

Fremstilling af biologisk aktive biomolekyler fra spildprodukter

Oprensning fra valle og derivatisering af immunglobulin kan forventes at nedbringe kalvedødeligheden med mindst 50%. Der forventes også en væsentlig forbedring af væksten og den almene sundhedstilstand og nedbringelse af antibiotikaforbruget

Af Peter M. H. Heegaard, Veterinærinstituttet, DTU og Allan Lihme, UpFront Chromatography A/S

Valle indeholder lave koncentrationer af de antistoffer, der af koen udskilles i mælken. Hvis disse antistoffer er til stede i tilstrækkelige koncentrationer, kan de beskytte kalven mod diarré forårsaget af tarmpatogener, idet de binder sig til og neutraliserer patogenerne og deres toksiner. Diarré er yderst udbredt blandt kalve, især i deres første levemåned, og er en vigtig årsag til den relativt høje kalvedødelighed. Derfor er der et stort behov for effektive og økonomisk holdbare metoder til at forhindre sådanne infektioner.

I et offentligt/privat forskningsprojekt støttet af offentlige midler (Danmarks FødevareErhverv) og af privat investeringskapital (NOVI Innovation, NOVI A/S) undersøges et nyt koncept, der muliggør udnyttelsen af valle immunglobulin. De afgørende tekniske komponenter i konceptet er dels en skræddersyet kromatografisk metode til ekstraktion af immunglobulin fra "biologiske væsker" (som valle) og dels en patentansøgt metode til stabilisering af immunglobulinmolekyler under opretholdelse af deres biologiske aktivitet (antistofaktivitet), dvs. deres evne til at neutralisere patogener.

Kalvedødelighed er et alvorligt og omfattende problem

I traditionelle danske malkekvægsbesætninger dør ca. 15% af kalvene inden for de 3 første måneder efter kælvning. Det er et stort etisk og produktionsøkonomisk problem, der også medfører et uacceptabelt højt forbrug af antibiotika.

Halvdelen af kalvene dør af diverse infektioner, hvoraf enteriske (tarm-lokaliserede) infektioner er dominerende, især i den første måned. Tager infektionerne i den første måned ikke livet af kalven, gør de den ofte mere modtagelig for andre infektioner senere i opvækstperioden.

Størstedelen af disse problemer kan afhjælpes ved at give kalven adgang til råmælk (kolostrum) lige efter kælvning. Kolostrum er mælk fra første udmalkning efter kælvning, og den indeholder særligt høje koncentrationer af antistoffer. I moderne besætninger er det ikke altid muligt, at kalvene får adgang til kolostrum, og de får derfor ofte forskellige kolostrumerstatninger, der senere følges op af et fodertilskud. Disse tiltag er dog langt fra særligt effektive og må ofte suppleres med antibiotikabehandling.



Figur 1. Den nyfødte kalv er afhængig af at modtage antistoffer (immunglobuliner) for hurtigst muligt at opnå modstandsdygtighed mod infektioner med de virus, bakterier og parasitter, der findes i miljøet, og som også kan overføres fra moderen. Disse antistoffer findes i høje koncentrationer i moderkoens første mælk efter kælvningen, råmælken (kolostrum).

Passiv immunisering: Antistoffer skal være aktive, dokumenterede, sterile og økonomisk bæredygtige

Ved kalvens indtag af koens mælk fungerer de naturligt forekommende antistoffer i mælken, såvel lokalt i kalvens tarm-system som i kalvens blodkar og lymfesystem, idet kalven, i modsætning til f.eks. mennesker, kan optage immunglobulin over tarmen inden for det første døgn. Herefter lukker tarmen af for optag af immunglobulin. Det er vigtigt for kalvens modstandsdygtighed mod infektioner, at denne "opfyldning" med antistoffer finder sted. I 2-3 måneder efter den første absorption af IgG fra råmælken er kalven afhængig af yderligere indtag af antistoffer gennem modermælken (den lactogene immunitet, der beskytter tarmslimhinden) samt af den begyndende egenproduktion af immunglobuliner.

Faktaboks 1

Indholdet af immunglobulin i forskellige mælkefraktioner
Kolostrumkoncentration: > 100 g/liter
Mælkekoncentration: 1-2 g/liter
Vallekoncentration: 0,7 g/liter (eller lavere)

Kalvens egenproduktion af immunglobulin lokalt i tarmen og andre slimhinder starter omkring uge 3 efter fødslen. Immunglobulinet består hovedsageligt af IgA. Det er pga. den dimere struktur, som medfører flere aktive bindingsregioner pr. immunglobulinmolekyle samt bedre stabilitet i tarmmiljøet, særligt effektivt til at neutralisere virus og bakterier. Kalvens immunforsvar kan på trods af en effektiv absorption af IgG ved fødslen være utilstrækkelig, hvis der i de efterfølgende måneder ikke tilføres nok antistoffer, og/eller hvis kalvens egenproduktion er utilstrækkelig.

Indgivelse af antistoffer til beskyttelse mod infektiøse patogener kaldes "passiv immunisering", fordi kalvens eget immunforsvar ikke aktiveres. Beskyttelsen stammer fra de tildelte antistoffer, der kan binde og neutralisere patogener og deres toksiner. Immuniteten er ikke afhængig af "aktiv immunisering" (også kaldet vaccination), der dels kræver, at kalvens immunsystem er modnet, og dels at det ved omhyggeligt valg af hjælpestoffer og design af vaccinen sikres, at der produceres slimhinderrelaterede antistoffer (IgA). Det sidste er vigtigt, da det giver den bedste beskyttelse mod patogener lokalt i tarmen på slimhinderne, hvis antistofferne er til stede lokalt og gerne allerede på det tidspunkt, hvor patogenet forsøger at etablere sig.

Fra naturens hånd består IgA af 2 antistofmolekyler, der er koblet sammen med en kemisk binding. Det giver dem en optimal aktivitet i tarmmiljøet. Det er i modsætning til den dominerende antistoftype i komælk (og blod), der består af frie enkeltmolekyler (IgG). Da antistoffer ved oral indgivelse skal passere koens fjerde mave, udsættes de for denne maves lave pH, hvilket IgG ikke er helt stabilt over for. Der mistes med andre ord antistofaktivitet, inden IgG når tarmsystemet. Under naturlige forhold er det ikke et problem, da mælken netop i den periode, hvor der er mest brug for det, dvs. i kolostrum, indeholder meget høje IgG-koncentrationer.

I malkekøvsbesætninger udgør brugen af kolostrum til nyfødte kalve nogle problemer, idet kolostrummets kvalitet, herunder koncentrationen af immunglobulin, varierer forholdsvis meget fra ko til ko. Desuden forsøger man at begrænse brugen af kolostrum som fødekilde, da det kan overføre smitte fra ko til kalv og på den måde opretholde visse udbredte og tabsvoldende infektioner, specielt paratuberkulose (eng.: Johne's disease).

Sidstnævnte problem kan løses ved at sterilisere kolostrum ved varmebehandling eller mikrofiltrering, men det skaber andre problemer. Varmebehandling påvirker de relativt varme-labile immunglobulinmolekyler, så de delvist taber antistofaktivitet, og filtrering af det viskøse kolostrum er besværligt, dyrt og tidskrævende.

Expanded Bed Adsorption (EBA)-kromatograf til effektiv renfremstilling af immunglobulin med høj kapacitet

Det danske selskab, UpFront Chromatography A/S, har udviklet en adsorptionskromatografisk proces, der kan isolere proteiner og andre biologiske molekyler direkte fra forskellige flydende biologiske råmaterialer. Procesteknologien og relaterede tekniske områder er patenteret med mere end 15 uafhængige internationale patentfamilier.

Ideen i teknologien er at udbrede udnyttelsen af den overlegne separationsevne som væskerkromatografi tilbyder ved at benytte

nogle helt specielle faste faser ("matricer"), som tillader meget høje flowhastigheder og kan håndtere viskøse væsker og væsker, der indeholder ikke-opløste bestanddele. Sådanne væsker er almindeligt forekommende blandt biologiske væsker og ekstrakter, der indeholder industrielt og kommercielt interessante stoffer (blod, mælk, valle, fermenteringsvæsker o.l. med bl.a. celler og cellerester). Processer der kan oprense biomolekyler direkte fra sådanne væsker, dvs. uden filtrerings- og fældnings-trin o.l., er derfor interessante og gør nye typer af oprensninger mulige også i industriel sammenhæng.

En densitetsstyret matrice benyttes til at opbygge en kromatografisk kolonne med meget specielle egenskaber. Ved den rette kombination af søjlematerialets vægtfylde, de anvendte væsker og flowhastighed igennem kolonnen opbygger man en selvdannende og stationær fast fase, som – i modsætning til gængse kromatografiske søjlematerialer – ikke er pakket tæt sammen, men "ekspanderet" i en løst pakket kolonne ("expanded bed"). I den normale opsætning er flowretningen nedefra og op, og kuglerne er tunge, således at de holder sig stationære og danner en ekspanderet "søjle" i væskestrømmen. Typiske kugler (eng.: "beads") til dette brug har en diameter på 20-200 µm og en densitet på 2.5-3.5 g/ml.

Der gemmer sig flere interessante "tricks" i processen; f.eks. fødes søjlerne af væskestrømmen, så der ikke opstår semipermanente "kanaler" mellem søjlens kugler, men således at væskestrømmen hele tiden fordeles over hele søjlevoluminet. Det har vist sig, at man ved brug af kugler, der ikke er helt monodisperse, opnår en mere stabil expanded bed, der fordeles sig med en densitetsgradient med de tungeste kugler i bunden. Det betyder, at kolonnen bliver mere stabil, hvilket forbedrer dens kromatografiske egenskaber. En anden vigtig designdetalje er selve kuglerne, "composites", der består af en geleret og passende krydsbundet polymer (agarose) indeholdende tunge uorganiske partikler (f.eks. tungstencarbid). Funktionen er at give kuglen den ønskede ►

Faktaboks 2. Projektets partnere

- UpFront Chromatography A/S er et dansk selskab etableret i 1992. Selskabets forretningsområde er separation og isolering af proteiner i industriel skala. Selskabets kerne-teknologi, "Expanded Bed Adsorption" er velegnet til at isolere proteiner fra store industrielle væskestrømme med lave omkostninger. Den har været brugt i industrien siden 1999 og benyttes i stor skala hos en række danske og internationale virksomheder. Selskabet har f.eks. (i 2005) leveret verdens største kromatografianlæg af denne art til Dairy Farmers i Australien. Her behandles 15.000 L valle pr. time til produktion af 25.000 kg biologisk aktive proteiner pr. år (se også www.upfront-dk.com)

- Veterinærinstituttet var indtil udgangen af 2006 et sektorforskningsinstitut og fra og med 2007 et institut under DTU. Det har langvarig og bred ekspertise inden for husdyrimmunologi og sygdomsdiagnostik, herunder kvantitativ bestemmelse af specifikke antistoffer og diagnostik af patogener hos husdyr.

- Multimerics ApS er stiftet i 2009 med udvikling af nye antimikrobielle produkter baseret på immunglobuliner fra industrielt tilgængelige råmaterialer såsom mælk, æg og animalsk plasma som forretningsområde. Selskabets antimikrobielle produkter retter sig mod styrkelse af slimhindeimmunitet og vil primært finde profylaktisk anvendelse hos særligt udsatte grupper, såsom produktionsdyr i det intensive landbrug og på længere sigt også human, herunder hos immunkompromitterede patienter (f.eks. AIDS-patienter).

densitet. Agarose er et særdeles velkendt kolonnemateriale i forbindelse med konventionel kromatografi.

Specielt til oprensning af immunglobulin fra biologiske væsker som mælk, valle og blod har metoden vist sig nyttig. UpFront har udviklet en gruppe af ligander, som, når de påsættes en EBA-matrice, meget effektivt binder immunglobulinmolekyler, hvorefter immunglobulinet kan frigøres ("eluere") igen under relativt milde betingelser i opkoncentreret og næsten ren form i ét trin direkte fra udgangsmaterialet.

Industrielle anlæg baseret på denne proces er opstillet af UpFront og er i drift forskellige steder i verden (faktaboks 2). Der er f.eks. anlæg i brug, hvor der oprenses immunglobulin fra 200.000 liter valle om dagen. Her pumpes vallen i første trin ufiltreret og ubehandlet gennem en 250 liters kolonne (1,5 m i diameter) med et flow på 900 cm/time (ca. 16.000 liter i timen), 85.000 liter ad gangen, svarende til over 300 gange søjlevoluminet. Herefter køres væskestrømmen efter en pH-justering gennem yderligere en EBA-kolonne, hvorfra immunglobulinet kan elueres ved let basisk pH med et udbytte på omkring 13 kg immunglobulin pr. 85.000 liter valle og med forureninger mest bestående af albumin og lactoglobulin. Hvis der ønskes større renhed kan disse urenheder relativt nemt fjernes ved en afsluttende ionbytning (også på EBA-søjle). Højkapacitetsanlæg af denne type producerer op til 100 kg immunglobulin om dagen.

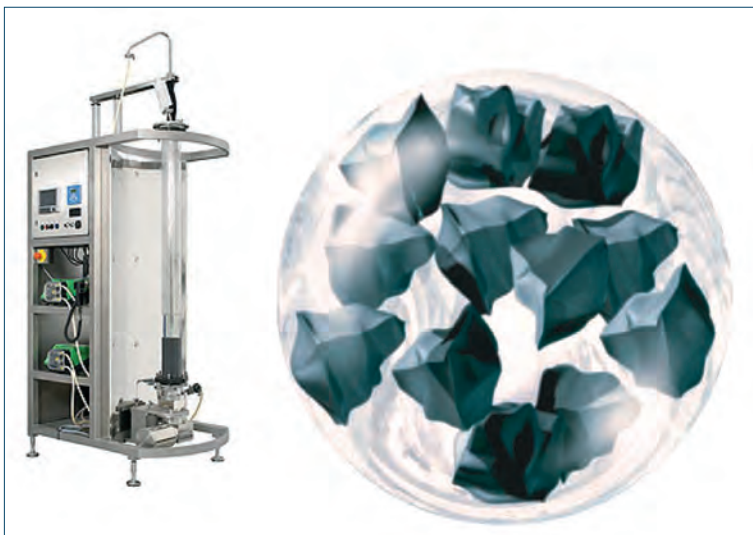
UpFronts immunglobulinbindende ligander er mixed mode ligander, som binder immunglobulin relativt specifikt under bestemte pH- og ionstyrkebetingelser ved en blanding af elektrostatiske, hydrophobe og hydrogen-bindingsafhængige bindingstyper. De er generelt opbygget af ioniserbare aromatiske forbindelser (UpFront-patent). En stor fordel ved disse matricer og deres ligander er, at de er stabile over for opvarmning og over for op til 1 M NaOH, hvilket gør det muligt at rense og genbruge dem mange gange.

Valle er et godt eksempel på en biologiske væske, som det normalt ikke er rentabelt at oprense immunglobulin fra, da koncentrationen af immunglobulin er relativt lav (omkring 0,7 mg/ml immunglobulin G). Derfor skal der behandles store volumina valle for at isolere interessante mængder immunglobulin. UpFronts proces giver imidlertid mulighed for hurtigt og effektivt at "fiske" det tilstedeværende immunglobulin ud af vallen.

Stabilisering af immunglobulin G til IgA-lignende komplekser med forøget stabilitet i mave-tarmkanalen

Immunglobuliner er relativt følsomme proteiner. Det betyder, at deres antistofaktivitet er meget påvirkelig af f.eks. pH og opvarmning. pH-følsomheden har som nævnt stor praktisk betydning for brugen af immunglobulin til oralt administreret passiv immunisering af mave-tarmkanaler, da det er essentielt, at en væsentlig del af antistofaktiviteten opretholdes også efter passagen af det sure pH i koens abomasum (koens fjerde mave, pH omkring 2). Ved den naturlige overførsel af immunglobulin fra ko til kalv ved indtag af kolostrum sikres dette, dels gennem en meget høj koncentration af immunglobulin (typisk > 100 mg/ml), og dels ved indholdet af andre proteiner samt lipider som delvist "beskytter" immunglobulinet. Ved tildeling af renfremstillet immunglobulin er det alene ud fra et økonomisk synspunkt vigtigt, at antistofaktiviteten i videst muligt omfang opretholdes under passagen af kalvens mave og tarm.

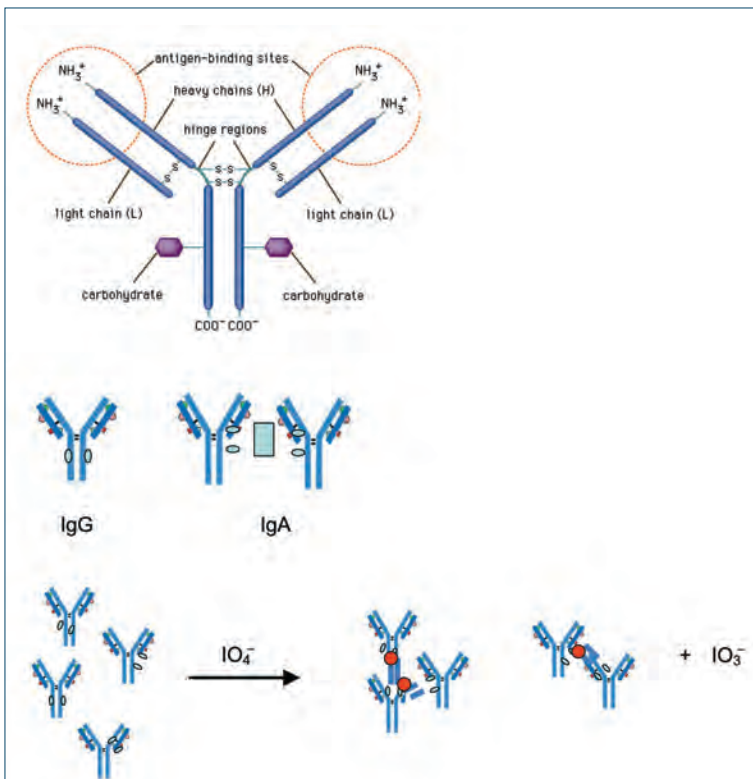
Det undersøges derfor, om dette kan opnås ved at stabilisere immunglobulinet ved en kemisk metode. Metoden har med god succes været brugt til mild multimerisering af andre biomolekyler, nemlig sammenkobling ved reaktiv aminering af kulhydrat.



Figur 2. Tv. UpFront EBA-anlæg med søjlen forrest, hvori kan skimtes en ikke-expanderet matrice (det sorte stykke nederst i søjlen), og bagest pumperne til styring af flow ind og ud af søjlen samt diverse monitorer for ionstyrke, pH og UV-absorption af væskestrømmen.

Th. en principskitse af en kugle ("bead") bestående af tungstencarbid indeholdt i en rund kugle af geleret og krydsbundet agarose på hvis overflade er koblet en ligand (ikke vist), der kan binde det molekyle, man vil oprense.

Det kan lade sig gøre, fordi immunglobulin indeholder nogle få procent kulhydrat, der kan oxideres mildt og selektivt med periodat, hvorefter de dannede aldehydgrupper kan reagere med primære aminer i et andet immunglobulinmolekyle og danne relativt stabile konjugater. Herudover producerer reaktionen kun iodat. Ideen er, at en kontrolleret multimerisering (sammenkobling



Figur 3. Øverst skematisk struktur af immunglobulin G med markering af position af polypeptidbundet kulhydrat. Nederst skematiske strukturer af IgG og IgA og konjugationsreaktionen mellem oxideret kulhydrat og polypeptidkæden, der danner konjugater af forskellige størrelser (dimerer, trimerer eller højere oligomerer), alt efter hvordan reaktionen styres. Den røde cirkel indsat i tegningen af konjugaterne indikerer positionen af den kovalente binding.

af flere molekyler, figur 3) i sig selv vil stabilisere immunglobulin G molekylet og give det en "IgA-lignende" opbygning (IgA: faktaboks 3). Det må antages at være en fordel, da naturligt forekommende slimhinde-lokaliserede immunglobuliner netop er af IgA-typen. Man ved, at IgA har god stabilitet også over for mikrobielle proteinnedbrydende enzymer fra bakterier i tarmen. En specielt fordelagtig egenskab ved den undersøgte multimeriseringsmetode er, at den involverer kulhydrat fra ét molekyle som reagerer med aminogrupeer i et andet molekyle. Det øger chancen for, at de vigtige antigenreagerende dele af immunglobulinmolekylet ikke "forsvinder" som del af den kemiske reaktion, idet disse dele af molekylet ikke indeholder kulhydrat (figur 3). Endelig er metoden enkel, gennemprøvet og giver ugiftige reaktionsprodukter.

Et nyt dansk selskab, Multimerics ApS, har patentansøgt for denne nye teknologi, der på en økonomisk bæredygtig, biologisk og sikkerhedsmæssigt forsvarlig måde kan omdanne højttoprensede IgG-molekyler til multimerer molekyler, som emulerer den biologiske aktivitet af naturligt IgA med samme eller forøget effekt. Multimerics teknologi har højt oprenset immunglobulin som forudsætning, hvilket UpFront Chromatographys teknologi netop sikrer forsyningen af.

Status og perspektiver

Den nye teknologi til fremstilling af højttoprenset, ikke-denatureret immunglobulin har meget lave omkostninger pr. kg oprenset produkt, hvilket åbner for en økonomisk bæredygtig anvendelse af højttoprensede immunglobulinprodukter til passiv immunisering af produktionsdyr. Det har ikke tidligere været økonomisk muligt at anvende højttoprensede immunglobulinprodukter i landbruget, i modsætning til i den humane medicin hvor sådanne produkter anvendes med stor succes. De udviklede produkter vil ikke have nogen konkurrence fra produkter med tilsvarende specifikationer mht. sammensætning, renhed/sterilitet og dokumenteret specificitet og vil repræsentere en signifikant forbedring af eksisterende produkter med lavere immunglobulinindhold og uspecificeret aktivitet.

Brug af sådanne nye produkter kan forventes at nedbringe kalvedødeligheden med mindst 50% og samtidig medføre en væsentlig forbedring af væksten og den almene sundhedstilstand og nedbringe antibiotikaforbruget.

Der fødes ca. 700.000 kalve om året i Danmark. Det anslås at 2-300.000 får behandlingskrævende diarré. Eksportmæssigt er det potentielle marked også meget attraktivt, idet der fødes ca. 80 mio. kalve med tilsvarende frekvens af behandlingskrævende diarré om året i EU alene. Produkterne vil stå stærkt på eksportmarkedet pga. det standardiserede indhold, den dokumenterede effekt og den dokumenterede frihed for patogene agens. Det forventes, at en succesfuld anvendelse af de udviklede produkter vil ned sætte forbruget af antibiotika til sygdomsbekæmpelse væsentligt og derved reducere risikoen for udvikling af antibiotika-resistente mikroorganismer i landbrugssektoren.

Det skal nævnes, at der herudover ved fornøden succes

Faktaboks 3. Ordforklaringer

IgG: Den enklest opbyggede immunglobulinklasse og den dominerende i serum og hos koen også i mælken og i kolostrum.

IgA: Slimhindeantistoffer som optræder som en dimer (2 molekyler) af immunglobulinmolekyler.

EBA: Expanded Bed Adsorption, kromatografisk metode baseret på pakkede men ekspanderede søjler.

Lactogen immunitet: Immunitet der overføres med mælk.

Passiv immunisering: Skabelse af immunitet gennem tilde-ling af antistoffer (immunglobuliner) enten ved oralt indtag eller ved injektion.

Kolostrum: Råmælk, dvs. den første modermælk efter fødsel, indeholder meget mere immunglobulin og har et højere generelt proteinindhold end den senere mælk.

er meget store perspektiver inden for andre områder, hvor effektiv, prisbillig passiv immunisering kan spille en rolle, f.eks. inden for medicinsk behandling og sygdomsforebyggelse hos mennesker.

E-mail-adresse

Peter M.H. Heegaard: pmhh@vet.dtu.dk

Kilder

Osame, S., S. Ichijo, C. Ohta, T. Watanabe, W. Benkele, and H. Goto. 1991. Efficacy of colostral immunoglobulins for therapeutic and preventive treatments of calf diarrhea. J. Vet. Med. Sci. 53:87-91.

Ebina, T. 1996. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. Arch. Virol. Suppl. 12: 217-223.

Ikemori, Y., Ohta, M., Umeda, K., Icatlo, F.C.J., Kuroki, M., Yokoyama, H., and Kodama, Y. 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. Vet Microbiol 58:105-111

Taylor, H.P. and Dimmock, N.J. 1985. Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. J Exp Med. 161(1): 198-209.

Anspach FB, Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., Deckwer, W.D. 1999. Expanded-Bed Chromatography in primary protein purification, J. Chrom. A 865: 129-144.

Lihme, A., Bendix-Hansen, M., Isolation of Immunoglobulins, US Patent WO9808603A1 (1998)

www.pumpegruppen.dk Tlf. +45 45 93 71 00
Fax +45 45 93 47 55



NY ELEKTRISK FADPUMPEMOTOR

- Regulerbar, 3.500-10.000 rpm.
- 650 W, 1x230 V, 50 Hz, IP24
- Nyudviklet "Quick Connection" til montering af motor på pumperør, uden brug af værktøj
- Indbygget overbelastningsbeskyttelse
- Konstrueret til kontinuerlig drift
- Passer til pumperør i PF, TBP og TBS serierne

PUMPE
GRUPPEN A/S

info@pumpegruppen.dk