisteen pitoisuus laskee. (21)

Ei-kilpailevassa IFMA-määrityksissä spesifinen vasta-aine kiinnitetään mikrotiitterilevyn kuopan pintaan. Tähän lisätään näyte tai standardi, joka sitoutuu spesifisesti kuopan pinnalla olevaan vasta-aineeseen. Antigeenin sitouduttua lisätään vielä lantanidikelaatilla leimattu toinen spesifinen vasta-aine, joka sitoutuu pinnassa olevaan antigeeniin. Kelaatin fluoresenssi mitataan, jolloin saadaan selville leimatun vasta-aineen määrä, joka taas on suoraan verrannollinen näytteen sisältämään antigeenipitoisuuteen. IFMA-määrityksissä tausta on tyypillisesti hyvin matala ja standardikuvaaja on lineaarinen laajalla alueella. Antigeenin on oltava tarpeeksi suuri vähintään kahden eri vasta-aineen sitomiseen. (22) Kuvassa 3 on esimerkki ei-kilpailevasta immunomäärityksestä.



Kuva 3 Ihmisen alfafetoproteiinin (hAFP) immunomääritys Downin syndrooman riskin määrittämiseksi (23)

Kilpailevassa FIA-määrityksissä spesifistä vasta-ainetta sidotaan tietty määrä mikroitiiterilevyn kuopan pintaan toisen vasta-aineen tai streptavidini-biotiini -reaktion avulla. Näytteen tai standardin antigeeni kilpailee leimatun antigeenin kanssa spesifisen vasta-aineen sitomispaikoista. Tällöin vasta-aineeseen sitoutuneen leimatun antigeenin määrä on käänteisesti verrannollinen antigeenipitoisuuteen. (22) Kuvassa 4 on esimerkki kilpailevasta immunomäärityksestä.



Kuva 4 Ihmisen 17-OH-progesteronin (17-OHP) immunomääritys Adrenogenaalisen oireyhtymän määrittämiseksi (24)

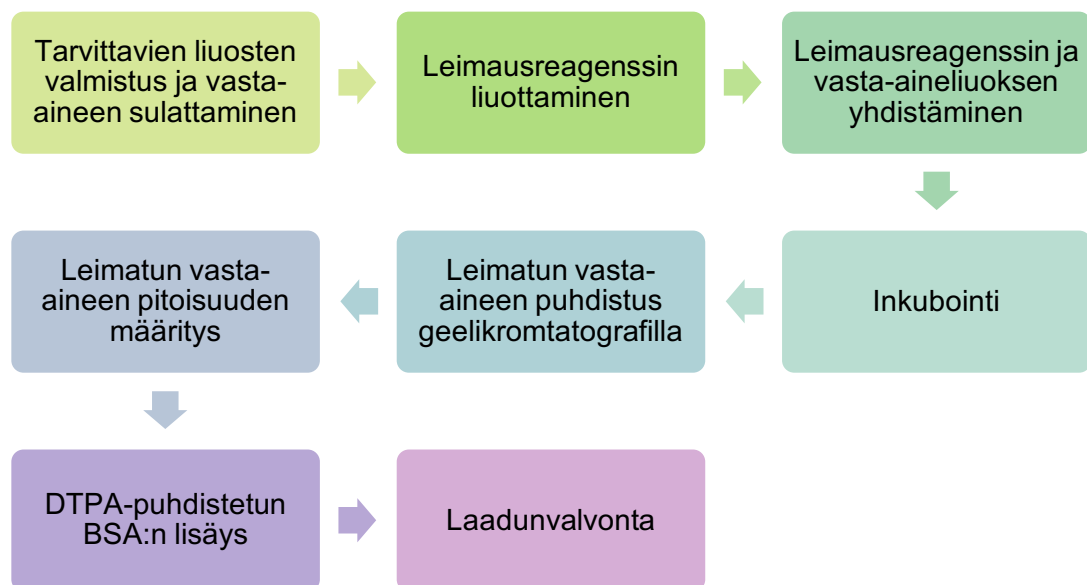
Molemmissa määrityksissä leimattua vasta-ainetta ja näytettä tai standardia sisältävä kuoppalevy pestään siihen tarkoitetulla pesurilla. Pesun jälkeen kuopassa on jäljellä enää immunoreaktiossa kiinnittyneet leimatut vasta-aineet tai antigeenit. Koska leimattu biomolekyyli ei ole sellaisenaan fluoresoiva, kuoppiin lisätään vielä hapan kehitysliuos (Enhancement Solution tai DELFIA Inducer), joka irrottaa lantanidin. Vapaan lantanidin ympärille muodostuu misellirakenne ja yhdessä nämä muodostavat uuden hyvin fluoresoivan kelaatin. Fluoresenssi mitataan aikaerotteisella mittausmenetelmällä. (22; 25)

Sopivia lantanideja leimaukseen ovat europium, samarium, terbium ja dysprosium. Näistä yleisin on europium. Lantanidikelaattien fluoresenssilla on pitkä elinikä, jota voidaan hyödyntää määrityksissä. Epäspesifisen taustafluoresenssin elinikä on paljon lyhyempi, minkä vuoksi se ehtii sammua ennen kuin näytteen fluoresenssi mitataan. Lisäksi lantanidikelaateilla on iso Stokesin siirtymä, eli eksikaatio- ja emissiopiikin aallonpituuksien ero. Näiden ominaisuuksien ansiosta määrittäminen voidaan tehdä aikaerotteisena. Lantanidikelaattien käyttö ja aika-erotteinen fluoresenssi antavat mittauksille hyvän herkkyuden ja laajan mittausalueen. (21)

3.2 Leimausprosessi

Leimavalmistuksessa valmistetaan europiumilla tai samariumilla leimattuja vasta-aineita IFMA -tyyppisiin määrittelyksiin, sekä antigeeni/vasta-aine-pareja FIA -tyyppisiin määrittelyksiin. Leimavalmistuksen prosessi koostuu neljästä osa-alueesta, joita ovat Eu tai Sm-kelaatin konjugointi vasta-aineeseen, leimattujen antigeeni- ja vasta-aineliuosten laimentaminen, leimastandardien valmistus, sekä kaikkien edellämainittujen tuotteiden pullotus. Jokaiseen vaiheeseen kuuluu tuotteiden laadunvalvonta. (26)

Vasta-aineiden leimausprosessin vaiheet ovat tarvittavien konjugointi-, kromatografia- ja laimennosliuosten valmistus, vasta-aineen leimaus, puhdistus geelisuodatuskromatografialla, fraktioiden testaus ja laadunvalvonta. (26) Leimausprosessissa vasta-aineet leimataan Eu- tai Sm-ionin sisältävällä kelaatilla. Jokainen leimakanta valmistetaan Wallac Oy:n valmistusohjeiden mukaan.



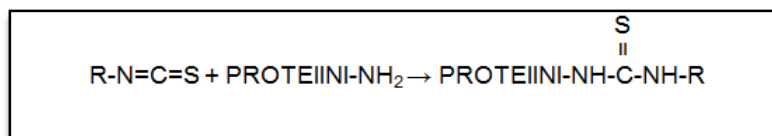
Kuva 5 Leimavalmistuksen prosessin vaiheet

3.2.1 Vasta-aineiden konjugointi

Vasta-aine leimataan emäksisessä puskuriliuoksessa, jossa on ylimäärä lantanidikelaattia. Leimakannan valmistus alkaa tarvittavien liuosten valmistamisella, sekä tar-

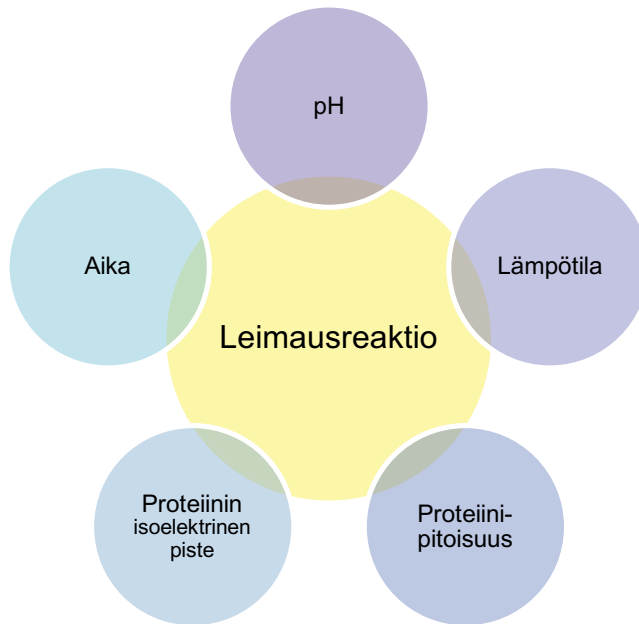
vittaessa vasta-aineen sulattamisella ja leimausreagenssin liuottamisella. Tämän jälkeen leimausreagenssi lisätään vasta-aineliuokseen, seoksen pH mitataan ja säädetään tarvittaessa. Yhdistämisen jälkeen seos siirretään inkuboitavaksi. (26) Inkuboinnin aikana tapahtuu vasta-aineen ja leimausreagenssin sitoutuminen.

Käytettäviä leimareagensseja ovat N¹-Eu-, N¹-Sm- ja N³-Eu-kelaatit, BITC (biotini-isotiosyanaatti) ja biotiiniesteri. Yleisimpiä näistä ovat N¹-Eu-, N¹-Sm-, N³-Eu-kelaatit, joita kutsutaan isotiosyanaattikelaateiksi. Näiden kelaattien isotiosyanaattiryhmä (ITC) reagoi vasta-aineen aminoryhmän kanssa, jolloin kelaatin ja vasta-aineen välille muodostuu kestävä tioureasidos. BITC-reagenssia käytetään vasta-aineiden biotinylointiin ja sitä voidaan käyttää ITC-kelaattien tavoin. Biotiiniesteriä käytettäessä biotiiniesterin esteriryhmä reagoi proteiinin aminoryhmän kanssa muodostaen amidisidoksen. (Henkilökohtainen tiedonanto, Veli-Matti Mukkala 05.01.2017 ja 13.02.2017)



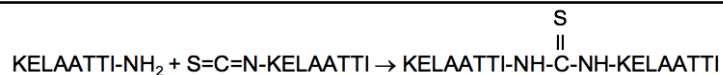
Kuva 6 Kelaatin ITC-ryhmän reaktio proteiinin aminoryhmän kanssa

Leimamolekyylin ITC-ryhmä reagoi aminoryhmien (NH₂), hydroksyyliiryhmien (OH) ja tioliryhmien (SH) kanssa. Aminoryhmän kanssa ITC-ryhmä reagoi herkästi ja muodostaa pysyvän sidoksen. Tioliryhmän kanssa muodostuvasta sidoksesta ei tule pysyvää. Hydroksyyliiryhmän kanssa ITC-ryhmä ei sitoudu kovin herkästi, vaan sitoutuu ensisijaisesti aina aminoryhmien kanssa. Tämän vuoksi Wallac Oy:llä leimaus tehdään aina sitomalla kelaatti vasta-aineen *Lys*-tähteen aminoryhmän kanssa. (Henkilökohtainen tiedonanto, Veli-Matti Mukkala 05.01.2017 ja 13.02.2017)



Kuva 7 Leimausreaktioon vaikuttavat parametrit

Leimausreaktion tehokkuus muuttuu olosuhteiden muuttuessa. Kuvassa 7 on esitetty reaktion tehokkuuteen vaikuttavat parametrit. Leimaus-pH:lla on merkittävä vaikutus prosessin tehokkuuteen, sillä se vaikuttaa vasta-aineen *Lys*-tähteiden aminoryhmien reaktiivisuuteen. Mitä korkeampi pH on, sitä enemmän aminoryhmät ovat deprotonoituneita ja leimaus tällöin tehokkaampaa. Alhaisin mahdollinen pH *Lys*-tähteleimauksessa on 8,5. Mitä korkeampi pH on, sitä enemmän kelaatin ITC-ryhmä reagoi veden kanssa. Veden kanssa reagoidessa ITC-ryhmä hajoaa aminoryhmäksi, joka taas reagoi vapaan kelaatin ITC-ryhmien kanssa muodostaen dimeereitä. Myös lämpötilan nosto saa ITC-ryhmän reagoimaan herkemmin veden kanssa ja nopeuttaa ITC-ryhmän hajoamista. (Henkilökohtainen tiedonanto, Veli-Matti Mukkala 05.01.2017 ja 13.02.2017)



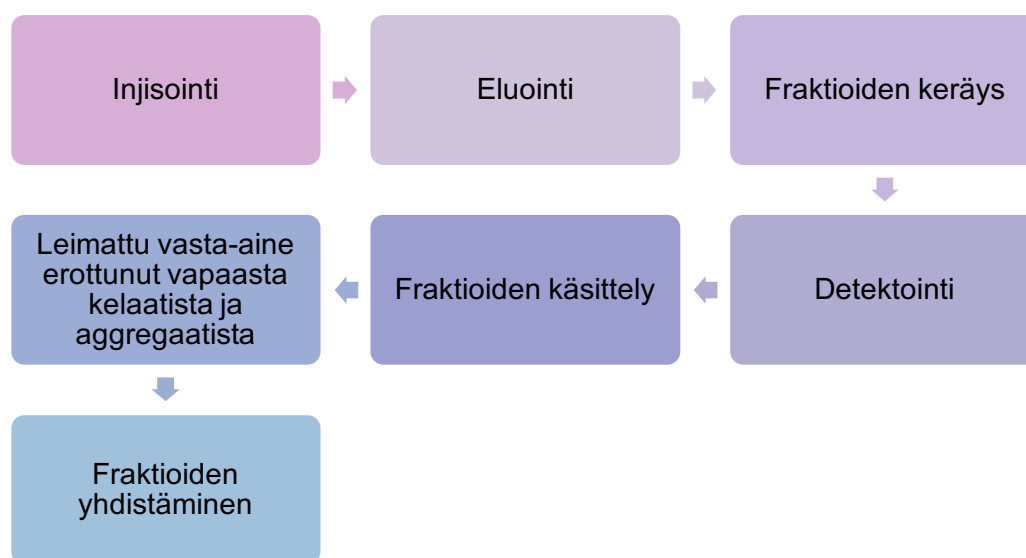
Kuva 8 Dimeerin muodostuminen

Myös proteiinipitoisuudella on vaikutus reaktiotehokkuuteen. Mitä korkeampi proteiinipitoisuus on, sitä korkeampi *Lys*-tähtepitoisuus, jolloin leimaus on tehokkaampi. Lisäksi

proteiinin isoelektrinen piste vaikuttaa leimauksen tehokkuuteen. Jos proteiinin isoelektrinen piste on yhtäsuuri tai suurempi kuin leimaus-pH, proteiinin ja kelaatin välillä ei ole hylkimistä. (Henkilökohtainen tiedonanto, Veli-Matti Mukkala 05.01.2017 ja 13.02.2017)

Jotkin yhdisteet saattavat myös häiritä leimausreaktiota. Mikäli leimattava proteiini on stabiloitu proteiinilla, kuten BSA:lla tai gelatiinilla, tällöin myös stabiloiva proteiini leimautuu ja aiheuttaa määrittämisessä taustaa. Muita ITC-kelaatin kanssa reagoivia yhdisteitä ovat atsidit, yhdisteet joissa on aminoryhmä, sekä yhdisteet joissa on SH-ryhmä. Häiritsevät yhdisteet poistetaan ennen leimausta geelisuodatuskromatografialla tai dialyysillä. (Henkilökohtainen tiedonanto, Veli-Matti Mukkala 05.01.2017 ja 13.02.2017)

3.2.2 Leimattujen vasta-aineiden puhdistus geelisuodatuskromatografialla



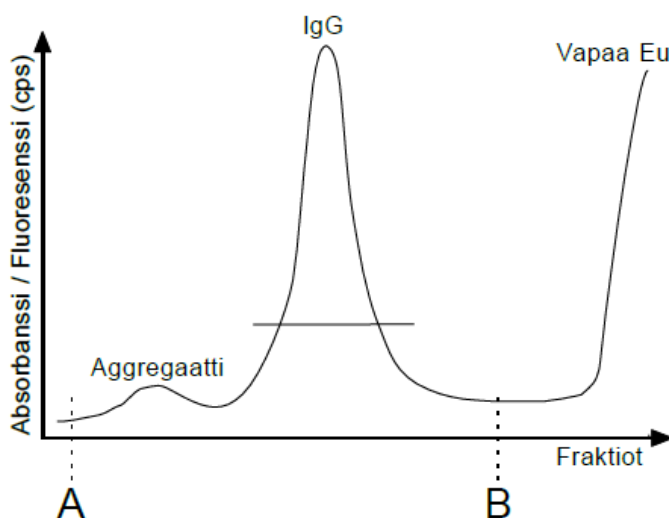
Kuva 9 Leimattujen vasta-aineiden puhdistuksen vaiheet

Inkuboinnin jälkeen leimattu vasta-aine puhdistetaan vapaasta kelaatista ja mahdollisista proteiiniaggregaateista. Puhdistamiseen käytetään kromatografialaitteistoa, joka on yhdistetty geelillä pakattuun kolonniin. Geelisuodatuskromatografia on erottelumenetelmä erikokoisten molekyylien erotteluun. Geeli koostuu pienistä polymeeripartikkeleista, joissa on erikokoisia huokosia. Kun liuos kulkee geelin läpi, pienimmät molekyylit mahtuvat kulkeutumaan geelin huokosiin ja kulkeutuvat tämän vuoksi hitaammin pylvään läpi. Isoimmat molekyylit eivät mahdu näihin huokosiin, ja tulevat tämän vuoksi

ensimmäisenä pylväästä ulos. Käytettävä geeli valitaan aina erotettavien molekyylien koon mukaan. Molekyylien eluutionopeus riippuu ainoastaan niiden koosta. (27)

N^1 -Eu, N^1 -Sm, N^3 -Eu, BITC ja biotiiniesteri -konjugoinneille käytetään jokaiselle omia kolonneja. Ennen puhdistusta kolonni tasapainotetaan 50 mM TSA-puskurilla (Tris-HCl, natriumkloridi ja natriumatsidi) kahdeksalla geelitulavuudella ja sen Eu- tai Sm- tausta mitataan. (28)

Ohjelma piirtää tulokset käyränä, jossa absorbanssi on ajan funktiona. Lisäksi x - akselilla näkyvät fraktioiden paikat, joiden avulla voidaan valita fraktionkerääjästä oikeat näyteputket. Mittaus tehdään 280 nm aallonpituudella. Kuten kuvan 10 kuvaajasta voidaan nähdä, puhdistusprosessissa pylväästä ensimmäisenä tulevat ulos mahdolliset aggregoituneet vasta-aineet, joita ei niiden rakenteen vuoksi pystytä hyödyntämään. Tämän jälkeen ulos tulee monomeeri-IgG, eli talteen otettava tuote ja viimeisenä vapaa leimausreagenssi. (28)



Kuva 10 Esimerkki absorbanssi-/fluoresenssikäyrästä (28)

Puhdistuksen jälkeen tuloksien perusteella valitaan fraktionkerääjästä fraktiot kuvan 10 mukaisesti kohdasta A kohtaan B. Fraktioiden fluoresenssi mitataan leiman pitoisuuden selvittämiseksi. Tuloksista saatua fluoresenssikäyrää verrataan absorbanssikäyrään ja sen mukaan valitaan kantaliuokseksi yhdistettävät fraktiot, jotka muodostavat IgG-käyrän neljä korkeinta kohtaa jaettaessa piikki viiteen osaan. Näiden fraktioiden pitoi-

suuksien katsotaan olevan tarpeeksi korkeat. Yhdistettävien fraktioiden yhteenlasketun fluoresenssin ja kaikkien fraktioiden yhteenlasketun fluoresenssin avulla saadaan selville IgG-saalis, joka kertoo kuinka iso osa vasta-aineesta on leimattu. (28)

Puhdistuksen aikana vaihdetaan myös vasta-aineen leimauksessa käytetty puskuri säilytyspuskurina toimivaan TSA-puskuriin. Leimattu vasta-aine kulkee kolonnin läpi nopeammin kuin leimauksessa käytetty puskuri, jolloin se vaihtuu kolonnin tasapainotuksessa ja puhdistuksessa eluentina käytettävään TSA-puskuriin. Leimauspuskuria ei siis jää lopulliseen tuotteeseen. (29) Lopuksi letkusto ja kolonni pestään esipesuliuksella, joka sisältää kaliumbiftalaattia ja DTPA:ta, sekä 0,5 M NaOH pesuliuksella ja TSA-puskurilla, jotta mahdolliset kolonniin jääneet molekyylit ja epäpuhtaudet saadaan poistettua (28).

3.2.3 Leimausasteen laskeminen ja laadunvalvonta

Kun fraktiot on yhdistetty, monomeeripoolin leimausaste määritetään. Ensin poolin Eu-pitoisuus määritetään tekemällä poolista ja Eu-standardista laimennokset, joiden fluoresenssit mitataan. Leimausaste saadaan laskettua vertaamalla poolin Eu-pitoisuutta sen IgG-pitoisuuteen. Lisäksi pooliin lisätään DTPA-puhdistettua BSA:ta ja lisäyksen jälkeen liuoksen lopullinen IgG-pitoisuus lasketaan. DTPA-puhdistettu BSA stabiloi leimatun vasta-aineen.

Leimakantojen laadunvalvonta suoritetaan yleisiä määrittämissä käytäntöjä ja tuotekohtaisia määritysohjeita noudattaen. Laadunvalvonta suoritetaan AutoDELFI-määrityksellä. Määrittämistä varten tehdään standardikuvaaja ja referenssikäyrä aiemmin hyväksytyllä leimalla ja kantaliuoksesta tehdään laimennos eräohjeen mukaan. Referenssin antamat tulokset kertovat testin toimivuudesta. Jos testattava kantaliuoksen pitoisuus täyttää vaatimukset, kantaliuos voidaan laimentaa kyseiseen pitoisuuteen myös pullotusta varten.

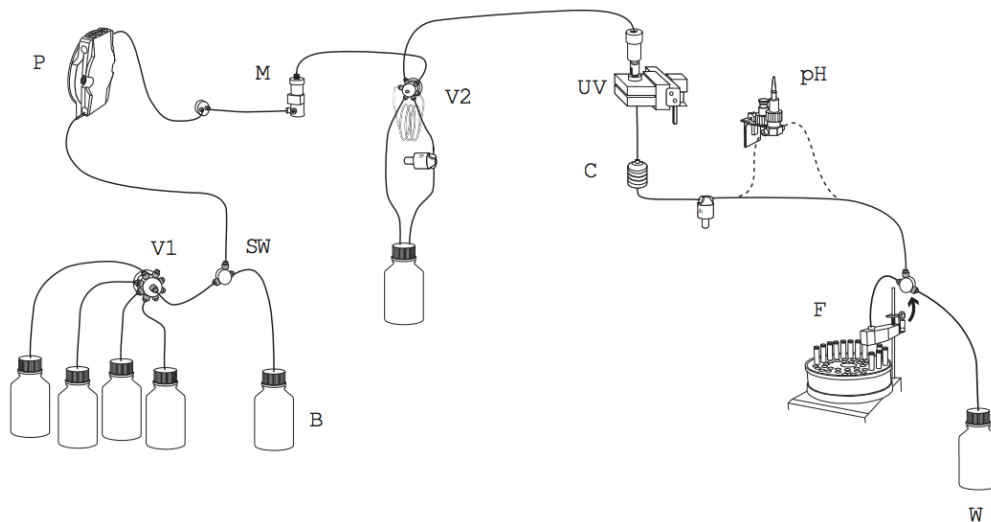
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 ÄKTA Prime Plus –laitteiston kvalifiointi

Kvalifioitava ÄKTA Prime Plus -laitteisto on tarkoitettu Eu -leimattujen vasta-aineiden puhdistukseen. Kvalifioinnin tarkoituksena on osoittaa, että laitteisto ja sen ohjelmisto on asennettu oikein ja toimivat niille asetettujen vaatimusten mukaisesti.

4.1.1 Laitteisto

ÄKTA Prime Plus on GE Healthcaren valmistama nestekromatografilaitteisto, joka on tarkoitettu proteiinien puhdistukseen. Laitteistoon kuuluu näyttö, ohjausjärjestelmä, pumppu, sekoitin, fraktionkerääjä, UV-detektori, injektioventtiili, puskuriventtiili, vaihtoventtiili, sekä virtauksen ohitusventtiili. Lisäksi laitteisto liitetään tietokoneeseen, näyttöön ja printteriin. (30) Laitteistoa ohjataan Unicorn -ohjelmistolla. Äkta Prime Plus laitteistoa voidaan käyttää esimerkiksi puskurinvaihtoon, geelisuodatuskromatografiaan, ioninvaihtoon, sekä affiniteettikromatografiaan. (30)



Kuva 11 ÄKTA Prime Plus -laitteiston virtausreitti (30)

Kuvassa 12 on esitetty laitteiston tyypillinen virtausreitti. Pumppu (P) pumppaa eluoin- tipuskuria (B) vaihtoventtiiliin (SW) kautta kolonniin. Laitteella voidaan käyttää myös muita puskureita, jotka kytketään puskuriventtiiliin (V1). Sekoitin (M) sekoittaa puskurit. Vasta-aineita puhdistettaessa käytetään myös erillistä peristalttista pumppua, joka pumppaa näytteen venttiilin läpi näytesilmukkaan (V2), joka applikoi näytteen kolonniin. Lisäksi käytetään erillistä venttiiliä, jonka avulla ohjataan liuokset kulkemaan tarkoituk- sen mukaisesti. Kolonnista näyte kulkeutuu UV-monitoriin (UV), jossa sen absorbanssi mitataan tietyllä aallonpituusalueella. UV-monitorin jälkeen näyte kulkeutuu vielä johta- vuusmonitoriin (C). Leimattujen vasta-aineiden puhdistusprosessissa käytetään vain UV-monitorista tulevaa signaalia. Tämän jälkeen näyte ohjataan fraktionkerääjään (F) näyteputkiin tai jätteeseen (W). (30) Tietokoneella oleva UNICORN –ohjelmisto käsitte- lee UV-monitorilta tulevan signaalin ja piirtää siitä kuvaajan.

Laitteiston osat ja ohjelmisto

Erillisellä venttiilillä on kolme asentoa, joilla voidaan ohjata liuokset kulkemaan halutulla tavalla. LOAD-asennossa silmukkaan voidaan imeä esimerkiksi näytettä, jolloin tarvi- taan myös erillistä peristalttista pumppua. Tällöin silmukassa oleva mäntä vetää näytet- tä alakautta sisään ja työntää samalla yläpuolella olevaa liuosta ulos silmukasta jäteas- tiaan tai viemäriin. Samalla liuos, esimerkiksi puskuri, joka kulkee laitteen oman pum- pun kautta, kulkee suoraan kolonniin. INJ-asennossa silmukkaan imetty näyte voidaan applikoida kolonniin. Tällöin puskuri ohjataan silmukan yläosaan, jolloin silmukan män- tä työntää alaosassa olevan näytteen kolonniin ja peristalttisesta pumpusta tuleva liuos kulkeutuu jäteastiaan tai viemäriin. WASH-asennossa voidaan pestä pumppuja ja vent- tiiliä, jolloin laitteiston läpi kulkeva liuos kulkeutuu suoraan jätteeseen. (28)

Laitteiston pumppu koostuu yksittäisestä sisääntuloyhteestä ja kahdesta ulostuloyh- teestä, joista käytetään vain yhtä. Pumpun sisällä on kolme pientä mäntäpumppua, jotka takaiskuventtiilien kanssa luovat tasaisen virtauksen. Mäntäpumppu pumppaa liuosta kammioiden läpi samalla kun takaiskuventtiilit estävät sen takaisinvirtaamisen. (30)

Sekoitin on dynaaminen ja yksikammioinen. Sekoitinmoottori systeemin sisällä pyörit- tää magneettia 600 rpm vauhdilla, mikä saa kammiossa olevan sekoittimen pyörimään.

Sekoitin on tarkoitettu eri puskurien sekoittamista varten, jos niitä on käytössä useampia. (30)

UV-monitori koostuu Hg -lampusta, aallonpituuden suodattimesta ja UV-virtauskennosta. Lampun valonsäde ohjataan suodattimen, linssin, säteenrikkojan ja näytteen läpi detektorille, josta tieto kulkeutuu mikroprosessorille ja siitä näytölle. Samasta lampun pisteestä lähtee sekä referenssisignaali, että näytettä mittaava signaali. Referenssisignaalin avulla poistetaan lampun intensiteetin vaihtelun vaikutus näytettä mittaavasta signaalista. (30)

Fraktionkerääjässä on paikka 95 näyteputkelle. Kerättävä näytemäärä voidaan säätää halutuksi ohjelmiston avulla. Lisäksi fraktionkerääjälle voidaan säätää odotusaika, jonka ajan liuos ohjautuu jätteeseen ja ajan päätyttyä fraktioita aletaan kerätä näyteputkiin. (30)

Laitteiston UNICORN -ohjelmistossa on PrimeView 5.31 softaversio, joka koostuu kahdesta moduulista. System Control -moduulin avulla valvotaan puhdistusprosessia ja Evaluation -moduulin avulla voidaan tarkastella tuloksia. Tulosten tarkastelu ja käsittely, sekä menetelmien luonti ja muokkaus tapahtuu tietokoneella. Lisäksi ohjelmia voi myös luoda ja muokata laitteiston oman monitorin ja näppäinten avulla. (30)

Kolonne

Leimattujen vasta-aineiden puhdistukseen käytetään geelisuodatuskromatografiaa, jolloin laitekokonaisuuteen tarvitaan myös geelillä pakattu kolonne. Kolonnissa molekyylit erotellaan toisistaan niiden koon perusteella. Puhdistusprosessissa stationäärifaasina käytetään GE Healthcaren valmistamaa Superdex 200 -geeliä, joka pystyy erottelamaan molekyylejä, joiden molekyylipaino on välillä 10 000 ja 600 000 (31). Geeli koostuu ristosilloitetuista huokoisista agarosipalloista, johon on kovalenttisesti sidottu dekstraania. Geelin agarosimatriisi tekee siitä kemiallisesti ja fysikaalisesti stabiilin ja inertin, joten se ei reagoi näytteiden tai puskurin kanssa. (32)

Kolonnin geelipeti tasapainotetaan aina puskurilla, joka täyttää partikkelien huokokset ja tilan niiden välillä. Tällöin neste geelin huokosissa on tasapainossa partikkelien ulkopuolella olevan nesteen kanssa. (33) Kolonnin ja koko laitteiston toimivuutta seurataan mittaamalla Plates/meter- ja Asymmetria-arvoja, sekä virtausnopeutta 10 ajokerran välein. Näillä mittauksilla saadaan selville, kuinka hyvin kolonne erottelee eroteltavat

molekyylit. Kolonni ei sisälly tässä työssä tehtävään kvalifointiin, mutta on välttämätön ja tärkeä osa puhdistusprosessissa.

4.1.2 Kvalifioinnin vaiheet

Kvalifointiin kuuluu asennuksen kvalifointi (IQ), toiminnan kvalifointi (OQ), sekä suorituskyvyn kvalifointi (PQ). Ennen kvalifioinnin aloittamista suunnitelma tarkastetaan validointiohjausryhmän kanssa. Asennus, sekä osa OQ –toimenpiteistä suoritetaan yhteistyössä laitevalmistajan valtuuttaman asiantuntijan, sekä Wallac Oy:n IT -tuen kanssa. Kvalifointi tehdään laitevastaavan ennalta laatiman suunnitelman mukaan, jossa on kuvattuna laitteisto, riskianalyysi, sekä kvalifioinnin hyväksymiskriteerit.

Asennuksen kvalifointi (IQ)

Asennuksen kvalifioinnilla varmennetaan ÄKTA Prime Plus –laitteiston ja sen osien, tietokoneen ja sen lisäosien, sekä UNICORN –ohjelmiston oikea asennus. Asennuksen kvalifointi aloitetaan laitteen tunnistetietojen ja dokumentaation tarkastuksella. Tämän jälkeen suoritetaan laitteiston asennus, jolloin tarvittavat letkut ja liitännät asennetaan. Laitteiston sertifiointi suoritetaan laitevalmistajan valtuuttaman huoltohenkilön toimesta ja ohjelmiston, sekä liitännöiden asennus Wallac Oy:n oman IT-tuen toimesta. Myös laitteiston toimintaympäristö tarkastetaan vaadittujen olosuhteiden varmistamiseksi. Tila on oltava kvalifioitu tai kiinteistövalvonnan monitoroinnin piirissä ja sen lämpötilan ja ilmankosteuden on oltava laitteistolle sopivissa rajoissa.

Laitteiston pääkomponentit tarkastetaan ja varmistetaan että laitekokonaisuus vastaa toimitusta. Laitteiston valmistusmateriaalien soveltuvuus käyttötarkoitukseen, sekä varaosien saatavuus selvitetään. Laitteiston on oltava myös turvallisuustarkastettu ja CE-hyväksytty.

Laitteisto lisätään myös SAP-järjestelmään ja selvitetään kuka suorittaa laitteiston huollon. Laitteistolle ei ole varsinaista huolto-ohjetta, vaan koko laitteiston toimivuus tarkistetaan joka kymmenennen puhdistuskerran jälkeen asetonitestillä menettelyohjeen mukaisesti. Lopuksi tehdään yleinen järjestelmän tarkastus, jonka avulla todetaan onko laitteisto valmis toiminnan testaukseen.

Toiminnan kvalifiointi (OQ)

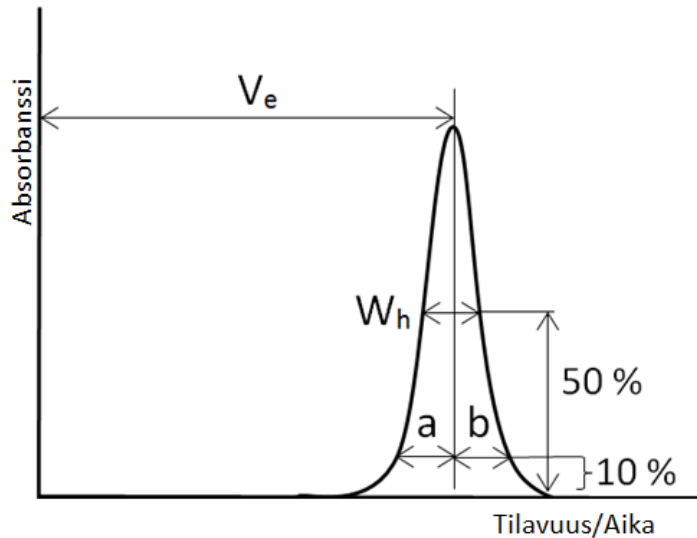
Toiminnan kvalifioinnilla varmistetaan kromatografialaitteiston ja sen komponenttien oikea toiminta, sekä laitteiston oikea toiminta sen ohjelmiston kanssa. Toiminnan kvalifiointi alkaa laitteen käynnistämällä ja toimintasekvenssin testaamisella. Laitteen osien toimivuustestit on tehty sertifioidussa laitevalmistajan toimesta ja raportti testauksista hyväksytty.

Laitteen käyttöliittymä ja ohjelmisto testataan ja samalla määritellään käyttäjäoikeustasot. Toiminnan kvalifioinnissa selvitetään myös laitteen liittäminen kalibroinnin piiriin, laitteeseen lisätään kvalifiointitarra ja huoltotarra ja se lisätään leimavalmistuksen laitelistaan.

Suorituskyvyn kvalifiointi (PQ)

Suorituskyvyn kvalifiointiin kuuluu tuotannossa tarvittavien ohjelmien luonti ja testaus, asetonitesti, vasta-aineleimaus ja puhdistus, sekä kolonnin taustan mittaus. Asetonitesti kertoo sekä laitteiston, että kolonnin kunnon. Asetonitestillä mitataan plates/meter-arvo, as-arvo ja virtausnopeus. Vertailuna vastaava testi tehdään toisella vastaavalla laitteistolla käyttäen samaa kolonnia, jolloin saadaan tarkemmin käsitys itse laitteiston toiminnasta. Hyväksymisrajoina toimivat samat rajat kuin normaalisti kolonnin toiminnan testauksessa.

Teoreettisten pohjien määrä (plates/meter), kertoo kolonnin erottelukyvystä. Arvoa laskeissa ajatellaan kolonnin jakautuvan teoreettisiin pohjiin. Mitä enemmän teoreettisia pohjia on, eli mitä suurempi laskettu arvo on, sitä parempi kolonnin erottelukyky. Teoreettisten pohjien määrä voidaan laskea kaavalla 1. Leimattujen vasta-aineiden puhdistukseen tarkoitetuille kolonneille tälle arvolle on annettu alarajaksi 10000 N/m. Plates/meter-arvo voidaan laskea kuvan 12 ja kaavan 1 mukaan.



Kuva 12 Esimerkki asetonitestin kromatogrammista

Kaava 1 Plates/meter

$$\text{Plates/meter} = \frac{N}{L}$$

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{V_e}{W_h} \right)^2$$

N = teoreettisten pohjien lukumäärä

L = kolonnin pituus (cm)

V_e = piikin retentiotilavuus tai - aika

w_h = piikin leveys piikin puolella välissä, samassa yksikössä kuin V_R

Kaava 2 Asymmetria-arvo

$$\text{Asymmetry} = \frac{b}{a}$$

As-arvo kertoo kromatogrammien symmetrisyydestä ja toimii indikaattorina kolonnin tiiveydelle (30). Kolonnin geelin tiiveys vaikuttaa siihen, miten nopeasti ja tehokkaasti molekyylit erottuvat (32). Jos geeli ei ole tarpeeksi tiiviisti pakattu ja geelipartikkelien välillä on liikaa tilaa, molekyylit kulkevat liian nopeasti kolonnin läpi, eikä molekyyliden

erottuminen ole tällöin yhtä tehokasta. Tämä näkyy tuloksissa piikin häntimisenä. As-arvo lasketaan kaavan 2 mukaan, jossa a on piikin edeltävän puolikkaan leveys, ja b piikin häntivän puolikkaan leveys 10 % korkeudessa piikin korkeudesta (kuva 12). Leimattujen vasta-aineiden puhdistukseen tarkoitettujen kolonnien As-arvon rajaksi on asetettu normaalikäytössä 0,6 – 1,8 ja käyttöön otettaessa 0,7 – 1,3. Kvalifioinnissa käytettävä kolonni on ollut aiemmin käytössä muilla laitteistoilla.

Koska molekyylien erotteluun vaikuttaa geelin tiiveys ja tästä johtuen myös se, kuinka nopeasti liuos kulkee kolonnin läpi, mitataan myös virtausnopeus. Virtausnopeuden tulee pysyä muuttumattomana ajosta toiseen. Virtausnopeus määritetään mittaamalla kolonnin läpi 60 minuutissa virrannut nestemäärä. Hyväksymisrajana on 1080 ± 80 ml/h.

Suorituskyvyn kvalifioinnilla on tarkoitus varmistaa laitteen toimivan prosessin vaatimassa käyttötarkoituksessa, joten myös vasta-aineleimaus ja puhdistus tehdään käyttäen kvalifioitavaa laitteistoa. Käytettävä analytti edustaa kaikkia leimavalmistuksessa puhdistettavia leimattuja vasta-aineita arvioitaessa laitteen toimintaa. Leimaus ja puhdistus tehdään noudattaen PerkinElmer Wallac Oy:n menettelyohjeita ja tuotteen eräohjetta. Leimakannalle tehdään myös normaali prosessinaikainen laadunvalvonta AutoDELFIA:lla. Testissä kantaliuoksesta tehdään standardikuvaaja (standardit A - F) ja aiemmin hyväksytystä leimakannasta tehdään referenssikäyrä. Referenssikäyrän antamat tulokset kertovat testimenetelmän toimivuudesta ja tulosten luotettavuudesta. Tuloksia verrataan eräohjeen hyväksymiskriteereihin. Kantaliuoksen täyttäessä hyväksymiskriteerit erä voidaan vapauttaa tuotannolliseen käyttöön kun kvalifiointi on hyväksytty.

Kolonnin tasapainotuksen jälkeen ennen leimakannan puhdistusta mitataan myös kolonnin Eu-tausta, jonka on oltava alle 10000 counts. Tausta mitataan kolonnin tasapainotuksen jälkeen kolonnista ulos tulevasta liuoksesta. Liuosta mitataan kahteen kuoppalevyn kuoppaan 10 μ l ja lisätään 2 μ l mittaliuosta. Myös pelkkää mittaliuosta mitataan kahteen kuoppalevyn kuoppaan. Näytteiden fluoresenssit mitataan.

Näillä toimenpiteillä varmistetaan, että pumppu on toiminut vaaditulla tavalla, ja analytti on saatu kerättyä kolonnista fraktionkerääjällä. Jos laitteiston pumppu ei toimi kunnolla, kolonniin voi jäädä epäpuhtauksia, se ei tasapainotu kunnolla, tai näyte ei kulkeudu kolonniin.

4.2 Boraattipuskurin korvaaminen

Vasta-aineiden leimauksessa pH:n säätöön käytettävä boraattipuskuri haluttiin korvata sen mahdollisten hedelmällisyyttä heikentävien ja sikiötä vaurioittavien vaikutusten takia. Sopivan leimauspuskurin löytämiseksi ja sen toiminnan osoittamiseksi on jo aiemmin suoritettu karakterisointi. Karakterisoinnissa korvaavat vaihtoehdot kartoitettiin riskiarvioinnin perusteella ja boraattipuskurin tilalle valittiin puskuri, jonka puskurointi-alue on lähellä boraattipuskurin pH-aluetta. Karakterisoinnissa kaikille testierille tehtiin normaali prosessinaikainen laadunvalvonta ja kombinaatiotestit. Valitulle puskurille on tehty myös säilyvyystestaus. Karakterisoinnin tulosten mukaan valittu puskuri toimii vasta-aineiden leimauksessa muuttamatta valmistettavaa tuotetta. Tulosten mukaan uusi puskuri ei myöskään vaikuta vasta-aineiden leimausasteisiin, eikä niiden toimivuuteen tai säilyvyyteen normaaleissa säilytysolosuhteissa.

Projektin on tarkoitus jatkaa verifiointisuunnitelman kirjoittamisella ja normaalikokoisten verifiointierien valmistamisella jokaisesta kantaliuoksesta, joiden valmistuksessa käytetään boraattipuskuria. Erille tehdään normaalin prosessinaikaisen laadunvalvontatestin lisäksi kiihdytetty säilyvyystestaus ja kombinaatiotestit. Prosessinaikaiselle laadunvalvontatestille hyväksymisrajat ovat annettu tuotteen eräohjeessa. Erille aloitetaan myös reaaliaikainen säilyvyysseuranta. Jokaisesta erästä kirjoitetaan erillinen raportti, joka sisältää kiihdytettyjen säilyvyystestien tulokset. Kun eräkohtaiset raportit on hyväksytty, verifiointista kirjoitetaan myös loppuraportti. Tässä opinnäytetyössä kirjoitettiin suunnitelma verifiointille ja tehtiin verifiointierä yhdestä kantaliuoksista. Uuden puskurin nimeä tai sen tarkempia tietoja ei opinnäytetyössä kerrota salassapitovelvollisuuden vuoksi.

4.2.1 Kiihdytetty säilyvyysseuranta

Kiihdytetyllä säilyvyysseurannalla testataan tuotteen säilyvyyttä kiihdytetyissä olosuhteissa normaaleihin säilytysolosuhteisiin verrattuna. Normaaleilla säilytysolosuhteilla tarkoitetaan olosuhteita, joissa tuotteen valmistaja takaa tuotteen laadun täyttävän sille asetetut hyväksymiskriteerit asetetun säilyvyysajan. Normaali säilytyslämpötila on usein +4 °C (+2 - +8 °C). Tällöin kiihdytetty lämpötila on +35 °C. (34)

Kiihdytetyissä säilyvyysseurannoissa oletetaan, että korkeassa lämpötilassa hajoaminen tapahtuu nopeammin ja että biomolekyylien hajoamisnopeus noudattaa Arrheniuksen yhtälöä, edellyttäen hajoamisreaktion noudattavan ensimmäisen kertaluvun reaktiokinetiikkaa. (34)

Kaava 3 Arrheniuksen yhtälö

$$k = se^{\frac{-E_a}{RT}}$$

k = nopeusvakio

s = frekvenssitekijä

E_a = aktivaatioenergia

R = kaasuvakio ($8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = absoluuttinen lämpötila K ($273,15 \text{ K} + \text{lämpötila } ^\circ\text{C}$)

Biomolekyylien hajoamisnopeutta laskiessa käytetään aktivaatioenergian approksimaatiota 83736 J/mol tai 50242 J/mol , jos molekyylin stabiilisuudesta ei ole tietoa. (34)

Arrheniuksen yhtälöä soveltamalla voidaan laskea ns. hajoamissuhde, jolla voidaan esimerkiksi arvioida mikä on vastaava aika normaalissa lämpötilassa, kun yhdistettä säilytetään tietty aika tietyssä kiihdytetyssä lämpötilassa. Vastaavuusaika lasketaan kaavan 4 mukaan. (34)

Kaava 4 Hajoamissuhteen laskeminen

$$\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) = \frac{E_a(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}$$

Vastaavuusaikaa voidaan käyttää arvioimaan tarvittava säilytysaika kiihdytetyssä lämpötilassa verrattuna normaaliin säilyvyyslämpötilaan. (34) Työssä valmistettavalle erälle normaali säilyvyysaika on 690 päivää ja kiihdytettynä säilytyslämpötilana on $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Aktivaatioenergia verifiointierän säilyvyystestissä on 83736 J/mol ja tällöin päivien vastaavuuslukumäärä normaalissa säilytyslämpötilassa on

$$\frac{83736 \text{ Jmol}^{-1}(308 - 277)\text{K}}{8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1} \cdot 277 \cdot 308 \text{ K}} \approx 3,66$$

$$e^{3,66} \approx 39$$

Tällöin verifiointierän säilyvyysseurannan pituudeksi saadaan

$$\frac{690 d}{39} \approx 18 d.$$

Toiseksi pisteeksi kiihdytetyille säilyvyystesteille valitaan säilytysajan puoliväli, eli 9 päivää.

Hyväksymisrajoina kiihdytetyille säilyvyysseurannalle käytetään tuotteen loppulaadunvalvontarajoja. Kiihdytetyt säilyvyystestit tehdään AutoDELFIA:lla käyttäen neljää levyä.

(34)

4.2.2 Kombinaatiotestit

Kittierät muodostetaan yhdistämällä hyväksytyt kittikomponentit kombinaatiksi. Kombinaattien komponenttien kemiallinen yhteensopivuus varmistetaan loppulaadunvalvontatestillä. Testit tehdään analyttikohtaisten ohjeiden mukaan, joissa on myös kerrottu hyväksymisrajat. Hyväksymisrajoissa on otettu huomioon sisäinen variaatio ja erien välinen variaatio. Erän sisäinen variaatio jaetaan levyn sisäiseen, peräkkäisten levyjen väliseen ja yhdistettyyn eri operaattoreiden, laitteistojen ja päivien väliseen hajontaan.

(35) Testit tehdään AutoDELFIA:lla käyttäen kahdeksaa levyä. Kombinaatiotestin tulokset toimivat myös 0-pisteenä kiihdytetyille ja reaaliaikaisille säilyvyystesteille. (35)

4.2.3 Reaaliaikainen säilyvyysseuranta

Reaaliaikainen säilyvyysseuranta tehdään normaaleissa säilytysolosuhteissa ja sen tarkoitus on varmistaa, että tuote täyttää laatuvaatimuksensa koko elinikänsä ajan. Reaaliaikainen säilyvyysseuranta tehdään joka vuosi yhdelle erälle jokaiselle myynnissä olevalle tuotteelle. Työssä valmistettava erä testataan 11 ja 24 kuukauden säilytyksen jälkeen. Säilytyslämpötilana on 4 °C (+2 - +8 °C), joka on tuotteelle määritelty säilytyslämpötila. Testit tehdään AutoDELFIA:lla. (36)

5 TULOKSET

5.1 ÄKTA Prime Plus –laitteiston kvalifiointi

Kvalifiointi suoritettiin alussa laadittua suunnitelmaa noudattaen. Osa kvalifioinnista suoritettiin yhteistyössä PerkinElmer Wallac Oy:n oman IT-tuen kanssa ja osa laitevalmistajan asiantuntijoiden kanssa. IQ- ja OQ-osiot hyväksyttiin ennen PQ-osion aloittamista.

5.1.1 Asennuksen kvalifiointi

Laitteiston johtojen, letkujen ja eri osien oikea asennus tarkistettiin. Kaikki tarvittavat komponentit olivat mukana ja varaosat tilattavissa laitevalmistajalta. Laitteiston toimintaympäristö voitiin todeta sopivaksi huoneen lämpötilatrendin mukaan, josta nähtiin, että olosuhteet pysyvät sopivina. Lisäksi laitteisto soveltui käyttötarkoitukseensa käyttöohjeiden mukaan. Laitteistolle oli todistus turvallisuustarkastuksesta, joka todisti sen olevan myös CE-hyväksytty. Laitteistolle luotiin myös laitevalmistajan toimesta tehtäviä vuosihuoltoja varten huolto-ohjelma SAP-järjestelmään. Tulosten perusteella laitteisto oli valmis toiminnan testaukseen.

5.1.2 Toiminnan kvalifiointi

OQ-osion toimivuustestaukset kuuluivat laitevalmistajan toimesta tekemään sertifiointiin. Sertifiointissa testattiin laitteiston osien toimivuuksia ja verrattiin tuloksia laitevalmistajan asettamiin hyväksymisrajoihin. Tehtyjen testien tulokset olivat hyväksymisrajoissa ja sertifiointi hyväksytty laitevalmistajan, sekä Wallac Oy:n toimesta. Laitteisto ja sen ohjelmisto myös käynnistettiin ja todettiin toimiviksi. Laitteistoa ei ollut tarve liittää kalibroinnin piiriin, sillä tarvittavat kalibrointia vastaavat testit tehdään aina huollon yhteydessä. OQ-osio hyväksyttiin ja kvalifioinnin PQ-osuus voitiin aloittaa.

5.1.3 Suorituskyvyn kvalifointi

Laitteiston PQ-osuus aloitettiin tarvittavien ohjelmien luonnilla. Laitteistolle luotiin omat ohjelmat kolonnin tasapainotukselle, puhdistusajolle ja asetonitestille kolmelle erikokoiselle kolonnille. Ohjelmien luonnin jälkeen tehtiin asetonitesti, jonka tuloksia verrattiin kolonnin aiempaan eri laitteistolla tehtyyn asetonitestiin. Taulukossa 1 on esitetty kvalifointiin kuuluvan asetonitestin tulokset ja taulukossa 2 aiemmin samalle kolonnille tehdyn asetonitestin tulokset. Asetonitestistä nähdään että tulokset ovat hyväksymisrajoissa ja lähellä kolonnille aiemmin, 14.12.2016 toisella laitteella tehdyn asetonitestin tuloksia. Asetonitestin kromatogrammi on liitteenä 1 ja kolonnin aiemman asetonitestin kromatogrammi liitteenä 2.

Taulukko 1 Asetonitestin tulokset

Mitattava arvo	Tulos	Hyväksymisrajat
Virtausnopeus	1071 ml/h	1080 ± 80 ml/h
Plates/meter-arvo	10866 N/m	> 10000
As-arvo	0,96	0,6 - 1,8

Taulukko 2 14.12.2016 tehdyn asetonitestin tulokset

Mitattava arvo	Tulos	Hyväksymisrajat
Virtausnopeus	1120 ml/h	1080 ± 80 ml/h
Plates/meter-arvo	10088 N/m	> 10000
As-arvo	1,0	0,6 - 1,8

Kvalifointiin kuului myös vasta-aineleimaus ja kantaliuoksen puhdistus kvalifioitavalla laitteistolla. Kantaliuos valmistettiin menettelyohjeiden ja eräohjeen mukaan ja sille suoritettiin normaalit prosessin aikaiset laadunvalvontatestit, joiden tuloksien mukaan leimakanta täyttää hyväksymiskriteerit (Taulukko 3). Puhdistuksesta tuloksena tulleesta kromatogrammista myös nähdään, että puhdistus on onnistunut hyvin ja kromatogrammi näyttää normaalilta. Liitteenä 3 on kromatogrammi puhdistuksesta. Kolonnin

tasapainotuksen jälkeen, ennen leimakannan puhdistusta tehtiin myös Eu-taustan mittaust, jonka tuloksien mukaan kolonnin Eu-tausta oli riittävän pieni (Taulukko 4).

Taulukko 3 Prosessinaikaisen laadunvalvonnan tulokset

	Std A signaali (cps)	Std F signaali (cps)	Herkkyys (U/ml)
Referenssi	307	3274116	0,005
Näyte	286	2640720	0,004
Hyväksymisrajat	< 700	2200000-4000000	< 0,09

Taulukko 4 Kolonnin Eu-taustan mittauksen tulokset

Mittaus	Signaali (cps)	Keskiarvo (cps)
Näyte	1526	1463
	1400	
Mittaliuos	230	222
	215	

5.2 Boraattipuskurin korvaaminen

Verifointierää varten tehtiin alustava versio eräohjeesta, jonka mukaan erä valmistettiin. Kantaliuoksen valmistus on liitteessä 4 ja kannan puhdistuksen kromatogrammi liitteessä 5. Kantaliuokselle tehtiin normaali prosessin aikainen laadunvalvonta, jonka tulokset menivät rajoihin. Kombinaatiotestien ja säilyvyytestien tulokset eivät ehtineet oppinäytetyöhön ajan puutteen vuoksi ja tulokset niistä tulevat vasta myöhemmin. Leimakannan puhdistus tehtiin käyttäen kvalifioitua ÄKTA Prime Plus -laitteistoa.

Taulukko 5 Verifointierän prosessin aikaisen laadunvalvontatestin mittaustulokset

	Mittaustulos (cps)					
Referenssi	1480	25603	49298	97869	286142	603129
Näyte	728	22688	43092	86212	247074	525231
Pitoisuudet (ng/ml)	A = 0	B = 25,4	C = 47,7	D = 91,5	E = 246	F = 473

Taulukko 6 Verifointierän prosessin aikaisen laadunvalvontatestin tulokset ja hyväksymisrajat

	Std A signaali (cps)	Std F signaali (cps)	$\frac{STD B (cps)}{STD A (cps)}$	$\frac{STD F (cps)}{STD E (cps)}$
Referenssi	1480	603129	17,30	2,11
Näyte	728	525231	31,19	2,13
Hyväksymisrajat	Referenssi: < 3500 cps Testattava: < 2700 cps	460000 – 1040000 cps	Referenssi: > 15 Testattava: > 6,5	1,7 – 2,4

Laadunvalvontatestien mukaan leimakanta on vaatimusten mukainen ja voidaan laimentaa pullotusta varten samalla tavalla kuin testiä varten.

6 LOPPUPÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli kvalifioida ÄKTA Prime Plus -kromatografilaitteisto ja tehdä boraattipuskurin korvaamiseksi verifiointierä yhdestä leimakannasta uutta puskuria käyttäen. Opinnäytetyö toteutettiin Wallac Oy:n laatu- ja validointipolitiikkaa noudattaen.

ÄKTA Prime Plus –laitteiston kvalifiointi suoritettiin ennalta laaditun suunnitelman mukaan. IQ-, OQ- ja PQ-osioiden tulokset olivat kunnossa ja hyväksymisrajoissa. PQ-osion testit tehtiin Wallac Oy:n menettelyohjeita ja eräohjeita noudattaen ja niiden tulokset olivat luotettavia. Kvalifiointiraportti käytiin lopuksi läpi validoinnin ohjausryhmän kanssa ja oli tämän jälkeen valmis hyväksyttäväksi. Raportti todistaa laitteiston toimivan toistettavasti sille asetettujen vaatimusten mukaisesti.

Raportin hyväksymisen jälkeen laitteisto oli valmis käytettäväksi ja työn PQ-osiossa valmistettu leimakanta voitiin vapauttaa tuotannolliseen käyttöön ja laimentaa pullotusta varten laadunvalvontatestissä käytettyyn pitoisuuteen. Jatkossa laitteiston oikea toiminta ja pysyminen kvalifioidussa tilassa varmennetaan mittaamalla Plates/meter-arvoa, As-arvoa ja virtausnopeutta 10 ajokerran välein, sekä laitevalmistajan tekemillä vuosihuolloilla.

Uutta puskuria käyttäen tehty leimakanta meni laadunvalvontatesteissä hyväksymisrajoihin ja oli vaatimusten mukainen. Kombinaatiotestin ja säilyvyytestausten tulokset saadaan myöhemmin eivätkä ehtineet tähän opinnäytetyöhön ajan puutteen vuoksi. Koska leimauksessa käytettävä puskuri vaihdetaan geelisuodatuskromatografialla tehtävän puhdistuksen aikana TSA-puskuriin, ei sitä ole lopullisessa tuotteessa. Prosessin aikaisten laadunvalvontatestien tulosten perusteella voidaan todeta, että leimaus uutta puskuria käyttäen on onnistunut, joten lopullinen tuote on siis samaa kuin boraattipuskuria käyttäessä. Sekä puskuria korvattaessa, että kvalifioinnissa valmistettujen erien laadunvalvontatestien toimivuus varmistettiin mittaamalla myös referenssinäyte, joka oli aiemmin laadunvalvonnassa hyväksytty leimakanta.

Verifiointia on tarkoitus jatkaa tekemällä valmistetusta erästä pullotus, sekä kombinaatiotesti ja aloittaa erälle kiihdytetty ja reaaliaikainen säilyvyysseuranta. Vastaavat verifiointierät tehdään kaikille leimakannoille, joiden valmistuksessa käytetään boraattipuskuria. Jokaiselle verifiointierälle kirjoitetaan erillinen raportti, johon tulee kombinaatio-

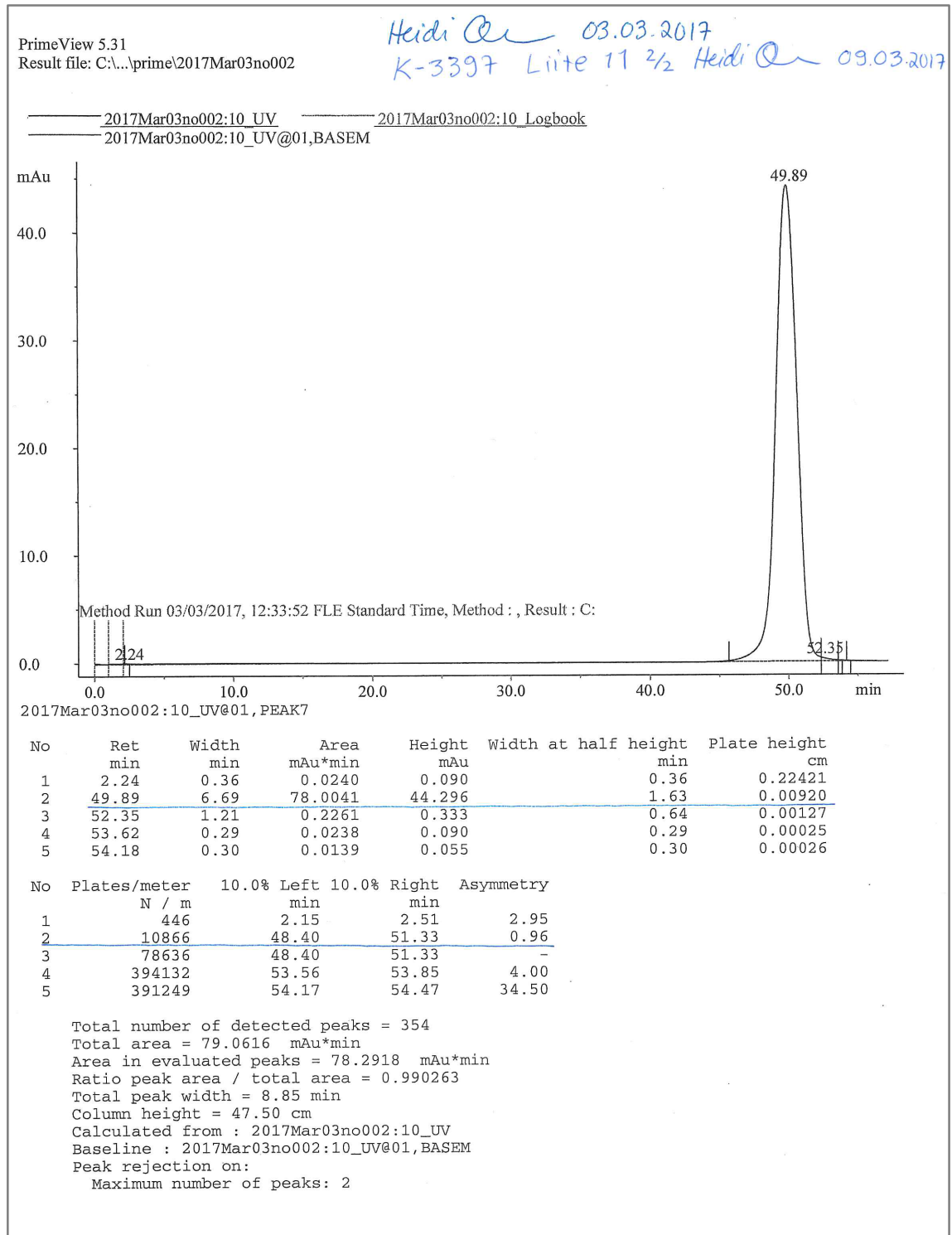
testien, sekä kiihdytettyjen säilyvyydestien tulokset ja muutosehdotus työohjetta varten. Kun verifiointierän raportti on hyväksytty, voidaan erä vapauttaa tuotannolliseen käyttöön. Verifiointin jälkeen uuden leimauspuskurin toiminta prosessissa muuttamatta valmistettavaa tuotetta on osoitettu ja Wallac Oy saa käyttöönsä turvallisemman vaihtoehdon boraattipuskurin tilalle huolimatta siitä, päätyykö se luvanvaraisten aineiden listalle.

LÄHTEET

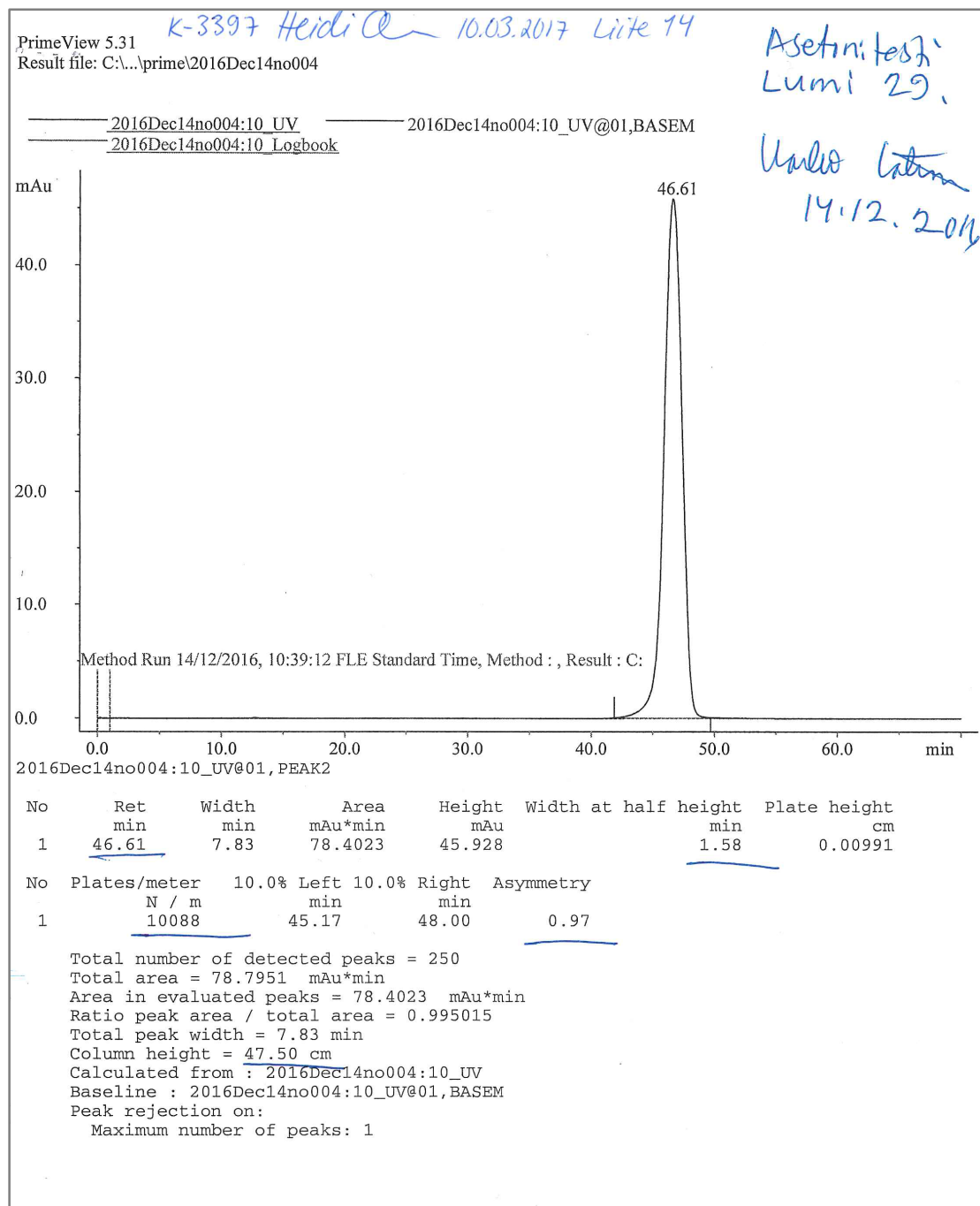
1. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13905076/18: Laatukäsikirja.
2. PerkinElmer. About us. Viitattu: 15.02.2017
<http://www.perkinelmer.com/fi/corporate/company/index.html>.
3. Tulla E. 2016. Vasta-aineiden leimausprosessin karakterisointi boraattipuskurin korvaamiseksi. Opinnäytetyö, AMK. Turun ammattikorkeakoulu, bio- ja elintarviketekniikan ko.
4. Standardi ISO 9000:2005
5. Pitko, M. Suomen Standardisoimisliitto SFS ry. 2011. Johdanto laadunhallintaan ja ISO 9000 -standardeihin. Luentomateriaali.
6. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13903492/06: Validointipolitiikka ja -menettelyt.
7. Hovinen, T. 2014. Validointi ja kvalifointi. Turun ammattikorkeakoulu. Luentomateriaali.
8. FDA Food and Drug Administration. 2011. Process Validation: General Principles and Practices.
9. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13905773/04: Kvalifointimenettely.
10. European commission. 2015 Annex 15: Qualification and Validation. Brussels.
11. Turvallisuus- ja kemikaalivirasto (Tukes). Kemikaalineuvonta. 2013. REACH. Viitattu: 05.03.2017 <http://www.kemikaalineuvonta.fi/fi/Saadosalue/REACH/>.
12. ECHA, European Chemicals Agency. 2016. Substance information, Disodium tetraborate, anhydrous. Viitattu: 13.03.2017 <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.014.129>.
13. Euroopan unionin virasto. European Chemicals Agency. REACH-asetus tutuksi. Viitattu: 05.03.2017 <https://echa.europa.eu/regulations/reach/understanding-reach>.
14. ECHA, European Chemicals Agency. Vaarallisten kemikaalien korvaaminen > Miten se tehdään? Viitattu: 05.03.2017 <https://echa.europa.eu/fi/regulations/substituting-hazardous-chemicals/how-do-i-do-it/know-your-substances-and-needs>.
15. Turvallisuus- ja kemikaalivirasto (Tukes). Kemikaalineuvonta. 2014. CLP. Viitattu: 05.03.2017 <http://www.kemikaalineuvonta.fi/fi/Saadosalue/CLP/>.
16. European Union. 2008. Regulation No 1272/2008 of the European Parliament and the Council.
17. ECHA, European Chemicals Agency. 2016. Boric acid. Viitattu: 14.03.2017 <https://echa.europa.eu/fi/substance-information/-/substanceinfo/100.030.114>.
18. ECHA, European Chemicals Agency. 2010. SVHC Support Document, Disodium Tetraborate, Anhydrous.
19. Kalsi, L. 2015. Puskuriliuokset ja puskuriliuoksen pH. Otavan Opisto. Viitattu 13.04.2017 http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/ke/ke5/4_happo-emastasapaino/4.6_puskuriliuokset_ja_puskuriliuoksen_ph?C:D=hNlm.hCX7.

20. Haajanen, K.; Pärssinen R.; Suominen I. 2013. Opetushallitus. Vasta-ainemääritys. Sivusto täydentää Biogeeni-oppikirjaa. Viitattu: 13.02.2017
http://www.edu.fi/download/143332_Vasta_ainemaaritys.pdf.
21. PerkinElmer. DELFIA Time-resolved Fluorescence Assays. Viitattu: 15.03.2017
<http://www.perkinelmer.com/fi/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/delfia/delfia-trf-assays.html>.
22. PerkinElmer. DELFIA Immunoassays. Viitattu: 15.03.2017
<http://www.perkinelmer.com/fi/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/delfia/delfia-immunoassays.html#DELFIImmunoassays-Overview>.
23. PerkinElmer Wallac Oy. hAFP diagnostiikkakitin insertti.
24. PerkinElmer Wallac Oy. Neonatal 17 α -OHprogesterone diagnostiikkakitin insertti.
25. PerkinElmer. 2002. Applications of time-resolved fluorometry with the DELFIA method.
26. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13901122/06: Leimavalmistuksen yleiset menettelyt.
27. GE HealthCare Life Sciences. 2014. Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods.
28. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13901616/03: Kromatografilaitteistojen käyttöohje.
29. PerSeptive Biosystems. 1996. The Busy Researcher's Guide to Biomolecule Chromatography.
30. GE Healthcare Bio-Sciences AB. Äkta Prime Plus User Manual.
31. GE Healthcare Life Sciences. Superdex 200 10/300 GL. Viitattu: 01.02.2017
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELifeSciences-fi/17517501>.
32. Pharmacia LKB Biotechnology. 1991. Gel Filtration, Principles and Methods, 5 th edition. Uppsala. Sweden.
33. GE Healthcare Life Sciences. 2014. Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods.
34. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13905993/02: IVD-reagenssien säilyvyytestaustäytäntö kiihdytetyissä tutkimuksissa.
35. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13904252/02: Loppulaadunvalvonta.
36. PerkinElmer Wallac Oy. Menettelyohje 13905784/06: Stability testing related to launched products.

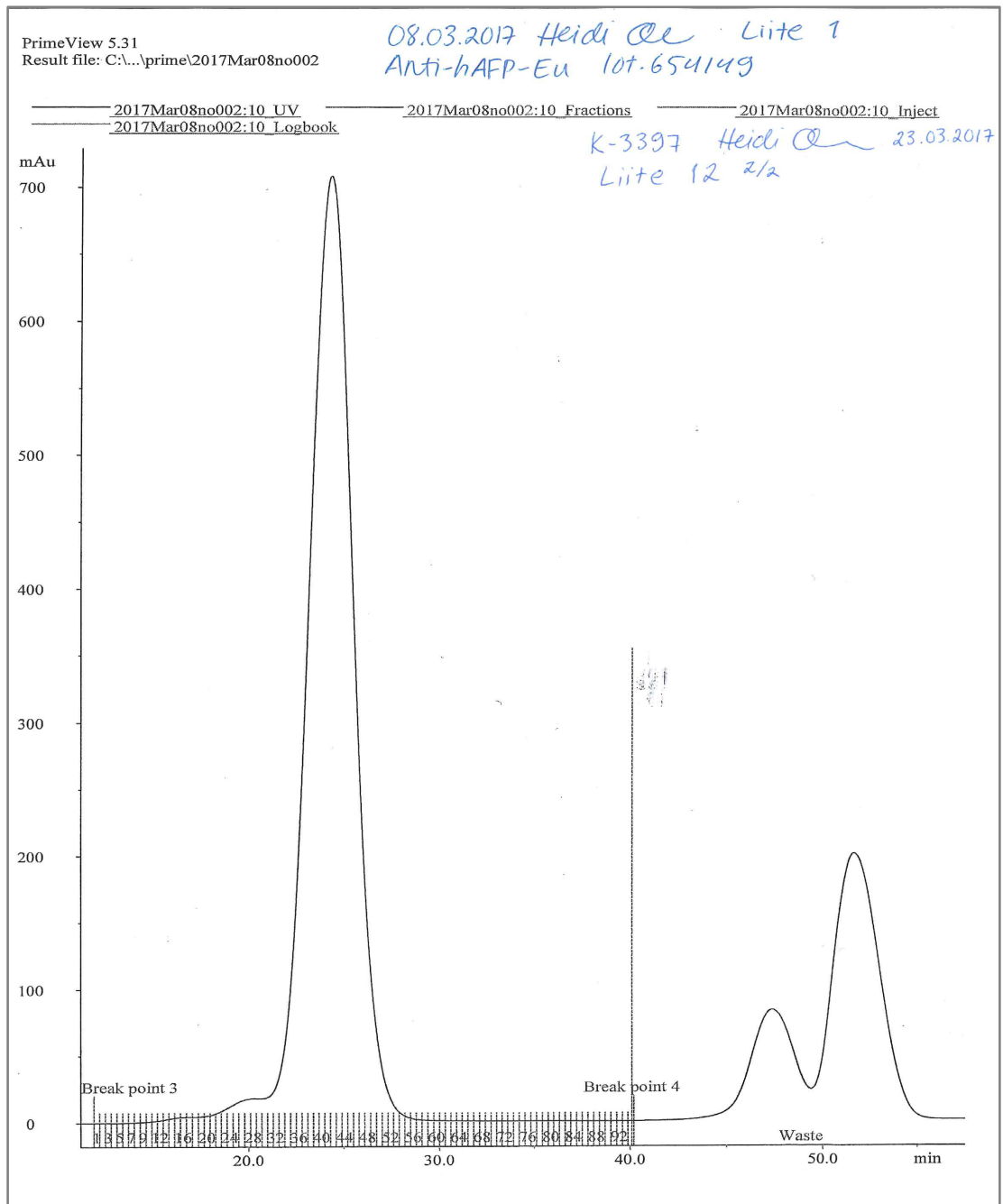
Kvalifioinnissa tehdyn asetonitestin kromatogrammi



Kolonnin edellisen asetonitestin kromatogrammi



Kvalifiointierän puhdistuksen kromatogrammi



Verifiointierän valmistus uutta puskuria käyttäen

Reagenssit:

- 0,1 M puskuriliuos (tiedot luottamuksellisia)
- 500 mM TSA-konsentraatti
- Vasta-aine (tiedot luottamuksellisia)
- N¹-Eu, fenoliuutettu
- DTPA-puhdistettu BSA
- Enhancement Solution
- Kromatografiageeli, Superdex 200, GE Healthcare
- 100 nM Eu-standardi
- Pylvään esipesuliuos
- Pylvään pesuliuos (0,5 M NaOH)

➤ Puskuriliuoksen pH:n tarkistus:

pH on 8,70 ja menee hyväksymisrajoihin (8,60 ± 0,10).

➤ 50 mM TSA-puskurin valmistus:

$$500 \text{ mM} \cdot \frac{1}{10} = 50 \text{ mM}$$

2 l 500 mM TSA-konsentraattia laimennetaan 20 litraksi 1-lk vedellä.

➤ Leimaus:

Vasta-aine sulatetaan ja sen määrä milligrammoina lasketaan.

Vasta-aineen proteiinipitoisuus = 5,0 mg/ml

Vasta-aineen tilavuus = 20 ml

Vasta-ainetta yhteensä: $5,0 \frac{mg}{ml} \cdot 20 ml = 100 mg$

N¹-Eu-leiman pitoisuus = 34,3 mM

Leimapulloihin lisättävä vesimäärä = 1,0 ml

0,1 M puskuriliuoksen määrä:

$0,11 \cdot (vasta - aineluoksen\ tilavuus) = 0,11 \cdot 20 ml = 2,2 ml$

Leimalaimennoksen tilavuus:

$$\frac{4,8 mM}{Eu (mM)} \cdot (vasta - aineen + boraattipuskurin\ tilavuus) ml$$

$$= \frac{4,8 mM}{34,3 mM} \cdot 22,2 ml = 3,11 ml$$

Leimapulloihin lisätään tarvittava määrä 1-lk vettä, sekoitetaan ja annetaan stabiloitua +2 - +8 °C:ssa vähintään 15 minuuttia. Tämän jälkeen vasta-aineeseen lisätään leimaa laskettu määrä, 3,11 ml ja 0,1 M puskuriliuosta laskettu määrä, 2,2.

Liuoksen pH mitataan ja tulokseksi saadaan 8,44. pH-arvon hyväksymisrajana on 8,50 – 8,70, joten liuoksen pH säädetään 1,0 M natriumhydroksidilla. Uusi pH-arvo on 8,54.

Liuos siirretään inkuboitavaksi 16 – 20 tunniksi +2 - +8 °C:een. Inkubointihuoneen lämpötila tarkastetaan inkuboinnin alussa ja lopussa. Inkubointiaika on 16,9 tuntia sen päätyttyä.

➤ **Puhdistus:**

Puhdistuksessa käytetään ÄKTA Prime Plus –laitteistoa ja XK50-kolonnia, joka on pakattu Superdex 200 –geelillä. Ennen puhdistusta kolonni on tasapainotettu 8 – kertaisella geelitulavuudella TSA-puskuria ja kolonnin Eu-tausta on mitattu ja kirjattu kolonnin käyttöpäiväkirjaan.

50 mM TSA-puskuria valmistetaan lisää samalla periaatteella kuin aiemmin, laimentamalla 600 ml 6 l:ksi 1-lk vedellä.

Heti inkubointiin loputtua leimattu vasta-aine puhdistetaan. Puhdistuksen kromatogrammin mukaan valitaan fraktiot, joista pipetoidaan 5,0 µl näyteputkeen ja lisätään 1000 µl 1-lk vettä ja sekoitetaan. Nämä laimennetaan vielä pipetoimalla laimennosta 5,0 µl ja lisäämällä 1000 µl mittaliuosta. Laimennokset sekoitetaan. Tämän jälkeen laimennoksista mitataan 200 µl mikrotiiterilevyn kuoppiin ja niiden fluoresenssit mitataan. Fraktioista tehdään fluoresenssikäyrä, jonka mukaan katsotaan yhdistettävät fraktiot. Yhdistettäväksi fraktioiksi valittiin 37 – 49 ja yhdistämisen jälkeen liuoksen tilavuudeksi saatiin 70,5 ml.

IgG –saalis:

cps (yhd.) = yhdistettyjen fraktioiden yhteenlaskettu fluoresenssi

cps = yhteenlaskettu fluoresenssi

applikoitu proteiinimäärä = 100 mg

$$\frac{\text{cps (yhd.)}}{\text{cps}} \cdot \text{applikoitu proteiinimäärä} = 90,221 \text{ mg}$$

➤ **Leimausasteen laskeminen:**

Monomeeripoolista pipetoitiin 10 µl, lisättiin 1,0 ml mittaliuosta ja sekoitettiin. Tästä laimennoksesta pipetoitiin kahteen putkeen 5,0 µl ja laimennettiin edelleen 2,0 ml mittaliuosta. Lisäksi 100 nM Eu-standardista tehtiin 4 rinnakkaista laimennosta pipetoimalla 5,0 µl ja lisäämällä 2,0 ml mittaliuosta. Laimennokset sekoitettiin. Tämän jälkeenlaimennoksia pipetoitiin 200 µl mikrotiiterilevyn kuoppiin ja mitattiin fluoresenssit.

Vasta-aineen keskiarvo: 1899400 cps

Eu-standardin keskiarvo: 288653 cps

Poolin Eu-pitoisuus:

$$\frac{\text{Laimennuskerroin} \cdot \text{cps (pooli)} \cdot 100 \text{ nM}}{\text{cps (std)}} = \frac{100 \cdot 1899400 \text{ cps} \cdot 100}{288653 \text{ cps}} = 65802 \text{ nM}$$

$$= 65,8 \mu\text{M}$$

Poolin IgG-pitoisuus:

$$\frac{\text{IgG - saalis } (\mu\text{g})}{\text{MW (vasta - aine)} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}}\right) \cdot \text{poolin tilavuus (l)}} = \frac{90221 \mu\text{g}}{160000 \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}}\right) \cdot 0,0705 \text{ l}}$$

$$= 8,0 \mu\text{M}$$

Leimaussaalis:

$$\frac{\text{Eu } (\mu\text{M})}{\text{IgG } (\mu\text{M})} = \frac{65,8 \mu\text{M}}{8,0 \mu\text{M}} = 8,2 \text{ Eu/IgG}$$

Monomeeripooliin lisättävän DTPA-puhdistetun BSA:n määrä:

$$\frac{\text{Poolin tilavuus (ml)} \cdot 0,1 \%}{\text{DTPA - BSA - \%}} = \frac{70,5 \text{ ml} \cdot 0,1 \%}{7,5} = 0,94 \text{ ml}$$

Lopputilavuus = poolin tilavuus + DTPA-puhdistetun BSA:n tilavuus = 70,5 ml + 0,94 ml = 71,44 ml

Lopullinen IgG-pitoisuus:

$$\frac{\text{IgG - saalis } (\mu\text{g})}{\text{lopputilavuus (ml)}} = \frac{90221 \mu\text{g}}{71,44 \text{ ml}} = 1263 \mu\text{g/ml}$$

Monomeeripooliin lisätään laskettu määrä DTPA-puhdistettua BSA:ta.

Verifiointierän puhdistuksen kromatogrammi

