

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2013

Siru Mettälä

ALPHALISA[®] TNF_α IMMUNOGEENISYYS- MÄÄRITYKSEN KEHITYS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Siru Mettälä

ALPHALISA® TNF ALPHA IMMUNOGEENISYYSMÄÄRITYKSEN KEHITYS

Nykyään monet lääkkeet sisältävät ns. biologisia lääkeaineita, esim. vasta-aineita tai nukleiinihappoja, jotka ihmisen immuunijärjestelmä saattaa tunnistaa vieraksi aineiksi aiheuttaen immuunipuolustusreaktion, jossa muodostuu vasta-aineita lääkemolekyyliä vastaan (anti-drug antibodies, ADA). Tällaisen lääkkeen sanotaan olevan immunogeeninen ja immunogeenisyyttä tutkitaan lääkekehityksen aikana lääkkeen turvallisuuden ja tehon osoittamiseksi.

Työn päätarkoitus oli osoittaa AlphaLISA-teknologian soveltuvuus biologisten lääkeaineiden immunogeenisyyden tutkimiseen. Työssä kehitettiin menetelmä, jolla voidaan mitata TNF α vasta-aineita ihmisen seerumista. Työ tehtiin Syrinx Bioanalytics Oy:ssä yhteistyössä PerkinElmerin kanssa.

AlphaLISA on homogeeninen immunomääritys, joka perustuu energiansiirtoon luovuttaja- ja vastaanottajapartikkeleiden välillä. Partikkeleiden pinnalle on konjugoitu TNF α -molekyyliä, jotka sitoutuvat näytteen sisältämien TNF α -vasta-aineiden kanssa tuoden partikkelit lähelle toisiaan. Energiansiirto on mahdollista vain, mikäli partikkelit ovat riittävän lähellä toisiaan. Homogeeninen määritys ei vaadi pesu-vaiheita, vaan kaikki inkuboinnit sekä mittaus tapahtuvat samassa liuoksessa.

Työssä osoitettiin AlphaLISA-teknologian soveltuvuus immunogeenisyydemäärityksiin. Ensin optimoitiin määritysparametrit, mm. partikkelien pitoisuus, inkubointiaika, näytetilavuus, ja sitten karakterisoitiin menetelmän ominaisuuksia, mm. herkkyys, toistettavuus ja lääketoleranssi.

Menetelmä on toistettava ja kliinisiin määrityksiin suositeltu herkkyys saavutettiin. Menetelmän etuja ovat pieni näyte- ja reagenssikulutus ja lisäksi se on yksinkertainen ja nopea suorittaa.

Todettiin, että konjugoitujen partikkelierien välillä voi olla jonkin verran vaihtelua. Suuren määrän konjugointi ei onnistunut.

Vapaa lääke häiritsee määritystä, mutta happokäsittelyvaiheen lisäys paransi lääketoleranssia 5-kertaisesti. Muihin määritysformaatteihin verrattuna tällä menetelmällä arvioidaan olevan n. 10 kertaa heikompi lääketoleranssi, mikä on tämän menetelmän heikkous.

Menetelmänkehitys on tehty pääosin käyttäen suoraa määritysmenetelmää, jossa molemmat partikkelit on konjugoitu suoraan TNF α :lla. Menetelmää voisi vielä verrata SA-menetelmään, jossa käytetään biotinyloitua TNF α :aa ja luovuttajapartikkelit on konjugoitu streptavidiinilla.

ASIASANAT:

biologinen lääkeaine, vasta-aine, immunomääritys, immunogeenisyys, AlphaLISA

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2013 | 77

Instructors: Elli Oksanen M.Sc., Ilari Suominen Ph.D.

Siru Mettälä

DEVELOPMENT OF ALPHALISA® TNF ALPHA ASSAY FOR IMMUNOGENICITY ASSESSMENT

Many drugs today contain so called biological pharmaceuticals, e.g. anti-bodies or nucleic acids which can be recognized as foreign substances by the human immunogenicity system. This may cause an immune response where antibodies against the drug molecule are formed (anti-drug antibodies, ADA). This kind of drug is called an immunogenic and immunogenicity is studied during the development of the drug to evaluate its safety and efficiency.

The aim of the study was to establish the applicability of AlphaLISA technology for the assessment of biological drug immunogenicity. A method for the detection of anti-TNF α antibodies in human serum was developed in the study. The experimental development work was performed at Syrinx Bioanalytics Oy in collaboration with PerkinElmer.

AlphaLISA is a homogeneous solution phase immunoassay which is based on energy transfer between acceptor and donor beads. The surface of the beads is conjugated with TNF α molecules which are bound by anti-TNF α antibodies in the sample bringing the beads near each other. Energy transfer is possible only if the beads are close enough to each other. A homogeneous assay does not need wash steps because all incubation steps and the measurement occur in the same solution.

The suitability of AlphaLISA technology for immunogenicity assessment was established. First the assay parameters were optimized (e.g. bead concentration, incubation, sample volume) and then the different properties were characterized (e.g. sensitivity, repeatability, drug tolerance).

The method is reproducible and the recommended sensitivity for clinical assays was reached. The advantages of the method lie in the small consumption of sample and reagents. In addition, it is simple and fast to perform.

It was observed that there may be slight variation between the conjugated bead batches. The conjugation of a larger amount of beads was unsuccessful.

Free drug interferes with the assay but addition of an acid dissociation step improved the drug tolerance fivefold. Compared to other assay formats this method is estimated to have an approximately tenfold lower drug tolerance, which is the drawback of the assay.

The method development was performed mainly by using a direct method where both beads are directly conjugated with TNF α . The method could also be compared to the SA method where biotinylated TNF α is used and donor beads are conjugated with streptavidin.

KEYWORDS:

biological pharmaceutical, antibody, immunoassay, immunogenicity, AlphaLISA

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	8
1 JOHDANTO	9
1.1 Yhteistyö	9
1.2 Määrityksen taustat	10
1.2.1 Immunogeenisyys	10
1.2.2 Määritysmenetelmä	10
1.2.3 TNF α -proteiini	11
1.2.4 Menetelmänkehitys	12
2 IMMUNOGEENISYYS	13
2.1 Immunogeenisyys	13
2.2 Biologiset lääkeaineet	13
2.3 Immuunireaktio	14
2.4 Immunogeenisyyden määrittäminen	14
2.5 Immunogeenisyysmäärityksien periaate	15
2.6 Immunogeenisyysmenetelmän kehityksessä karakterisoitavia parametreja	17
3 ALPHALISA	19
3.1 Alpha -teknologia	19
3.2 AlphaLISA	19
3.3 Partikkelit	20
3.4 Alpha –teknologioiden etuja	21
4 MENETELMÄNKEHITYKSEN VAATIMUKSET	22
4.1 Menetelmänkehitys	22
4.2 GLP	22
4.3 GCP	23
4.4 Tarkastustoiminta	24
4.5 Tieteelliset julkaisut	24
5 LAITTEISTO	26
5.1 EnVision™	26
5.2 Mittaaminen Alpha -teknologiassa	26
5.3 Häiritsevä signaali	27

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	28
6.1 Materiaalit	28
6.1.1 Reagenssit & puskurit	28
6.1.2 Luovuttaja- ja vastaanottajapartikkelien konjugointi TNF α :lla	29
6.1.3 TNF α –biotinylointi	32
6.2 Menetelmät	33
6.2.1 Määrittämisprotokollat	33
6.3 Menetelmänkehityksen suorittaminen	35
6.3.1 Konjugointi 1	35
6.3.2 Bio-TNF α :n laatu	35
6.3.3 Bio-TNF α :n konsentraation optimointi	36
6.3.4 TNF α :n biotinylointi	37
6.3.5 Biotinyloidun TNF α :n laatu	37
6.3.6 Uuden Bio-TNF α :n konsentraatio	37
6.3.7 Partikkelien konsentraatiot	38
6.3.8 Pienin tarvittava seerumilaimennos	38
6.3.9 Inkubaatioaika	39
6.3.10 Happokäsittely	39
6.3.11 Lääkkeensietokyky sekä happokäsittely	40
6.3.12 Cut point	40
6.3.13 Konjugointi 2 sekä testaus	41
6.3.14 Konjugointi 3 sekä testaus	41
6.3.15 Herkkyys, lineaarisuus ja koukkuefekti	42
6.3.16 Määrittämislevyjen vertailu	43
6.3.17 Saanto	43
6.3.18 Herkkyys	43
6.3.19 LoQC ja HiQC	44
6.3.20 Tarkkuus ja häiriöalttius	44
6.3.21 Lääkkeensietokyky	44
7 TULOKSET JA TARKASTELU	45
7.1 Konjugointi 1	45
7.2 Bio-TNF α :n laatu	45
7.3 Bio-TNF α :n konsentraatio	45
7.4 Uuden biotinyloidun TNF α :n laatu	46
7.5 Uuden Bio-TNF α :n konsentraatio	47

7.6 Partikkelien konsentraatiot	47
7.7 Pienin tarvittava seerumilaimennos	48
7.8 Inkubaatioaika	49
7.9 Happokäsittely	50
7.10 Vapaan lääkkeen sietokyky ja happokäsittely	51
7.11 Cut point	53
7.12 Konjugointi 2 sekä testaus	54
7.13 Konjugointi 3 sekä testaus	54
7.14 Herkkyys, lineaarisuus ja koukkuefekti	55
7.15 Määrityslevyjen vertailu	57
7.16 Saanto	58
7.17 Tarkkuus ja häiriöalttius	59
7.18 Lääkkeensietokyky	60
8 ARVIOINTI JA POHDINTA	61
LÄHTEET	64

LIITTEET

- Liite 1. Määritystulosten raakasignaalit
- Liite 2. Cut point -laskelmat
- Liite 3. Herkkyyslaskelmat & -kuvaajat
- Liite 4. Tarkkuuslaskelmat

KUVAT

- Kuva 1. AlphaLISA TNF α immunogeenisyysmäärityksen malli (¹O₂ = singlettihappi). 20
- Kuva 2. Bio-TNF α :n määrittämiseen käytettävän määrityksen periaate (Boissonneault, 2012). 33
- Kuva 3. Biotinyloidun TNF α :n laatu. 46
- Kuva 4. Biotinyloidun TNF α :n konsentraatio. 47
- Kuva 5. Pienin tarvittava seerumilaimennos. 49
- Kuva 6. Inkubaatioaika. 50
- Kuva 7. Happokäsittely. 51
- Kuva 8. Vapaan lääkkeen sietokyky happokäsittelyllä. 52
- Kuva 9. Vapaan lääkkeen sietokyky ilman happokäsittelyä. 52
- Kuva 10. Happokäsittelyn vaikutus ilman vapaata lääkettä. 53
- Kuva 11. Konjugoinnin 2 testaus. 54

Kuva 12. Konjugoinnin 3 testaus.	55
Kuva 13. Herkkyys	56
Kuva 14. Lineaarisuus, matriisi- ja koukkuefekti	57
Kuva 15. Levyjen vertailu	58

TAULUKOT

Taulukko 1. Määritysreagenssit	29
Taulukko 2. Määrityspuskurin valmistusohje	29
Taulukko 3. Konjugoinnin lähtötilanne. (Oksanen, 2012)	30
Taulukko 4. Konjugointireagenssit (Oksanen, 2012).	31
Taulukko 5. Konjugointiprotokolla (Oksanen, 2012).	31
Taulukko 6. Bio-TNF α :n määritysprotokolla (Boissonneault, 2012).	32
Taulukko 7. Seulontamääritys (Oksanen, 2012).	34
Taulukko 8. Varmistusmääritys (Oksanen, 2012).	34
Taulukko 9. SA-määritys (Oksanen, 2012).	34
Taulukko 10. SA-määritysprotokolla.	36
Taulukko 11. Suora määritysmenetelmä.	38
Taulukko 12. Happokäsittelyprotokolla	39
Taulukko 13. Varmistusmääritysprotokolla	40
Taulukko 14. Partikkelikonsentraation optimointi.	48
Taulukko 15. Herkkyys	56
Taulukko 16. Saanto-%	59
Taulukko 17. Tarkkuus	60

KÄYTETYT LYHENTEET

Ab	Antibody, vasta-aine
ADA	Anti-drug antibody
Alpha	Amplified luminescent proximity homogeneous assay
Bio-TNF α	Biotinyloitu TNF α
GCP	Good Clinical Practice
GLP	Good Laboratory Practice
HiQC	High Quality Control
ICH	International Conference on Harmonisation
LoQC	Low Quality Control
RT	Room temperature, huoneenlämpötila
SA	Streptavidin
TNF α	Tumor necrosis factor α

1 JOHDANTO

TNF α AlphaLISA-immunomäärityksen kehityksessä oli tarkoituksena kehittää ja evaluoida menetelmä, jolla voidaan mitata vasta-aineita ihmisen seerumista. Työn päätarkoitus oli osoittaa AlphaLISA-teknologian soveltuvuus biologisten lääkeaineiden immunogeenisyyden tutkimiseen. Työ tehtiin Syrinx Bioanalytics Oy:ssä yhteistyössä PerkinElmerin kanssa. Määrityisperiaate soveltuu erilaisten vasta-aineiden määrittämiseen. Tässä työssä mallina käytettiin TNF α (tumor necrosis factor α) -proteiinin tunnistavia vasta-aineita.

1.1 Yhteistyö

Työ tehtiin Syrinx Bioanalytics Oy:n sekä PerkinElmerin välisenä yhteistyöprojektina. Syrinx Bioanalytics Oy on suomalainen CRO (Contract Research Organization)-laboratorio, joka tarjoaa bioanalyttistä tutkimuspalvelua mm. biologisten lääkeaineiden, anti-lääkevasta-aineiden, biosimilaarien, rokotteiden sekä biomarkkereiden määrittämiseen koe-eläin- ja potilasnäytteistä. Menetelmät ovat pääasiassa vasta-aineisiin perustuvia immunomäärityksiä. Bioanalyttisiä tutkimuksia tehdään GLP- ja GCP-ohjeistusten mukaisesti ja laboratoriollla onkin voimassaoleva GLP-status. Tutkimukset pyritään tekemään viimeisimpien viiranomaisohjeistuksien ja tieteellisten suositusten (white papers) mukaan. Käytössä on useita erilaisia määritysmenetelmiä, joista AlphaLISA-menetelmä on yksi. Myös useita nykyaikaisia immunomäärityksiin soveltuvia laitteistoja on käytössä ja niistä AlphaLISA-menetelmässä käytetään EnVision™ -laitteistoa. (Syrinx Bioanalytics Oy, 2009)

Tutkimukseen liittyvät käytännön työt tehtiin Syrinxissä, mutta teknologia on PerkinElmerin ja AlphaLISA on yhtiön rekisteröimä tuotemerkki. PerkinElmeriltä saatiin ohjeistusta ja vinkkejä menetelmänkehityksen aikana ja loppujen lopuksi yhteistyöprojektista ja sen tuloksista on tarkoitus tehdä tieteellinen julkaisu. PerkinElmer on yhdysvaltalainen monikansallinen teknologiayritys. Sen liiketoiminta

keskittyy analyyttisiin instrumentteihin, optoelektroniikkaan, geenien tutkimuslaitteistoihin ja -reagenssivalmistukseen ja lääketieteellisten tutkimuslaitteistojen ja diagnostisten instrumenttien valmistukseen. (PerkinElmer, 2013)

1.2 Määrityksen taustat

1.2.1 Immunogeenisyys

Nykyään monet lääkkeet ovat ns. biologisia lääkeaineita, esim. vasta-aineita tai nukleiinihappoja, jotka ihmisen immuunijärjestelmä saattaa tunnistaa vieraiksi aineiksi aiheuttaen immuunipuolustusreaktion, jossa muodostuu vasta-aineita lääkemolekyylä vastaan (anti-drug antibodies, ADA). Tällaisen lääkkeen sanotaan olevan immunogeeninen ja immunogeenisyyttä tutkitaan lääkekehityksen aikana lääkkeen turvallisuuden ja tehon osoittamiseksi. Immunogeenisyyshmäärityksessä lääkemolekyylä käytetään määritysreagenssina, johon näytteessä oleva ADA sitoutuu muodostaen kompleksin lääkemolekyylin kanssa. Kompleksin muodostus voidaan havaita esim. fluoresenssisignaalinä.

1.2.2 Määritysmenetelmä

AlphaLISA on homogeeninen immunomääritys, joka perustuu energiansiirtoon luovuttaja- ja vastaanottajapartikkeleiden välillä. Anti-TNF α -vasta-aineiden mittaaminen AlphaLISA-menetelmällä perustuu partikkeleihin, joiden pinnalle on konjugoitu TNF α -molekyylejä. Partikkeleita inkuboidaan yhdessä TNF α -vasta-aineita sisältävän näytteen kanssa, jolloin vasta-aineet sitoutuvat TNF α -molekyyleihin tuoden partikkelit lähelle toisiaan, mikä mahdollistaa energiansiirron. (Oksanen, 2012)

1.2.3 TNF α -proteiini

Menetelmän kehityksessä TNF α -proteiinia on käytetty mallimolekyylinä menetelmän toimivuuden osoittamiseksi, koska sekä TNF α -proteiinia, että TNF α -vasta-aineita on kaupallisesti saatavissa. TNF α -vasta-aineita käytetään menetelmän kehityksessä positiivisena kontrollina. TNF α on sytokiini, joka osallistuu elimistön immuunipuolustusreaktioon mm. stimuloimalla tulehdusreaktiota ja ohjattua solukuolemaa (apoptoosi). Apoptoosia voidaan hyödyntää biologisissa lääkkeissä tuhoamalla pahanlaatuisia soluja TNF α :n avulla. Kun TNF α yhdistetään syöpäspesifiseen biomolekyyliin, saadaan lääke ohjattua suoraan syöpäsoluihin vähentäen terveisiin soluihin aiheutuvaa vauriota. (Somprayrac, 2008)

TNF α :n on havaittu olevan osallisena erilaisissa tulehdussairauksissa ja siten biologiset lääkeaineet, jotka sisältävät TNF α :aa (esim. etanersepti ja adalimumabi), ovat tulleet yhä tärkeämmiksi useiden kroonisten tulehduksellisten sairauksien hoidossa (esim. reuma, psoriasis ja Chrohnin tauti). Tällä hetkellä olemassa olevat rekombinanttiset TNF α -lääkkeet voivat joillain potilailla dramaattisesti vähentää taudin aktiivisuutta ja lieventää tautia. Valitettavasti kaikki potilaat eivät reagoi suotuisasti anti-TNF α -vasta-aineisiin. Esimerkiksi Crohnin tautia sairastavat eivät hyödy etanerseptistä ja jotkut potilaat, joita on hoidettu muilla anti-TNF α -valmisteilla, eivät myöskään reagoi ollenkaan tai reagoivat aluksi, mutta myöhemmin tila huononee huolimatta suuremmasta tai tiheemmästä annostuksesta. Syytä näille vasteongelmille ei tiedetä, mutta ihmisillä on tietysti eroja biologisessa vastaanottokyvyssä ja farmakokinetiikassa, joilla on vaikutusta lääkkeen tehoon. Lisäksi lääkkeiden immunogeenisyys, mikä aiheuttaa potilaille anti-lääke-vasta-aineita, voi johtaa hoitovirheisiin. Hoitovirhe voi aiheutua esimerkiksi siitä, että vasteen puuttuessa nostetaan lääkeannosta, vaikka vasteen puuttuminen johtuukin anti-lääke vasta-aineista, jotka neutraloivat lääkkeen eli lääkkeellä ei ole tehoa ja sen antaminen potilaalle on turhaa. Siksi potilaiden monitorointi ja TNF:n sekä ADA:n määrien seuraaminen on tärkeää, jotta voidaan löytää jokaiselle potilaalle henkilökohtainen lääke/lääkeannostus, joka on tehokas ja mahdollisimman turvallinen. (Bendtzen ym., 2009)

1.2.4 Menetelmänkehitys

Menetelmänkehityksessä optimoitiin mm. partikkeleiden konjugointi, partikkeleiden ja määrittämissä käytettävän biotinyloidun TNF α :n määrittämissä konsentraatiot, miniminäytelaimennos ja inkubaatioaika. Näytteen sisältämä vapaa lääke voi häiritä immunogeenisyysmäärittäystä, ja tätä voidaan estää matalan pH:n avulla. Siten testattiin myös ns. happodissosiaatio eli happokäsittely. Lopullisen määrittämissä karakterisoinnissa tutkittiin menetelmän ominaisuuksia lääketeollisuuden ja lääkevalvontaviranomaisten suositusten mukaisesti. Tällöin arvioitiin mm. menetelmän herkkyyttä, toistettavuutta, saantoa ja vapaan lääkkeen sietokykyä. (Oksanen, 2012)

2 IMMUNOGEENISYYS

2.1 Immunogeenisyys

Lääke, joka aiheuttaa vasta-aineiden muodostumisen lääkettä vastaan, on immunogeeninen. Vasta-aineet voivat aiheuttaa immuunipuolustusreaktion, joka voi joissain tapauksissa aiheuttaa vakavia sivuvaikutuksia tai vaikuttaa lääkkeen tehoon heikentävästi eli neutraloi sen, jolloin lääkitys on turhaa ja aiheuttaa myös taloudellisia menetyksiä. Ihmisillä ADA ei yleensä aiheuta havaittavia kliinisiä haittavaikutuksia, mutta joidenkin lääkeproteiinien kohdalla nämä vasta-aineet ovat kuitenkin aiheuttaneet seuraamuksia, jotka ovat vaihdelleet melko lievästä jopa vaarallisen haitallisiin vaikutuksiin. Prekliinisissä tutkimuksissa ADA voi vaikuttaa lääkealtistukseen eli muuttaa lääkkeen sitoutumisominaisuuksia. Tämä voi hankaloittaa toksisuuden sekä farmakokineettisen ja farmakodynaamisen tutkimustiedon tulkintaa. Sen vuoksi lääkeproteiinien immunogeenisyys onkin kliinikoiden, lääkevalmistajien ja viranomaisten kiinnostuksen kohteena. (Shankar ym., 2008)

2.2 Biologiset lääkeaineet

Biologiset lääkeaineet eroavat tavanomaisista pienistä lääkemolekyyleistä siten, että ne ovat kooltaan suurempia (tyypillisesti $> 1-3$ kDa, vasta-aineet ~ 160 kDa). Ne ovat usein aminohappojen biopolymeerejä, hiilihydraatteja, nukleinihappoja tai vasta-aineita ja ne on usein valmistettu ihmis- tai ei-ihmissoluissa (näissä on erilaiset proteiinin translaation jälkeiset modifikaatiot, jotka ovat vieraita rakenteita ihmiselimistölle) tai mikro-organismeissa. Näiden erojen vuoksi biologisilla lääkeaineilla on suurempi potentiaali aiheuttaa immuunireaktio. Tätä potentiaalia säätelevät valmisteen sisäiset tekijät (lajispesifiset epitoopit, glykosylaatio, aggregoitumisen tai denaturoitumisen määrä, epäpuhtaudet ja formulaatiot), valmisteen ulkoiset tekijät (lääkkeen antoreitti esim. suun kautta tai ihon alle, akuutti tai krooninen lääkehoito, farmakokinetiikka,

sisäisten analogien olemassaolo esim. jos molekyylin rakenne on samankaltainen elimistön omien proteiinien kanssa) sekä potilaan ominaistekijät (autoimmuunisairaudet, kehon puolustustason laskeminen, korvaava hoito). (Shankar ym., 2008)

2.3 Immuunireaktio

Vaikka immuunireaktio ei yleensä aiheuta merkittäviä haittoja, sen aikaansaaaminen voi johtaa vahingollisiin jälkitauteihin, kuten yliherkkyys lääkkeelle tai autoimmuuniteettihäiriö ja muuttaa lääkkeen farmakokinetiikkaa (neutraloi lääkettä, epänormaali biologinen jakauma elimistössä tai lisääntynyt lääkkeen pääsy kohdesoluihin, joka voi mahdollisesti johtaa muutoksiin hoidon tehossa). Lääkehoidon aiheuttama immuunireaktio on siksi merkittävä turvallisuutta ja tehokkuutta koskeva huolenaihe, josta viranomaiset, lääkkeenvalmistajat, klinikot ja potilaat ovat kiinnostuneita. Niinpä USA:n lääkeviranomainen Food & Drug Administration (FDA) ja myös vastaavat viranomaiset Euroopan Unionissa, Kanadassa, Japanissa ja Australiassa vaativat, että ADA määritetään ja kaikki farmakologiset ja toksikologiset huomiot arvioidaan. (Shankar ym., 2008)

2.4 Immunogeenisyyden määrittäminen

Jotta voitaisiin arvioida biologisen lääkemolekyylin immunogeenistä potentiaalia sekä laboratoriotulosten ja kliinisten tapahtumien vastaavuutta, on tärkeää kehittää luotettava testausmenetelmä, jonka avulla saadaan hyvä käsitys vastaainevasteesta sekä prekliinisissä että kliinisissä testeissä. Sen vuoksi menetelmien validointia pidetään tärkeänä ja markkinoille tuleville lääkkeille tehdyt bioanalyttiset tutkimukset tulee olla tehty validoiduilla menetelmillä. Olemassa olevat viranomaisohjeistukset menetelmien validointiin käsittelevät immunomäärityksiä rajallisesti ja niistä puuttuu erityisesti tietoa juuri immunogeenisyydemääritysten validointia koskien. Tästä johtuen Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis on julkaissut artikkelin, jossa on tieteellisiä suosituksia ADA – immunomääritysten validointiin. Artikkelissa esitetään yksilöllisiä validointitoi-

menpiteitä niiden lisäksi, joita on olemassa olevissa bioanalyysejä koskevilla säännöksissä. Näitä suosituksia pitäisi pitää esimerkkeinä hyvistä käytännöistä ja ne on tarkoitettu yhtenäistämään vasta-aineiden testausta koko biologisten lääkeaineiden alalla. (Shankar ym., 2008)

Immunogeenisyyden ja kliinisten oireiden oikea tulkinta riippuu biologisia lääkkeitä vastaan muodostuvien vasta-aineiden täsmällisestä havaitsemisesta ja karakterisoinnista prekliinisissä ja kliinisissä tutkimuksissa. Tästä johtuen bioanalyttiset menetelmät, joita käytetään immunogeenisyystutkimuksiin, pitäisi olla kunnolla kehitetty ja validoitu ennen kuin testaus aloitetaan tutkimusnäytteillä. Validointi on määritelty prosessiksi, jossa osoitetaan erityisin laboratoriotutkimuksin, että analyysimenetelmä on sopiva analyyttiseen käyttötarkoitukseensa. ADA:n havainnointimenetelmien ollessa kyseessä, validointi muodostaa todisteen siitä, että määrittäminen pystyy luotettavasti havaitsemaan pieniä määriä lääkeaineelle spesifisiä vasta-aineita monimutkaisessa biologisessa matriisissa, kuten plasmassa tai seerumissa. Validointi pitäisi suorittaa ”pre-study” -vaiheessa (ennen kuin kliinisiä tai prekliinisiä näytteitä analysoidaan), mutta on myös yhtä tärkeää osoittaa, että määrittäminen pysyy validina tai kontrolloituna myös ”in-study” -vaiheessa (kun kliinisiä tai prekliinisiä näytteitä analysoidaan). Vain silloin tutkimusnäytteiden tuloksia voidaan pitää hyväksyttävänä. (Shankar ym., 2008)

2.5 Immunogeenisyysmäärittäminen

Immunogeenisyysmäärittämisessä lääkemolekyylillä käytetään määrittämisreagenssinä, johon näytteessä oleva ADA sitoutuu muodostaen kompleksin lääkemolekyylin kanssa. Kompleksin muodostus voidaan havaita esim. fluoresenssisignaalinä. Usein käytetään ns. bridging määrittämiä, joissa ADA sitoutuu kahteen eri lääkemolekyyliin.

Immunogeenisyysmäärittämiset ovat kvalitatiivisia määrittämiä eli määritetään sisältääkö näyte vasta-aineita vai ei, mutta vasta-aineiden pitoisuutta ei määritetä. Immunogeenisyysmäärittämisissä analytti on joukko polyklonaalisia vasta-

aineita, joilla on erilaiset sitoutumisominaisuudet samaan molekyyliin. Siksi ei ole olemassa yhtä molekyyliä, joilla määritykset voitaisiin standardoida niin, että voitaisiin mitata näytteen sisältämän ADA:n pitoisuus. Positiiviset ja negatiiviset tulokset havaitaan cut point–signaalirajan avulla. Signaaliraja perustuu lääketutkimuksen kohdepopulaation nollatason vaihteluun (eli mitattava taso näytteessä ilman ADA:aa) ja se määritetään analysoimalla useassa ajossa näytematriisia (esim. seerumi) useilta kohdepopulaation yksilöiltä. Ko. näytteet eivät saa sisältää määritettäviä vasta-aineita ja cut point-signaaliraja asetetaan saatujen tulosten signaalitason perusteella. Immunogeenisyyden määrittämisperiaatteen mukaan näytteet analysoidaan määrittämisarjana, johon kuuluvat seulontamääritys (suora määrittäminen), varmistusmääritys ja mahdolliset titrausmääritykset. (Oksanen, 2012)

Seulontamäärityksessä tutkitaan sisältääkö näyte lääkkeeseen sitoutuvia vasta-aineita. Seulontamäärityksen cut point asetetaan tarpeeksi matalalle, jotta saadaan myös vääriä positiivisia tuloksia (esim. 5 % negatiivisista näytteistä). Tällä pyritään varmistamaan, että ei saada vääriä negatiivisia tuloksia, mikä saattaisi vaarantaa lääketurvallisuuden ja lääkkeen todellisen immunogeenisyyden osoittamisen.

Varmistusmäärityksessä varmistetaan, että vasta-aineet ovat spesifisiä lääkeaineelle. Varmistus tapahtuu usein samalla määrittämisperiaatella kuin seulonta, mutta tällöin näytettä inkuboidaan yhdessä vapaan lääkkeen kanssa. Vapaa lääke ei ole konjugoitu partikkeleihin, joten kun ADA tunnistaa sen liuoksessa, ei saada signaalia. Tämä signaalin inhiboituminen seulontamääritykseen verrattuna varmistaa, että seulontamäärityksessä saatu tulos on todellinen positiivinen tulos. Vapaa lääke tuo määritykseen uuden kohteen, johon ADA voi sitoutua, jolloin vasta-aineiden sitoutuminen määrityksessä reagenssina käytettävään partikkeleihin konjugoituun lääkemolekyyliin vähenee. (Oksanen, 2012)

Titrausmäärityksiä tehdään, mikäli varmistusmäärityksessä näyte on havaittu todelliseksi positiiviseksi näytteeksi. Titraus tarkoittaa sitä, että näytettä laimennetaan niin paljon, että saadaan seulontamäärityksessä negatiivinen tulos. Tällöin saadaan määrittäytyksi näytteelle tiitteri eli laimennoskerroin, jolla viimeinen

positiivinen tulos havaitaan ja näin saadaan arvio näytteen sisältämien vasta-aineiden määrästä ja affiniteetista.

2.6 Immunogeenisyysmenetelmän kehityksessä karakterisoitavia parametreja

Menetelmänkehityksessä optimoidaan ensin määrittämisen parametreja, jotta saadaan määrittäminen toimivaksi. Lopullisen määrittämisen karakterisoinnissa tutkitaan menetelmän ominaisuuksia lääketeollisuuden ja lääkevalvontaviranomaisten suositusten mukaisesti, jolloin määritetään menetelmälle tietyt parametreja, joita on selvennetty seuraavassa.

Menetelmän herkkyys tarkoittaa analyysin pitoisuutta, joka menetelmällä pystytään vielä toistettavasti määrittämään. Kliinisiin määrittämiin suositeltu herkkyys on 0,25 – 0,5 µg/ml.

Menetelmän lineaarisuudella tarkoitetaan sitä, että määrittämisalueella analyysipitoisuuden kasvaessa myös signaali kasvaa. Tällöin piirrettäessä annos-vastekuvaaja, on kuvaajan muotokin lineaarinen.

Koukkuefektin tarkoittaa sitä, että erittäin korkea analyysipitoisuus antaa määrittämisessä virheellisesti matalan signaalin, jolloin annos-vastekuvaajalla on korkeimpien pitoisuuksien kohdalla havaittavissa ns. koukun muotoinen linja.

Näyteanalyysissä käytetään menetelmän toimivuuden osoittamiseksi kontrollinäytteitä, joita kutsutaan LoQC:ksi (matala kontrolli) ja HiQC:ksi (korkea kontrolli). LoQC on sama pitoisuus, kuin määritetty menetelmän herkkyys ja HiQC on määrittämisalueella oleva korkea pitoisuus.

Näytteen sisältämä vapaa lääke saattaa häiritä määrittäystä, jolloin lääkkeensietokyky on tiedettävä. Menetelmän lääkkeensietokyky eli lääketoleranssi on se vapaa lääkkeen määrä, jolla määritettävä analyysi antaa vielä positiivisen signaalin.

Cut point on signaaliraja, jolla määrityksen positiiviset näytteet havaitaan. Cut point määritetään menetelmän karakterisoinnin yhteydessä ja se perustuu lääketutkimuksen kohdepopulaation nollatason vaihteluun.

3 ALPHALISA

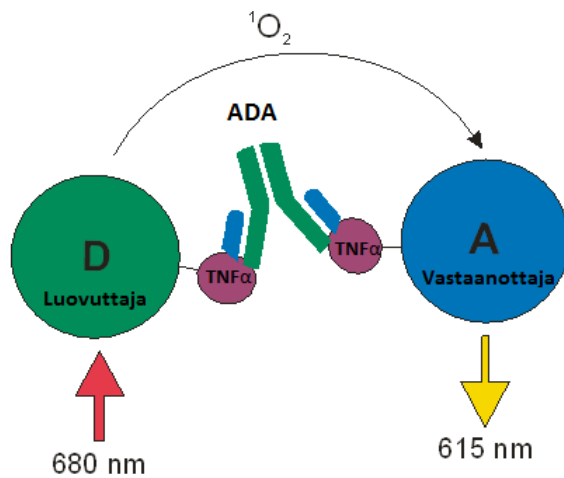
3.1 Alpha -teknologia

Alpha -teknologia on PerkinElmerin kehittämä teknologia, johon kuuluvat sekä AlphaScreen[®]- että AlphaLISA[®]-määritykset. Teknologiat ovat PerkinElmerin rekisteröimiä tuotemerkkejä. Alpha -lyhenne tulee sanoista amplified luminescent proximity homogeneous assay, joka tarkoittaa vapaasti suomennettuna vahvistettu luminoiva homogeeninen läheisyysmääritys. Määrityksessä reagoivien aineiden on oltava lähellä toisiaan ja määritykset tapahtuvat samassa liuoksessa yhdessä vaiheessa. Määritykset perustuvat partikkeleihin sekä biomolekyylien välisiin reaktioihin mikrolevyalustalla. Yksi määritysten pääominaisuus on, että ne ovat ei-radioaktiivisia homogeenisia läheisyysmäärityksiä. (PerkinElmer, 2011)

3.2 AlphaLISA

AlphaLISA on homogeeninen immunomääritys, joka perustuu energiansiirtoon luovuttaja- ja vastaanottajapartikkeleiden välillä. Energiansiirto on mahdollista vain, mikäli partikkelit ovat riittävän lähellä toisiaan. Näytettä inkuboidaan liuosfaasissa yhdessä partikkeleiden kanssa ja inkuboinnin jälkeen signaalin mittaus tapahtuu samassa liuoksessa (homogeenisyys). Anti-lääke-vasta-aineiden mittaaminen AlphaLISA-menetelmällä perustuu partikkeleihin, joiden pinnalle on konjugoitu lääkeainemolekyyliä. Partikkeleita inkuboidaan yhdessä lääke-vasta-aineita sisältävän näytteen kanssa, jolloin vasta-aineet sitoutuvat lääkeainemolekyyliin tuoden partikkelit lähelle toisiaan, mikä mahdollistaa energiansiirron. Tapahtumaa on kuvattu kuvassa 1., jossa näkyvät TNF α :lla konjugoituneet partikkelit sekä keskellä analytti, anti-TNF α vasta-aine. Luovuttajapartikkelien viritystilaa muuttavat ympäröivät happimolekyylit virittyneeseen muotoon. Virittyneet happimolekyylit puolestaan käynnistävät vastaanottajapartikkeleissa kemiallisen reaktion, jonka seurauksena vastaanottajapartikkelit emittoivat mi-

tattavaa fluoresenssia. Mikäli näytteessä ei ole analyyttiä, kompleksia ei muodostu ja signaalia ei saada.



Kuva 1. AlphaLISA TNF α immunogeenisyysmäärityksen malli (1O_2 = singlettihappi).

3.3 Partikkelit

AlphaLISA-määrityksen luovuttaja- ja vastaanottajapartikkelit (Donor beads ja Acceptor beads) sisältävät erilaisen seoksen kemikaaleja. Luovuttajapartikkelit sisältävät valonherkistäjää, ftalosyaniinia, joka muuttaa ympäröivän hapen virittyneeseen muotoon (singlettihappi). Tämä tapahtuu aallonpituudella 680 nm. Singlettihappi ei ole radikaali vaan happimolekyyli, jolla on yksi virittynyt elektroni. Kuten muillakin virittyneillä molekyyleillä, myös hapella on vain rajallinen elinaika ennen kuin se palaa takaisin luonnolliseen tilaan. Virittynyt happi voi levitä liuoksessa noin 200 nm:n matkan, kun sen puoliintumisaika on 4 mikrosekuntia. Jos vastaanottajapartikkeli on lähistöllä, energiaa siirtyy virittyneestä hapesta vastaanottajapartikkelien tioksiinijohdannaisiin, mistä seuraa valon emittoitumista 615 nm:n aallonpituudella. Jos vastaanottajapartikkelit puuttuvat, virittynyt happi palaa luonnolliseen tilaan eikä signaalia saada. Tämä läheisyydestä riippuvainen kemiallinen energiansiirto on Alpha-teknologian homogeenisen luonteen perusta. (PerkinElmer, 2011)

3.4 Alpha –teknologioiden etuja

Molemmissa Alpha -teknologioissa käytetään samoja luovuttajapartikkeleita, mutta vastaanottajapartikkelit ovat erilaisia. AlphaScreeniin verrattuna AlphaLISA on vähemmän herkkä keinotekoisille tai luonnollisille häiriötekijöille kuten hemoglobiini, joka absorboi valoa 500-600 nm:n aallonpituudella. AlphaLISA antaa vahvan signaalin, on vähemmän altis matriisihäiriöille ja on optimoitu seerumi- ja plasmanäytteille. (PerkinElmer, 2011)

Alpha -teknologioiden etuja ovat herkkyys, matala taustasignaali, korkea signaali-taustasuhde, pienet reaktiutilavuudet ja siten kustannustehokkuus sekä kyky mitata myös matalan affiniteetin analyyttejä (,koska ei vaadita pesuvaiheita). Herkkyys saavutetaan signaalin vahvistamisella, mikä johtuu luovuttajapartikkelien sisältämän valonherkistäjän suuresta konsentraatiosta sekä vastaanottajapartikkelien sisältämien tioksiinijohdannaisien ja fluoroforien tiheydestä. Kun luovuttajapartikkelit viritetään 680 nm aallonpituudella, jokainen partikkeli voi luovuttaa jopa 60000 virittyntä happimolekyyliä sekunnissa, josta seuraa erittäin korkea signaalin vahvistuminen. Signaalin voimakkuuden ansiosta voidaan havaita molekyylivuorovaikutuksia jopa femtomolaarisessa konsentraatiossa. Matala tausta johtuu siitä, että partikkelien säteily mitataan aikaerotteisella menetelmällä (viritys- ja havainnointisyklien välillä on 20 millisekunnin viive), joka poistaa lähes kaiken määrityskomponenteista ja levyistä aiheutuvan taustafluoresenssin. Lisäksi signaalinlukaallonpituus on matalampi kuin viritysaallonpituus, joka poistaa lähes kaiken määrityskomponenteista ja levyistä johtuvan taustafluoresenssin. Korkea signaali-taustasuhde ja siten hyvä herkkyys johtuu juuri edellä kuvatusta voimakkaasta signaalista ja matalasta taustasignaalista. Määritykset pystytään minimoimaan 15 - 50 µL:n kokonaistilavuuteen ilman uudelleenoptimointia. Pienet tilavuudet mahdollistavat kustannustehokkuuden. Teknologiaa voidaan käyttää monipuolisesti erilaisten molekyylien ja reaktioiden määrittämiseen, esimerkiksi entsyymiaktiivisuus, reseptori-ligandivuorovaikutukset, matalan affiniteetin vuorovaikutukset, DNA, RNA, proteiinit, peptidit, hiilihydraatit, pienet molekyylit sekä erikokoiset molekyylikompleksit. (PerkinElmer, 2011)

4 MENETELMÄNKEHITYKSEN VAATIMUKSET

4.1 Menetelmänkehitys

Menetelmänkehitys on tutkimusta ja määrittämissparametrien optimointia esimerkiksi immunogeenisyysmäärittämiseksi jonkin lääkeaineen immunogeeniyyden määrittämiseksi. Menetelmänkehitysvaiheessa ei ole niin tiukkoja säännöksiä tai vaatimuksia kuin esimerkiksi menetelmien validoinneissa ja prekliinisissä tai kliinisissä näyteanalyysissä. Menetelmänkehitystutkimuksia ei esimerkiksi tarkasteta laadunvalvontaosaston toimesta kuten muita edellä mainittuja tutkimuksia. Tutkimusta tehdään kuitenkin GLP –ympäristössä GLP –laboratoriossa, joten käytännössä työtä tehdään mahdollisuuksien mukaan täysin samoja periaatteita noudattaen kuin muitakin ns. GLP –tutkimuksia. Siksi tässä yhteydessä esitellään hieman myös lakeja, laatujärjestelmiä, ohjeita ja säännöksiä, joita myös menetelmänkehityksen aikana on hyvä tai syytä noudattaa.

4.2 GLP

GLP eli Good Laboratory Practice eli hyvä laboratoriokäytäntö on laatujärjestelmä, joka kuvaa järjestelmän ja olosuhteet, joissa prekliinisiä tutkimuksia suunnitellaan, toteutetaan, monitoroidaan, kirjataan, raportoidaan ja arkistoidaan. Syrinxillä on GLP –sertifikaatti ja laboratoriossa noudatetaan OECD:n GLP:tä, The OECD Principles of Good Laboratory Practice bioanalytiikkaan soveltuvien osien. GLP –lainsäädäntö EU:ssa on direktiiveissä 2004/10/EC ja 2004/9/EC. Suomessa noudatetaan lisäksi kemikaalilakia (744/1989), 57 § ja lääkelakia (395/1987), 76 a § sekä lakia Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskuksesta (593/2009).

GLP –hyväksyntä eli oikeus toimia valtuutettuna testauslaboratoriona anotaan Suomen lääkelaitokselta eli Fimealta. Lääkelaitos suorittaa kahden vuoden vä-

lein määräaikaisen GLP –tarkastuksen. OECD:n GLP pitää sisällään seuraavat asiat: testauslaitoksen organisaatio ja henkilöstö, laadunvarmistusjärjestelmä, tilat, laitteet, tarvikkeet, reagenssit, testausjärjestelmät, testi- ja referenssiaineet, vakioidut toimintaohjeet, tutkimuksen suorittaminen, tutkimustulosten raportointi sekä asiakirjojen ja materiaalien varastointi ja säilyttäminen.

GLP pyrkii aikaansaamaan tutkimuksia, joiden tuloksiin ja dokumentointiin voi luottaa. Tarvittaessa tutkimus pitää pystyä toistamaan olemassa olevan dokumentaation perusteella vuosienkin kuluttua. (Ristelä, 2010)

4.3 GCP

Koska useat menetelmänkehitykset ja tutkimukset tähtäävät lääkekehitykseen ja kliinisiin lääketutkimuksiin, on jo aikaisessa vaiheessa hyvä huomioida lääketieteellisen tutkimuksen vaatimukset. Syrixillä tutkimuksissa noudatetaan myös soveltuvin osin GCP –vaatimuksia. GCP on Hyvä (lääkkeiden) kliininen tutkimustapa (Good Clinical Practice). Tämän normin noudattaminen varmistaa yleisellä tasolla, että tutkimushenkilöiden oikeudet, turvallisuus ja hyvinvointi turvataan ja että kliinisten tutkimusten tulokset ovat luotettavia. Euroopassa GCP on kuvattu direktiiveissä Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2001/20/EY (lääketutkimusdirektiivi) ja komission direktiivi 2005/28/EY (GCP direktiivi). Nämä direktiivit on implementoitu kaikissa EU –maissa paikalliseen lainsäädäntöön ja GCP on siten laillisesti velvoittava kaikissa EU:n jäsenmaissa. Suomessa Fimea on antanut määräyksen 2/2012, jonka mukaan kaikki kliiniset lääketutkimukset on suunniteltava, suoritettava ja raportoitava hyvän kliinisen tutkimustavan periaatteiden mukaisesti. GCP periaatteet kuvataan ohjeistossa ICH GCP, Guideline for Good Clinical Practice (CPMP/ICH/135/95), joka sisältää seuraavat kliinisessä lääketutkimuksessa huomioitavat asiat: sanasto, ICH GCP periaatteet, eettiset toimikunnat, tutkija, toimeksiantaja, tutkimussuunnitelma ja tutkimussuunnitelman muutokset, tutkijan tietopaketti sekä keskeiset tutkimusasiakirjat. (Santavuori, 2013)

4.4 Tarkastustoiminta

Tutkimuslaboratorioiden toimintaa tarkastetaan säännöllisin väliajoin. Tarkastukset voivat olla sisäisiä tai ulkoisia tarkastuksia. Sisäistä tarkastustoimintaa suorittaa laboratorion QA (quality assurance) -henkilö/-henkilöstö, joka tarkastaa tutkimuksia (suunnitelmat, suoritus, raportit), tiloja, prosesseja ja palveluntoimittajia (esim. reagenssit, laitteet). Jokaisesta tarkastuksesta laaditaan tarkastusraportti, joka sisältää yhteenvedon, havainnot, tilaa korjaavien toimenpiteiden kirjaamiselle sekä voi sisältää myös ehdotuksia toiminnan parantamiseksi. Tarkastusten tarkoituksena on havaita puutteita ja korjata ja kehittää toimintaa jatkuvan laadun takaamiseksi.

Ulkopuolisia tarkastuksia voi suorittaa esimerkiksi Suomen tai ulkomaiden viranomaiset. Suomen viranomainen on lääkelaitos eli Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus, Fimea. Euroopan (EU:n) viranomainen on European Medicines Agency, EMA. USA:n viranomainen on U.S. Food and Drug Administration, FDA. Myös asiakkaat eli sponsorit voivat suorittaa ulkopuolisia tarkastuksia. Ulkopuolisiin tarkastuksiin valmistaudutaan hyvin etukäteen, kootaan valmistautumisryhmä, laaditaan suunnitelma ja jaetaan vastuut. Itse tarkastuksessa on aluksi aloituskokous, jonka jälkeen viedään läpi itse tarkastus (työtila, isäntä, kysymyksiin vastaaminen ja dokumenttien esittäminen, kysymysten osoittaminen vastuuhenkilöille) ja lopuksi pidetään päätöskokous. Tarkastuksesta saadaan tarkastusraportti, johon tulee yleensä vastata noin kahden viikon kuluessa. (Ristelä, 2010)

4.5 Tieteelliset julkaisut

Koska immunogeenisyys on suhteellisen uusi asia lääkekehityksessä, ei kaikkien testaukseen ole vielä olemassa täydellistä ohjeistusta. Immunogeenisyyttä tutkitaan jatkuvasti lisää ja asiasta julkaistaan tieteellisiä julkaisuja, joita kutsutaan White papereiksi. Näissä julkaisuissa on suosituksia ja ohjeistuksia esimerkiksi immunogeenisyyden tutkimiseen, mitä voidaan hyödyntää tutkimuksis-

sa. Tutkimus täytyy tietenkin yleisesti tehdä noudattaen virallisia lakeja ja määräyksiä.

5 LAITTEISTO

5.1 EnVision™

AlphaLISA-määrityksessä käytetään viritykseen ja detektointiin PerkinElmerin EnVision-monileimalevy lukijaa. Laite on nopea, sopii moniin erilaisiin mittauksiin. Samalla laitteella pystytään mittaamaan sekä valoa emittoivia että valoa absorboivia määriksiä kuten Alpha-määriksiä, fluoresenssia, polarisoitunutta fluoresenssia, aikaerotteista fluoresenssia, luminesenssia sekä absorbanssia. Laitteen mittaussparametreja pystyy säätämään haluamallaan tavalla. Laitteessa on erilaisia suodattimia ja peilejä, joita pystyy itse vaihtelevaan tarpeen mukaan; osissa on yksilöivät viivakoodit. Laitteen ohjelmisto on helppokäyttöinen, optimaalisen aallonpituuden pystyy helposti valitsemaan ja mittausta voi seurata levynäkymästä, jossa näkyy ajantasainen mittauksen eteneminen ja signaalit kullekin mitatulle kuopalle. Ohjelmiston avulla voi tuottaa myös graafisia tuloksia ja tehdä laskelmia mittaustuloksista. EnVision on melko pienikokoinen laite ja siinä on erilaisia lisäominaisuuksia kuten ravistelu, levyn lukeminen ala- tai yläpuolelta, skannaus, liuosten annostelu (kaksi pumppua) sekä lämpötilansäätömahdollisuus. (Hyvärinen, 2009)

5.2 Mittaaminen Alpha -teknologiassa

Alpha -teknologiaa varten EnVision -laitteessa täytyy olla lisävarusteena lasermoduli. Laserin avulla pystytään virittämään luovuttajapartikkelit 680 nm aallonpituudella, minkä seurauksena määriksen muodostama emissiosignaali pystytään mittaamaan. Laservalo ohjataan mitattavaan kuoppaan erityisen jakavan peilin avulla. Valonohjainta käytetään ohjaamaan laservalo peiliin. Luovuttajapartikkelien sisältämä valonherkistäjä muuttaa lähistöllä olevat happimolekyylit virittyneeseen muotoon, jotka taas reagoivat vastaanottajapartikkelien sisältämän tioksiinijohdannaisen kanssa, mikä saa aikaan kemiluminesenssin 370 nm aallonpituudella. Tämä aktivoi partikkelien fluoroforit, jotka taas emittoivat fluo-

resenssivaloa 520 – 620 nm aallonpituudella. Signaalin pitkäkestoinen puoliintumisaika mahdollistaa mittauksen aikaerotteisuuden, joka taas vähentää taustafluoresenssin vaikutusta. Se, että viritysaallonpituus on pidempi kuin emissioaallonpituus, vähentää myös taustasignaalia, kuten myös se, että aallonpituus on pitkä ylipäättään. Alpha-määrityksissä emittoituva fluoresenssi kulkee takaisin peilimodulin ja suodattimen kautta valomonistinputkeen. Tässä polussa on myös suljin, joka on auki emissiovaiheessa, mutta sulkeutuu viritysvaiheessa, jotta laservalo ei vahingoittaisi detektoria. Detektori on sijoittunut suoraan mitattavan levyn yläpuolelle ja se lukee samanaikaisesti kun viereistä kuoppaa viritetään laservalolla. Valo kulkee pienestä aukosta detektorille. Molemmat, viritys ja emissio tapahtuvat näytteen yläpuolelta. (EnVision, 2009)

5.3 Häiritsevä signaali

Mitattaessa Alpha-teknologia-määrityksiä EnVision-laitteella, täytyy myös häiritsevä signaali huomioida. Häiritsevää signaalia kutsutaan crosstalkiksi ja sitä voi aiheuttaa kolme tekijää: viereisten näytteiden virityksen aiheuttama signaalin heikentyminen, aiemmin viritettyjen viereisten näytteiden jälkiemissio sekä mittauksen aikana emittoivat viereiset kuopat, mikäli laservalo hajaantuu mitattavan kuopan lisäksi myös viereisiin kuoppiin. Häiriösignaalin korjausavustaja mahdollistaa häiriösignaalin määrän mittaamisen ja ohjelmisto käyttää saatua häiriösignaalin mittaustulosta korjauskertoimena lopullisen mittaustuloksen laskeemisessa. (EnVision, 2009)

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

AlphaLISA –menetelmällä on aiemmin kehitetty immunogeenisyysmenetelmiä joillekin analyyteille ja lääkeaineille. Niiden tietojen pohjalta lähdettiin kehittämään opinnäytetyössä kehitettävänä olevaa menetelmää.

Menetelmän kehityksessä optimoitiin mm. partikkeleiden konjugointia, partikkeleiden ja määrittämissä käytettävän biotinyloidun TNF α :n määrittämissä konsentraatiota, miniminäytelaimennosta ja inkubaatioaikaa. Näytteen sisältämä vapaa lääke voi häiritä immunogeenisyysmäärittämissä, ja tätä voidaan estää matalan pH:n avulla. Siten testattiin ns. happodissosiaatio eli happokäsittely. Lopullisen määrittämissä karakterisoinnissa tutkittiin menetelmän ominaisuuksia lääketieteellisuuden ja lääkevalvontaviranomaisten suositusten mukaisesti. Tällöin arvioitiin mm. menetelmän herkkyyttä, toistettavuutta, saantoa ja vapaan lääkkeen sietokykyä. (Oksanen, 2012)

6.1 Materiaalit

6.1.1 Reagenssit & puskurit

Alla on taulukoituna määrittämissä käytetyt reagenssit ja puskuriliuokset. Taulukossa 1 on määrittämissä reagenssit ja taulukossa 2 määrittämissä puskurin valmistusohje. Happokäsittelyyn käytetyt puskurit on kuvattu taulukoiden 1 ja 2 alla.

Taulukko 1. Määritysreagenssit

Acceptor beads
Anti-mouse IgG acceptor beads
Anti-TNF α antibody (positive control)
Bio-TNF α
Donor beads
Optiplate 384
Streptavidin donor beads
TNF α (recombinant human)

Taulukko 2. Määrityspuskurin valmistusohje

	Pitoisuus puskurissa	Stokkireagenssi	Määrä (ml)
1	Vesi		150
2	50 mM Tris-HCl	1 M Tris-HCl liuos pH 7.75	10
3	150 mM NaCl	2 M liuos	15
4	0.5 % BSA	10% liuos	10
5	0.1% Tween-20	10% liuos	2
6	0.05% bovine γ -globulin	10% liuos	1
7	10 mg/mL dextran	Jauhe	2g
8	pH säädetään arvoon 7,75 NaOH:lla tai HCl:lla		
9	Täytetään lopulliseen 200 ml:n tilavuuteen vedellä		

Happokäsittelypuskuri: 500 mM glysiini-HCl pH 3,0.

Neutralisaatiopuskuri: sekoitetaan määrityspuskuria ja 1 M Tris-HCl pH 9,5:ää suhteessa 83:17 (tilavuus:tilavuus).

6.1.2 Luovuttaja- ja vastaanottajapartikkelien konjugointi TNF α :lla

Konjugoinnissa luovuttaja- ja vastaanottajapartikkeleiden pinnalle konjugoidaan TNF α –molekyylejä.

Aiemmissa kokeiluissa konjugoinnissa on käytetty 7,5-kertaista partikkeliylimäärää TNF α :aan verrattuna. Tämä suhde on valittu konjugoimalla erilaisilla partikkeli/TNF α -suhteilla ja valittu se vaihtoehto, josta on saatu määrityksessä paras signaali/tausta-suhde. Optimointi on perustunut oletukseen, että TNF α :n tiheys partikkelien pinnalla täytyy olla tarpeeksi korkea, jotta saadaan paras mahdollinen herkkyys. Kuitenkin on pyritty olla konjugoimatta liikaa siten, että kontrollivasta-aine sitoutuisi bivalenttisesti yhteen partikkeliin estäen partikkeli-vastaainekompleksien muodostumisen. Taulukossa 3 on kuvattu konjugoinnissa käytetyt reagenssit ja reaktiutilavuudet sellaisenaan kuin ne ovat olleet ennen menetelmän kehittämistä.

Taulukko 3. Konjugoinnin lähtötilanne. (Oksanen, 2012)

Reagenssi (konsentraatio)	Määrä reaktiossa	Määrä reaktiossa, μ l
Partikkelit (20 mg/ml)	2 mg (7,5 x ylim./TNF α)	-
Fosfaattipuskuri (0,13 M, pH 8,0)	-	917
TNF α (1 mg/ml)	0,2 mg/ml	267
Tween-20 (1 %)	0,0625 %	83,3
NaBH ₃ CN vedessä (25 mg/ml)	1,25 mg/ml	66,7
Kokonaiskonjugointiutilavuus	-	1334
CMO 0,8 M NaOH:ssa (65 mg/ml)	3,25 mg/ml	66,7

Jotta konjugointi pystyttäisiin toistamaan samanlaisena aina uudelleen, TNF α :n konsentraatio pidetään samana jokaisessa konjugoinnissa. Nykyisen konjugointiprotokollan ongelma saattaa olla partikkelikonsentraatio, joka on 1,5 mg/ml. PerkinElmerin ohjeistuksen mukaan konsentraation pitäisi olla 20 – 25 mg/ml. Menetelmänkehityksessä konjugoinnit tehtiin alla olevan PerkinElmerin suosittelemman protokollan mukaisesti. Taulukossa 4 on kuvattu konjugoinnissa käytetyt reagenssit ja reaktiutilavuudet menetelmänkehityksessä. Taulukossa 5 on ku-

vattu käytetty konjugointiprotokolla, joka perustuu PerkinElmerin "AlphaLISA® Assay Development Guide" -oppaaseen.

Taulukko 4. Konjugointireagenssit (Oksanen, 2012).

Reagenssi (konsentraatio)	Määrä reaktiossa	Määrä reaktiossa, µl
Partikkelit (20 mg/ml)	2 mg (50 x ylim./TNFα)	-
Fosfaattipuskuri (0,13 M, pH 8,0)	-	49
TNFα (1 mg/ml)	0,040 mg (0,4 mg/ml)	40
Tween-20 (1 %)	0,0625 %	6
NaBH ₃ CN vedessä (25 mg/ml)	1,25 mg/ml	5
Kokonaiskonjugointitilavuus	-	100
CMO 0,8 M NaOH:ssa (65 mg/ml)	3,25 mg/ml	5

Taulukko 5. Konjugointiprotokolla (Oksanen, 2012).

1. Reagenssit lisätään partikkelien päälle taulukon 4 mukaisessa järjestyksessä.
2. Inkuboidaan 37 °C:ssa o/n (n. 18 h valolta suojattuna).
3. Lisätään CMO.
4. Inkuboidaan 37 °C:ssa 1 h (valolta suojattuna).
5. Sentrifugoidaan 16000 g:ssä 4-10 °C:ssa ja poistetaan supernatantti.
6. Pestään 3-4 kertaa 500 µl:lla 0,1 M Tris-HCl:llä (pH 8), sentrifugointi 16000 g 4-10 °C
7. Säilytysliuoksen lisäys siten, että loppukonsentraatio on 5 mg/ml
8. Vortexoidaan ja sonikoidaan (tämä voidaan tehdä myös pesujen välillä)
Säilytysliuos: 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,4 + 0,05 % Proclin-300 / PBS pH 7,4 + 0,05 % Proclin-300

6.1.3 TNF α –biotinylointi

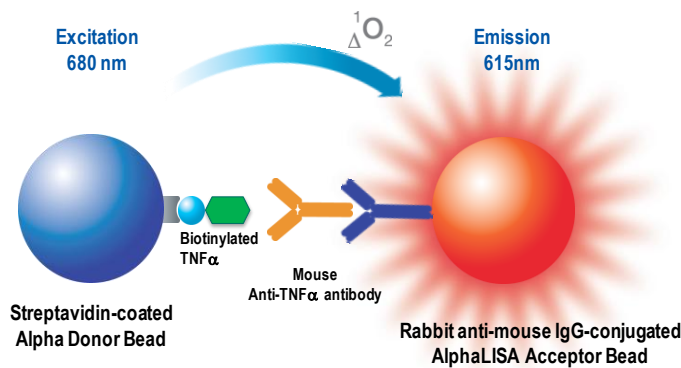
Luovuttajapartikkelit voidaan konjugoida TNF α :lla suoraan tai määrittäminen voidaan suorittaa siten, että TNF α sitoutuu biotiini-streptavidini-vuorovaikutuksen avulla. Jälkimmäistä vaihtoehtoa varten TNF α -molekyyli biotinyloidaan. Biotinyloinnissa biotiini liuotetaan dimetyyliformamidiliuokseen ja sekoitetaan TNF α :n kanssa karbonaattipuskurissa, pH 9,8 (molaarinen suhde biotiini:TNF α on 5:1 ja 50:1). Kahden tunnin inkuboinnin jälkeen (RT), proteiini puhdistetaan NAP-10 tai PD-10 kolonnilla. Proteiinia säilytetään Tris-suolaliuoksessa, pH 7,8.

Tässä tutkimuksessa käytettiin aiemmin biotinyloituja TNF α -molekyyliä. Vertailtiin sekä Syrinxin että PerkinElmerin biotinyloimia reagensseja. Kutsutaan jatkossa biotinyloitua TNF α :aa Bio-TNF α :ksi.

Bio-TNF α :n testaamisessa on käytetty PerkinElmerin suosittelemaa määrittämenetelmää, joka on kuvattu taulukossa 6.

Taulukko 6. Bio-TNF α :n määrittäprotokolla (Boissonneault, 2012).

Lisätään seuraavat reagenssit 384-well Optiplate –levylle:
1. 5 μ l biotinyloitua TNF α :aa (eri laimennoksia)
2. 5 μ l hiiren anti-TNF α vasta-ainetta, lopullinen pitoisuus kuopassa 1 nM
3. 5 μ l anti-hiiren IgG:llä päällystettyjä vastaanottajapartikkeleja, lopullinen pitoisuus kuopassa 20 μ g/ml
4. Inkuboidaan levyä 60 min 23 °C:ssa
5. 10 μ l Streptavidinilla päällystettyjä luovuttajapartikkeleja, lopullinen pitoisuus kuopassa 20 μ g/ml
6. Inkuboidaan levyä 60 min 23 °C:ssa
7. Luetaan levy sopivalla levylukijalla (sis. Alpha modulin)



Kuva 2. Bio-TNF α :n määrittämiseen käytettävän määrittymisen periaate (Boissonneault, 2012).

6.2 Menetelmät

Kappaleessa 6.2.1 on taulukoitu käytettyjä määrittymisprotokollia. Menetelmänkehityksessä on käytetty seulonta- ja varmistusmäärittymisprotokollia, mutta varsinaista näytteiden analysointia ei menetelmänkehitykseen kuulu.

6.2.1 Määrittymisprotokollat

Menetelmänkehityksen alkutilanteessa kaikki mittaukset tehtiin kahtena rinnakkaisena 384-kuoppaisella mikrotiiterilevyllä. Inkubaatiovaiheet tehtiin pimeässä ilman ravistelua määrittelyissä lämpötiloissa (RT tai +4 °C). Partikkelilaimennokset tehtiin joko määrittymispuiskuriin tai neutralisointipuskuriin. Happokäsittely tehtiin glysiini-suolahappoliuoksella (pH 3,0).

Alkuperäisessä protokollassa on partikkelilaimennoksiin käytetty AlphaLISA immunoassay -puiskuria. Analyysejä on kahta tyyppiä, suora määrittymis eli ”direct assay” (directly conjugated donors), jossa luovuttajapartikkelit on suoraan konjugoitu TNF α :lla sekä SA-määrittymis eli ”SA-assay” (streptavidin conjugated donors), jossa luovuttajapartikkelit on konjugoitu streptavidiinilla. Taulukoissa 7, 8

ja 9 on eriteltyä alkutilanteessa käytetyt määrittämisprotokollat: seulontamäärittämis (suora määrittämis) ja varmistusmäärittämis sekä SA-määrittämis.

Taulukko 7. Seulontamäärittämis (Oksanen, 2012).

Seulontamäärittämis (suora määrittämis)
1. Näyte 5 µl
2. Vastaanottajapartikkelit (7,5 x) 80 mg/ml, 20 µl / kuoppa
3. Luovuttajapartikkelit (7,5 x) 80 mg/ml, 20 µl / kuoppa
4. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua)
5. Mitataan

Taulukko 8. Varmistusmäärittämis (Oksanen, 2012).

Varmistusmäärittämis
1. Näyte 5 µl
2. Vapaa TNFα 200 ng / kuoppa, 5 µl (valmistetaan 40 µg/ml liuos)
3. Inkuboidaan 30 min
4. Vastaanottajapartikkelit (7,5 x) 80 mg/ml, 20 µl / kuoppa
5. Luovuttajapartikkelit (7,5 x) 80 mg/ml, 20 µl / kuoppa
6. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua)
7. Mitataan

Taulukko 9. SA-määrittämis (Oksanen, 2012).

SA -määrittämis
1. Näyte 5 µl
2. Vastaanottajapartikkelit sekä Bio-TNFα, 20 µl / kuoppa
3. Inkuboidaan 1 h (RT, ilman ravistelua)
4. SA -luovuttajapartikkelit, 25 µl / kuoppa
5. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua)
6. Mitataan

6.3 Menetelmänkehityksen suorittaminen

Menetelmän kehityksessä tutkittiin erilaisia parametreja. Kehitystä varten tehtiin suunnitelma siitä, mitä parametreja oli aikomus testata.

6.3.1 Konjugointi 1

Vastaanottaja- ja luovuttajapartikkelien konjugointi 1 suoritettiin kuten suosittelussa protokollassa kappaleessa 6.1.2 taulukossa 2 on kuvattu. Konjugoinnin vaiheet ovat partikkelien pesu, konjugointi, inkubointi, vapaiden reaktiivisten ryhmien blokkaukset, puhdistus ja säilytys.

Kummatkin partikkelit konjugoitiin erillisinä reaktioina omissa putkissaan. Ennen reagenssien lisäystä partikkeliliuos pestiin PBS –liuoksella. Partikkeleita mitattiin eppendorf- putkiin 40 µl eli 2 mg, kun partikkeliliuosten konsentraatio on 50 mg/ml. Partikkelien päälle lisättiin 40 µl PBS –liuosta ja sekoitettiin kevyesti. Putkia sentrifugoitiin mikrosentrifuugilla 15 minuuttia 16000 g:ssä (+ 5 °C:ssa). Sentrifugoinnin jälkeen poistettiin supernatantti ja lisättiin reagenssit pelletin päälle. Jokaisen sentrifugoinnin ja reagenssinlisäyksen jälkeen liuosta myös sonikoitiin putket jäissä, jotta pelletti saatiin hajoamaan.

Puhdistusvaiheessa jouduttiin viimeisen sentrifugoinnin jälkeen sentrifugoimaan vielä 5 min 17000 g:ssä, koska supernatanttiin jäi partikkeleita. Koska putkia pidettiin sentrifuugissa 45 min viimeisen pesun jälkeen, sentrifugoitiin niitä vielä uudelleen 5 min ennen säilytysliuoksen lisäämistä.

6.3.2 Bio-TNF α :n laatu

Bio-TNF α :n laatua testattiin tekemällä sekä Syrinxillä että PerkinElmerillä biotinyloidusta TNF α :sta laimennossarjat (0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM lopullisessa määritystilavuudessa, 25 µl). Käytettiin määrittämisessä PerkinElmerin suosittelemaa määritysmenetelmää, joka on kuvattu kappaleessa 6.1.3, taulukossa 4. Tässä määrittämisessä käytettiin streptavidiinilla päällystettyjä luovuttajapartikke-

leja, joihin biotinyloitu TNF α kiinnittyy sekä hiiren anti-TNF α vasta-ainetta. Anti-hiiri IgG:llä konjugoidut vastaanottajapartikkelit tunnistavat hiiren anti-TNF α vasta-aineen tuoden partikkelit lähelle toisiaan. Anti-TNF α vasta-aineen (hiiren monoklonaalinen vasta-aine TNF α :aa vastaan) puskuri vaihdettiin ennen määrittystä PBS-Proclin –puskuriin NAP-5 –pylväällä, jolloin varmistettiin, ettei puskuri sisällä häiritseviä aineita. Vasta-aineen pitoisuus ennen puskurinvaihtoa oli 2 mg/ml ja spektrofotometrillä mitattu pitoisuus puskurinvaihdon jälkeen oli 0,220 mg/ml. Vasta-aine laimennettiin määrittystä varten puskuriliuokseen pitoisuuteen 5 nM, jolloin se on lopullisessa määrittäksessä 1 nM. Määrittäksen periaate käy ilmi kuvasta 2.

6.3.3 Bio-TNF α :n konsentraation optimointi

Määrittäys tehtiin SA-määrittäysprotokollalla eli näytteenä oli anti-TNF α -vasta-aine (pitoisuus 10 μ g/ml), mutta vastaanottajapartikkeleina oli TNF α :lla konjugoidut partikkelit, joiden kanssa samaan aikaan lisättiin Bio-TNF α -reagenssi ja luovuttajapartikkeleina oli streptavidinilla päällystetyt SA-luovuttajapartikkelit. Taulukossa 10 on kuvattu käytettävä SA-määrittäysprotokolla.

Taulukko 10. SA-määrittäysprotokolla.

SA -määrittäys
1. Näyte 5 μ l
2. Vastaanottajapartikkelit (25 μ g/ml) sekä Bio-TNF α 0,01-1000 nM kuopassa, 20 μ l / kuoppa
3. Inkuboidaan 1 h (RT, ilman ravistelua)
4. SA –luovuttajapartikkelit (80 μ g/ml), 25 μ l / kuoppa
5. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua, pimeässä)
6. Mitataan

6.3.4 TNF α :n biotinylointi

Koska Syrinxin biotinyloitu TNF α –reagenssi antoi melko matalaa signaalia määrittäksessä verrattuna PerkinElmerin reagenssiin, päätettiin biotinyloida uudelleen käyttämällä 50–kertaista biotiiniylimäärää aiemman viisinkertaisen ylimäärän sijaan. TNF α :aa biotinyloitiin 0,25 mg eli 250 μ l reagenssia, jonka pitoisuus on 1 mg/ml. Biotinylointi tehtiin 50 mM karbonaattipuskurissa, pH:ssa 9,8; reagenssin sekaan lisättiin siis 250 μ l 100 mM karbonaattipuskuria. Mitattiin seoksen proteiinipitoisuus spektrofotometrillä ennen reaktioa ja saatiin tulokseksi 0,48 mg/ml. Laskettiin TNF α :n määrä mooleina, joka on 13,8 nmol, jolloin biotiinia haluttiin reaktioon 50–kertainen määrä eli 688,5 nmol. 10 mM biotiiniliuosta (biotini dimetyyliformamidiliuoksessa) lisättiin täten liuokseen 69 μ l. Reaktioseosta inkuboitiin kaksi tuntia huoneenlämmössä. Reaktion jälkeen reagenssi puhdistettiin 50 mM TSA –liuoksella NAP-5 ja NAP-10 –pylväillä. Reagenssin pitoisuus mitattiin jälleen spektrofotometrillä. Pitoisuudeksi saatiin 0,161 mg/ml. Lisättiin reagenssin joukkoon säilöntäaineeksi DTPA-puhdistettua BSA:ta ja säilöttiin +2...+8 °C:seen.

6.3.5 Biotinyloidun TNF α :n laatu

Testattiin uuden biotinyloidun TNF α :n laatu määrittäksessä. Toistettiin määrittäminen kuten aiemmin tehty Bio-TNF α :n konsentraatio ja laatu –määrittäminen, kpl 6.2.2.

6.3.6 Uuden Bio-TNF α :n konsentraatio

Testattiin jälleen SA-määrittäksellä uutta Bio-TNF α :aa kuten aiemminkin kappalessa 6.3.3, testattiin parhaiten määrittäksessä toimivaa Bio-TNF α –konsentraatiota. Vertailun vuoksi määrittäksessä oli mukana myös PerkinElmerin reagenssi. Bio–reagensseista tehtiin laimennossarjat samoilla pitoisuuksilla kuin aiemminkin.

6.3.7 Partikkelien konsentraatiot

Määritettiin sopivinta konjugoitujen partikkelien konsentraatiota valmistamalla sekä vastaanottaja- että luovuttajapartikkeleista laimennossarjat ja määrittämällä ne suoralla määritysmenetelmällä, joka on kuvattu taulukossa 11. Laimennossarjoissa pitoisuudet olivat 0, 20, 40, 60 ja 80 µg/ml lopullisessa määritystilavuudessa. Näytteenä oli 0 ja 10 µg/ml anti-TNFα kontrollivasta-ainetta. Partikkelipitoisuudet testattiin myös ristiin toistensa kanssa siten, että saatiin testattua kaikki mahdolliset yhdistelmät.

Taulukko 11. Suora määritysmenetelmä.

Suora määrittäminen
1. Näyte 5 µl
2. Vastaanottajapartikkelit (50 x), 20 µl / kuoppa
3. Luovuttajapartikkelit (50 x), 25 µl / kuoppa
4. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua, pimeässä)
5. Mitataan

6.3.8 Pienin tarvittava seerumilaimennos

Koska mitattava näyte tulee olemaan seerumia ja seerumin komponentit saattavat häiritä määrittäystä, testattiin pienin tarvittava seerumin laimennos, joka vaaditaan, jotta seerumi ei enää häiritse määrittäystä. Määrittäys tehtiin suoralla määrittäysmenetelmällä kuten taulukossa 11, partikkelien pitoisuudet olivat 20 µg/ml määrittäystilavuudessa. Kontrollivasta-aineesta eli anti-TNFα-Ab:sta tehtiin kuusi laimennossarjaa pitoisuuksin 0; 0,016; 0,08; 0,4; 2 ja 10 µg/ml matriiseihin joissa oli eri pitoisuudet seerumia. Seerumipitoisuudet olivat 0; 3,125; 12,5; 25; 50 ja 100 % seerumia laimennettuna määrittäyspuskuriin.

6.3.9 Inkubaatioaika

Testattiin eri inkubaatioaikoja suoralla määritysmenetelmällä kuten taulukossa 11. Inkubaatioajat olivat 0,5; 1; 2 ja 3 h RT sekä o/n + 4 °C:ssa. Valmistettiin kontrollivasta-aineesta laimennossarja pitoisuuksin 0; 0,016; 0,08; 0,4; 2 ja 10 µg/ml, jota pipetoitiin viidelle eri levyille ja inkuboitiin levyjä eri aikoja. Partikkelien pitoisuudet olivat 20 µg/ml määritystilavuudessa.

6.3.10 Happokäsittely

Testattiin happokäsittelyn vaikutusta määritykseen. Käytettiin edelleen suoraa määritysmenetelmää, mutta lisättiin näytteen päälle happokäsittelyliuosta, inkuboitiin ja lisättiin vastaanottajapartikkelit neutralisointiliuoksessa sekä luovuttajapartikkelit puskuriliuoksessa ja inkuboitiin. Valmistettiin jälleen kontrollivasta-aineesta laimennossarja pitoisuuksin 0; 0,016; 0,08; 0,4; 2 ja 10 µg/ml ja käytettiin partikkelipitoisuuksina 20 µg/ml määritystilavuudessa. Määritysprotokolla on kuvattu taulukossa 12.

Taulukko 12. Happokäsittelyprotokolla

Suora määrittely happokäsittelyllä
1. Näyte 5 µl
2. Happokäsittelyliuos 20 µl
3. Inkuboidaan 60 min (RT, ilman ravistelua)
4. Vastaanottajapartikkelit (50 x), 25 µl / kuoppa
5. Luovuttajapartikkelit (50 x), 50 µl / kuoppa
6. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua, pimeässä)
7. Mitataan

6.3.11 Lääkkeensietokyky sekä happokäsittely

Testattiin määrittämisen lääkkeensietokykyä lisäämällä näytteen sekaan vapaata lääkettä eli TNF α :aa (varmistusmääritys) pitoisuuksin 0; 0,0032; 0,016; 0,08; 0,4 ja 2 $\mu\text{g/ml}$, jonka jälkeen inkuboitiin. Sitten lisättiin happokäsittelyliuos/puskuriliuos ja inkuboitiin sekä lopuksi lisättiin partikkelit 25 μl 20 $\mu\text{g/ml}$ määritystilavuudessa. Valmistettiin sekä kontrollivasta-aineesta että vapaasta lääkkeestä laimennossarjat. Kontrollivasta-aineella käytettiin samoja pitoisuuksia kuin aiemminkin 0; 0,016; 0,08; 0,4; 2 ja 10 $\mu\text{g/ml}$ ja vapaalle lääkkeelle pitoisuudet olivat 0; 0,128; 0,64; 3,2; 16 ja 80 $\mu\text{g/ml}$ määritystilavuudessa. Happokäsittelyn vaikutusta testattiin tekemällä sama määritys sekä happokäsittelyllä että ilman (happokäsittelyliuoksen tilalla puskuriliuos), käytetty protokolla on kuvattu taulukossa 13.

Taulukko 13. Varmistusmääritysprotokolla

Suora varmistusmääritys happokäsittelyllä
1. Näyte 5 μl
2. Vapaa lääke eli TNF α 25 μl
3. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua)
4. Happokäsittelyliuos tai puskuriliuos 20 μl
5. Inkuboidaan 60 min (RT, ilman ravistelua)
6. Vastaanottajapartikkelit (50 x), 25 μl / kuoppa
7. Luovuttajapartikkelit (50 x), 25 μl / kuoppa
8. Inkuboidaan 30 min (RT, ilman ravistelua, pimeässä)
9. Mitataan

6.3.12 Cut point

Cut point -määrittämissä määritettiin 50 kpl terveen ”lääkeainetta saamattoman” populaation individuaaliseerumeita sekä suoralla määritysmenetelmällä että suoralla varmistusmääritysmenetelmällä. Varmistusmääritysmenetelmä on ku-

vattu taulukossa 13, suorassa määritysmenetyssä (taulukko 12) vapaan lääkkeen tilalle pipetoidaan puskuriliuosta. Cut point –määrityksiä tehtiin kolme samanlaista määritystä. Määrityksiin saatiin vaihtelua käyttämällä eri konjugointieriä, mutta mikäli myöhemmin on mahdollista, voitaisiin määritykset toistaa vielä toisen määrittäjän tekeminä. Cut point -määritysten perusteella määritettiin cut point, joka on määrityskohtainen signaaliraja, jolla positiiviset näytteet havaitaan.

6.3.13 Konjugointi 2 sekä testaus

Koska konjugoidut partikkelit alkoivat olla vähissä, valmistettiin niitä lisää. Valmistettiin suurempi määrä kuin ensimmäisellä konjugointikerralla, jotta partikkelit riittäisivät pidempään. Konjugointi suoritettiin muuten samoin kuin edellä (kpl 6.2.1), mutta reagenssimääriä kasvatettiin samassa suhteessa.

Konjugoitujen partikkelien testaus suoritettiin määrittämällä laimennossarja kontrollivasta-aineesta. Laimennossarja määritettiin käyttämällä sekä vanhoja että uusia konjugoituja partikkeleita (määrityspytokolla kuvattu taulukossa 13).

6.3.14 Konjugointi 3 sekä testaus

Koska konjugoinnin 2 partikkelit eivät toimineet määrityksessä, konjugoitiin partikkeleita uudelleen. Jo ennestään oli tiedossa, että konjugoinnin toistaminen saattaa olla hankalaa niin, että partikkelit toimisivat täysin samoin kuin aiemmin. Nyt huomattiin, että kun reagenssien määriä kasvatettiin, eivät partikkelit toimineet, joten päätettiin toistaa konjugointi täysin samoin kuin ensimmäisellä kerralla. Samanlaisia eriä tehtiin samalla kertaa kaksi, jotta partikkelit riittäisivät pitempään.

Konjugoitujen partikkelien testaus suoritettiin määrittämällä laimennossarja kontrollivasta-aineesta. Laimennossarja määritettiin käyttämällä sekä molempia vanhoja että uusia konjugoituja partikkeleita (määrityspytokolla taulukossa 13).

6.3.15 Herkkyys, lineaarisuus ja koukkuefakti

Määritykset tehtiin taulukon 13 protokollan mukaisesti.

Herkkyuden määrittämistä varten valmistettiin kuusi erillistä laimennossarjaa kontrollivasta-aineesta pitoisuuksin 0; 0,00152; 0,00457; 0,0137; 0,0412; 0,123 0,37; 1,11; 3,33; 10; 30 ja 90 µg/ml. Laimennoksia tehtiin niin paljon, että päästiin negatiiviseen tulokseen saakka eli taustasignaalin tasolle (alle cut point). Tulosten avulla laskettiin annos-vaste –kuvaajilta pitoisuus cut point -signaalin kohdalla, joka määrittelee määrityksen herkkyuden. Määrityksen herkkyys on sama kuin määrityksessä käytettävän LoQC:n pitoisuus. Herkkyuden määrittämiseksi pitäisi valmistaa yhteensä 12 laimennossarjaa ja määrittäjiä pitäisi olla kaksi. Tässä työssä ei ollut kuitenkaan mahdollista käyttää kahta määrittäjää.

Lineaarisuuden määrittämistä varten valmistettiin yhdestä herkkyuden määrittämiseen valmistetusta korkeimmasta laimennoksesta laimennos myös puskuri-liuokseen. Verrattiin sekä seerumiin, että puskuriin valmistettuja annos-vaste –kuvaajia ja tarkkailtiin niiden tuloksia verrattuna toisiinsa sekä sitä, kasvaako signaali määritysalueella analyyttipitoisuuden kasvaessa. Lisäksi korkean näytteen signaalin pitäisi olla selvästi cut pointin yläpuolella, jotta voitaisiin todeta laimennosten lineaarisuus. Jos puskuriin ja seerumiin valmistetut laimennokset antavat erilaisen vasteen, saattaa kyseessä olla matriisiefakti, jolloin näyte-laimennokset olisi hyvä valmistaa seerumiin.

Koukkuefektin määrittämiseksi laimennossarjoissa oli mukana korkea näytepitoisuus. Mikäli määrityksessä olisi koukkuefakti, voisi käydä niin, että erittäin korkea näytepitoisuus antaisikin matalan signaalin. Näyttäisi siis siltä, että näytteen vasta-ainepitoisuus on pieni, vaikka se olisi todellisuudessa suuri. Riskinä on väärin negatiivisten tulosten saaminen, mikäli signaali on cut pointin alla. Koukkuefektin määrittämisellä voidaan varmistaa, että korkea vasta-ainepitoisuus antaa myös korkeaa signaalia ja voidaan arvioida, mikä on väärin negatiivisten tulosten riski.

6.3.16 Määrityslevyjen vertailu

Koska määrittämisalavuus 100 µl oli melko suuri käytössä olleella Optiplate 384 –levyllä, testattiin, voidaanko levytyyppi vaihtaa. Kokeiltiin tilavampikuoppaista 96 ½ Area Plate –levyä. Valmistettiin kontrollivasta-aineesta laimennossarja, joka määritettiin kummallakin levytyypillä varmistusmääritysprotokollan (taulukko 13) mukaisesti.

6.3.17 Saanto

Määritettiin saanto (varmistusmääritysprotokollan, taulukko 13 mukaisesti) laimentamalla kontrollivasta-ainetta kymmeneen individuaaliseerumiin sekä puskuriliuokseen. Käytettiin pitoisuuksina LoQC ja HiQC -pitoisuuksia. HiQC-pitoisuuden pitäisi olla lähellä menetelmän ylärajaa ja pitoisuudeksi valittiin 5.0 µg/ml. LoQC-pitoisuus määritettiin herkkyysmäärityksessä, mutta koska haluttiin varmistua pitoisuudesta, valmistettiin tähän testiin vielä kolme eri LoQC-pitoisuutta 0,05; 0,1 ja 0,2 µg/ml. Seeruminäytteitä verrattiin puskuriin valmistettuihin näytteisiin, minkä perusteella laskettiin saanto-%.

6.3.18 Herkkyys

Herkkyuden määrittämisessä olisi hyvä olla kaksi määrittäjää. Koska se ei tässä tapauksessa ollut mahdollista ja haluttiin kuitenkin saada riittävästi tuloksia LoQC:n määrittämistä varten, sama määrittäjä valmisti vielä toiset kuusi laimennossarjaa kuten aiemminkin kappaleessa 6.2.15. Koska herkkyuden arviointiin ei tarvita korkeita pitoisuuksia, jotka olivat aiemmin mukana muita testejä varten, valmistettiin laimennossarjat aloittaen matalammista pitoisuuksista. Esilaimennokset tehtiin kuitenkin samoin pitoisuuksin kuin aiemminkin (10, 30 ja 90 µg/ml), jotta laimennokset pysyisivät samankaltaisina ja kuusi laimennossarjaa valmistettiin edelleen esilaimennoksista pitoisuuksin 0; 0,00152; 0,00457; 0,0137; 0,0412; 0,123 0,37; 1,11 ja 3,33 µg/ml. Jokaiselle 12:lle kuvaajalle piir-

rettiin suora ja suoran yhtälön perusteella laskettiin vasta-ainepitoisuus cut point -signaalin kohdalla. Tästä edelleen laskettiin määrittelyn herkkyys.

6.3.19 LoQC ja HiQC

LoQC ja HiQC ovat mahdollisissa tulevissa tutkimuksissa käytettäviä kontrollinäytteitä määrittelyjen hyväksynnän arviointia varten. Kontrollit valmistettiin kontrollivasta-aineesta ja niiden pitoisuudet on määritetty edellä. Valmistettiin seuraavia tarkkuusmäärittelyjä varten LoQC ja HiQC -näytteet. HiQC -pitoisuudeksi oli jo aiemmin valittu pitoisuus 5,0 µg/ml ja LoQC-pitoisuudeksi määritettiin herkkyysmäärittelyssä 0,1 µg/ml. Näytteistä valmistettiin kolme erillistä laimennoserää seerumiin. Erät jaettiin valmiiksi sopiviin käyttöeriin ja pakastettiin -20 °C:seen.

6.3.20 Tarkkuus ja häiriöalttius

Tarkkuusmäärittelyssä analysoitiin etukäteen valmistettujen LoQC ja HiQC -näytteiden rinnakkaisnäytteitä sekä seulonta- että varmistusmäärittelyssä (protokollat taulukoissa 12 ja 13), varmistusmäärittelyssä vapaan lääkkeen pitoisuus näytteessä oli 200 µg/ml. Määrittelyssä oli mukana myös negatiivinen kontrolli. Myös tarkkuusmäärittelyssä oli tarkoitus olla kaksi eri tekijää, mutta koska se ei ollut mahdollista, aiheutettiin määrittelyyn tarkoituksella pientä vaihtelua vaihtelemalla viimeisen inkuboinnin kestoa (27, 30 tai 33 min). Määrittelyssä oli myös käytössä eri konjugointierät. Siten samalla testattiin myös määrittelyn häiriöalttiutta.

6.3.21 Lääkkeensietokyky

Lääkkeensietokyky laskettiin uudelleen alkuperäisistä tuloksista (kappale 6.3.11), kun cut point oli määritetty käyttäen määritettyä cut point -arvoa.

7 TULOKSET JA TARKASTELU

7.1 Konjugointi 1

Konjugoinnin onnistuminen on testattu partikkelien konsentraatio -määrityksen yhteydessä kappaleessa 7.6. Konjugoidut partikkelit toimivat määrityksessä hyvin ja partikkelimäärää muuttamalla saatiin eroa signaaliin.

7.2 Bio-TNF α :n laatu

Bio-TNF α :n konsentraatiota määritettiin tekemällä sekä PerkinElmerin (PE) että Syrinxin (SR) biotinyloidusta TNF α :sta laimennossarjat ja vertaamalla signaali-tasoja (määritysprotokolla taulukossa 6). Laimennosten pitoisuudet olivat 0,01; 0,1; 1; 10 ja 100 nM lopullisessa reaktiossa. Molemmat sarjat mitattiin sekä vasta-aineen kanssa että ilman (blank-näyte). Syrinxissä valmistettu Bio-TNF α antoi heikompaa signaalia verrattuna PerkinElmerin vastaavaan reagenssiin. Jatkettiin vielä seuraavassa määrityksessä samoilla reagensseilla. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu.

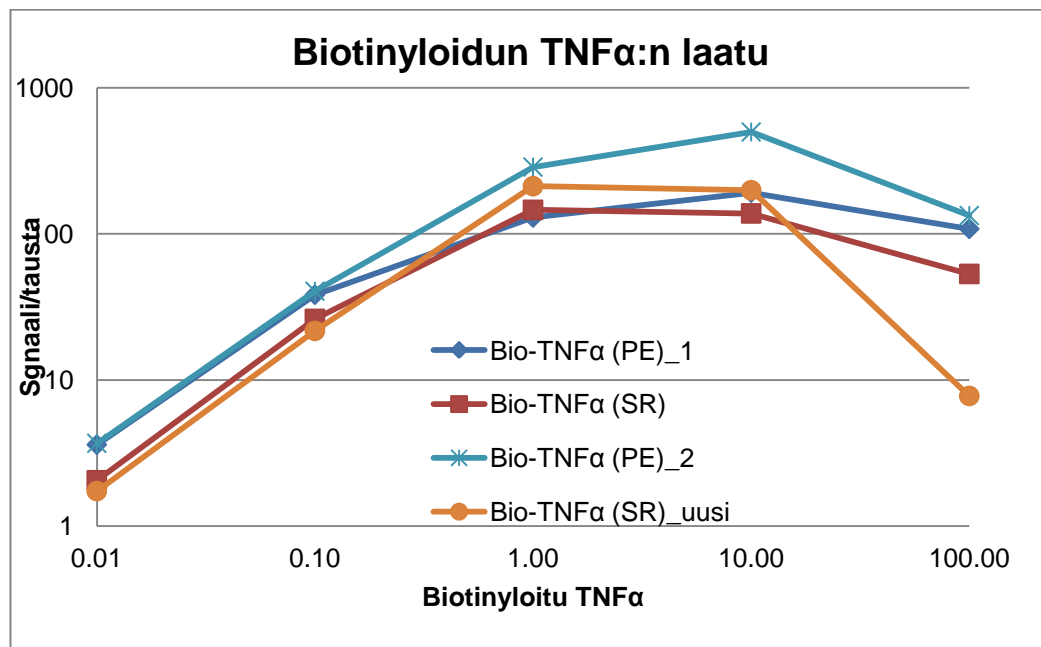
7.3 Bio-TNF α :n konsentraatio

Määritys tehtiin käyttämällä SA-protokollaa (taulukko 10), vastaanottajapartikkeleina käytettiin menetelmänkehityksessä konjugoituja partikkeleita, bio-reagensseina sekä PerkinElmerin että Syrinxin reagenssia ja luovuttajapartikkeleina PerkinElmerin valmistamaa SA-luovuttajapartikkelireagenssia. Biotiinireagensseista valmistettiin jälleen laimennossarjat samoin pitoisuuksin kuin edellisessä testissä.

Syrinxin biotinyloitu TNF α antoi immunogeenisyysmäärityksessä huomattavasti heikompaa signaali / tausta –suhdetta kuin PerkinElmerin biotinyloima TNF α . Oletettavasti Syrinxillä biotinyloidussa TNF α –reagenssissa on kiinni liian vähän biotiinia. Reagenssi on biotinyloitu 5-kertaisella biotiiniylimäärällä. TNF α päätettiin biotinyloida uudelleen nostamalla biotiiniylimäärää. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu.

7.4 Uuden biotinyloidun TNF α :n laatu

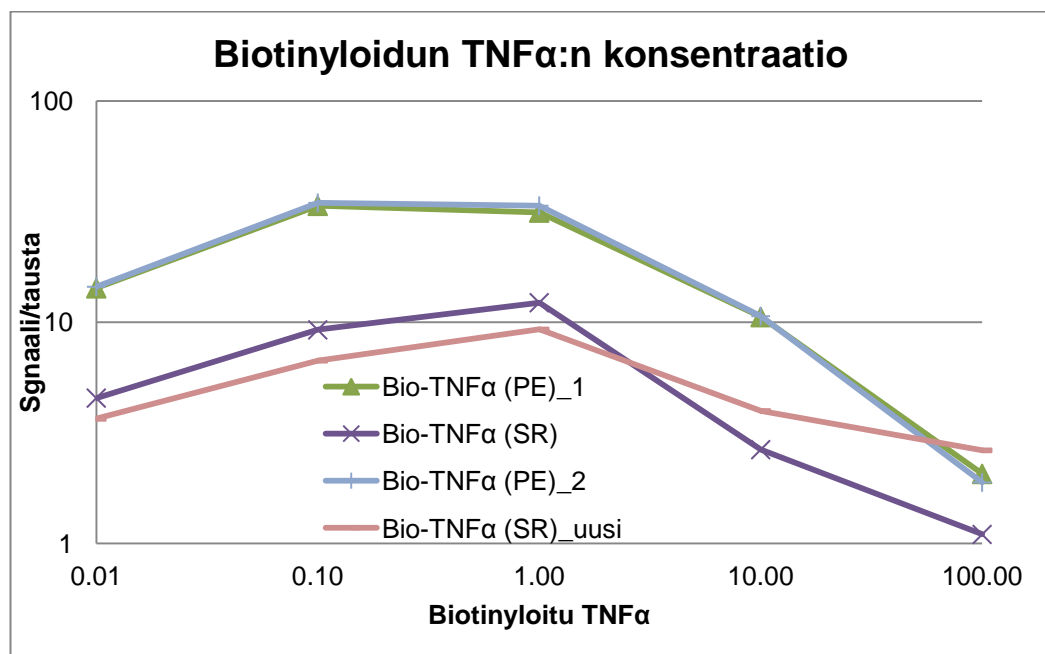
Uusi biotinyloitu reagenssi antoi määrityksessä (protokolla taulukossa 6) hieman parempaa signaalia kuin vanha reagenssi, mutta siltikään signaalit eivät olleet yhtä korkeita kuin PerkinElmerin reagenssilla. Mahdollisesti biotiinia oli edelleen kiinnittynyt liian vähän. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu. Kuvassa 3 on kuvattuna Bio-TNF α :n laatu –määritysten tulokset. Kuvassa on vertailussa sama PerkinElmerin bioreagenssi kahdessa eri määrityksessä sekä vanha ja uusi Syrinxin Bio-reagenssi eri määrityksissä.



Kuva 3. Biotinyloidun TNF α :n laatu.

7.5 Uuden Bio-TNF α :n konsentraatio

Määrittämissä paras signaali / tausta –suhte saatiin Bio-TNF α -konsentraatiolla 1 nM sekä PerkinElmerin että Syrxin reagenssille, joten määrittämissä tulisi jatkaa tällä bio-pitoisuudella. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaali sekä signaali/tausta-vertailu. Kuvassa 4 on kuvattuna Bio-TNF α :n konsentraatio-määrittämissä tulokset. Kuvassa on vertailussa sama PerkinElmerin reagenssi kahdessa eri määrittämissä sekä vanha ja uusi Syrxin Bio-reagenssi eri määrittämissä. PerkinElmerin biotiinireagenssi näyttää toimivan huomattavasti paremmin. SA-määrittämissä optimointia ei jatkettu tämän pidemmälle.



Kuva 4. Biotinyloidun TNF α :n konsentraatio.

7.6 Partikkelien konsentraatiot

Partikkelien konsentraatioita testattiin suoralla määrittämissämenetelmällä (taulukko 7) eri pitoisuuksilla. Kontrollivasta-aineen, anti-TNF α Ab, pitoisuus oli 0 ja 10 μ g/ml. Taulukossa 14 on listattuina saadut tulokset signaali/tausta-vertailun muodossa. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaali.

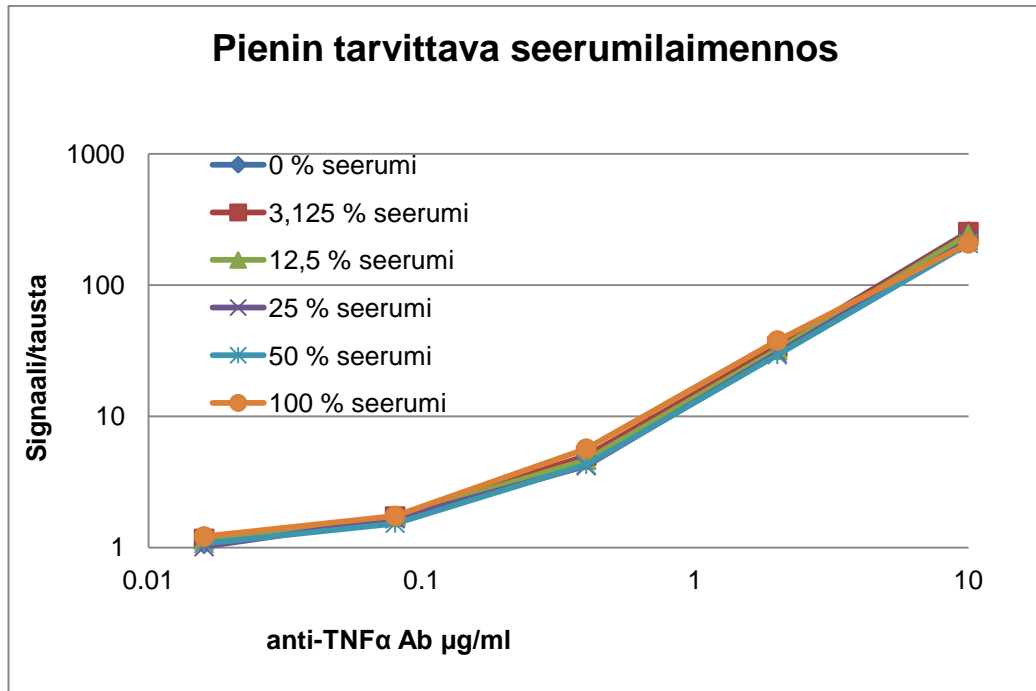
Taulukko 14. Partikkelikonsentraation optimointi.

Luovuttaja	0 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml
Vastaanottaja					
0 µg/ml	2,4	0,7	0,8	0,5	0,2
20 µg/ml	1,6	328	317	313	255
40 µg/ml	1,4	188	201	174	159
60 µg/ml	1,2	87,0	82,8	75,3	66,0
80 µg/ml	1,1	31,8	38,9	31,7	N/A

Korkein signaali/tausta-suhde saavutettiin kummallekin partikkelille konsentraatiolla 20 µg/ml, jota käytettiin seuraavissa määrittelyissä.

7.7 Pienin tarvittava seerumilaimennos

Kuvassa 5 on kuvattu tulokset kuvaajan muodossa. Liitteeseen 1 on koottu raakaisignaalit sekä signaali/tausta-vertailu. Lopullisessa määrittelyssä näyte laimenee 5 %:ksi (näytetilavuus 5 µl 100 µl:n määrittelytilavuudessa). Kuvassa 5 100 % seerumi kuvaa tätä tilannetta (seeruminäytettä pipetoidaan määrittelyyn 5 µl ilman esilaimentamista).

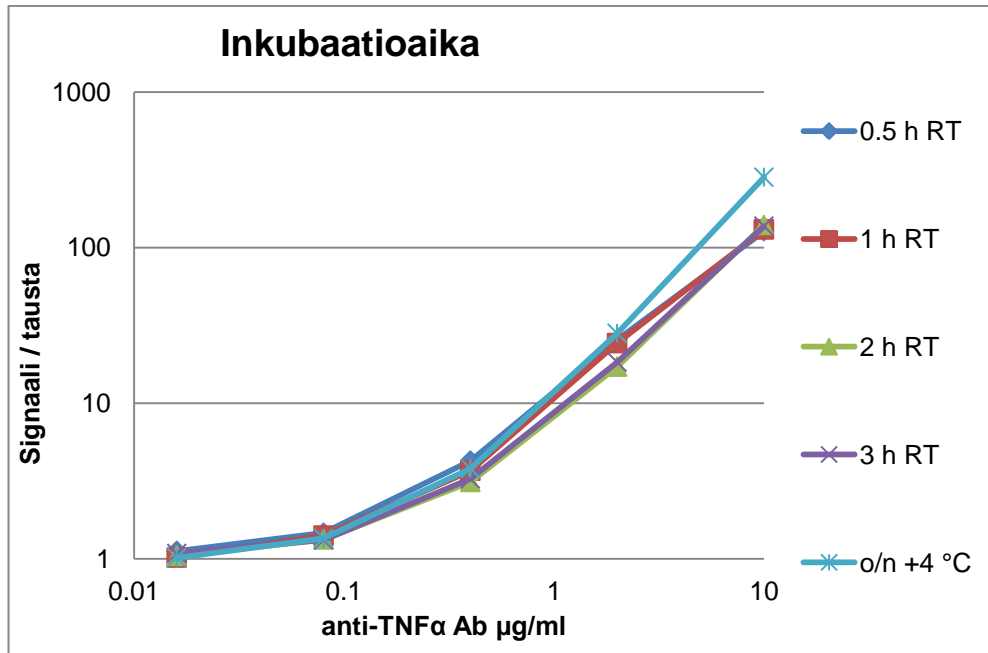


Kuva 5. Pienin tarvittava seerumilaimennos.

Seerumilaimennoksella ei ole niin suurta vaikutusta, että seerumin määrä muuttaisi ratkaisevasti määrittelyn toimintaa, joten voitiin jatkaa 100 % seerumimäärällä ilman näytteen esilaimentamista.

7.8 Inkubaatioaika

Kuvassa 6 on kuvattu tulokset kuvaajan muodossa. Liitteeseen 1 on koottu raakasiinaalit sekä signaali/tausta-vertailu.

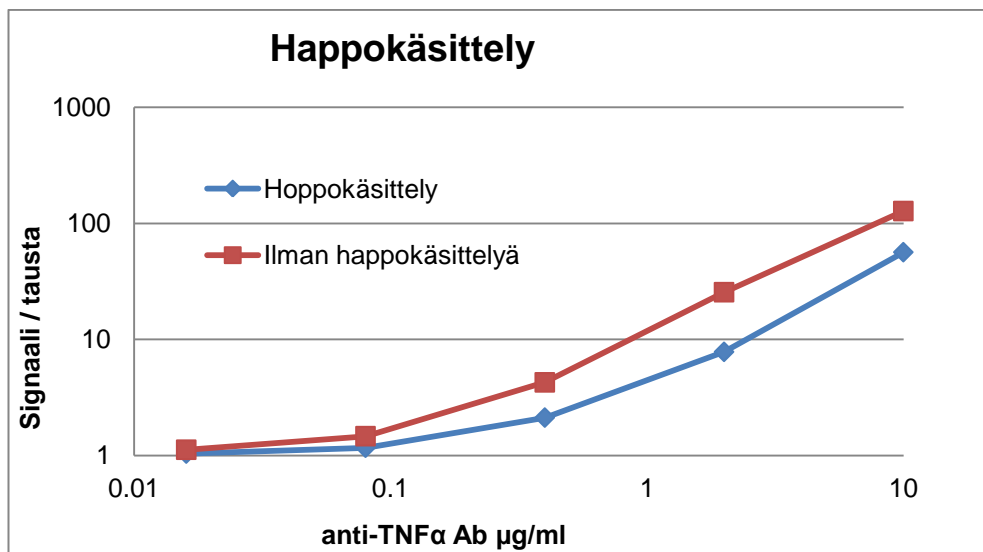


Kuva 6. Inkubaatioaika.

Inkubointiaika vaikuttaa hieman tuloksiin, mutta millään ajalla ei saatu ratkaisevasti parempaa tulosta kuin 0,5 h:n inkuboinnilla, joten jatkettiin edelleen sillä.

7.9 Happokäsittely

Kuvassa 7 on kuvattu tulokset kuvaajan muodossa. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu.

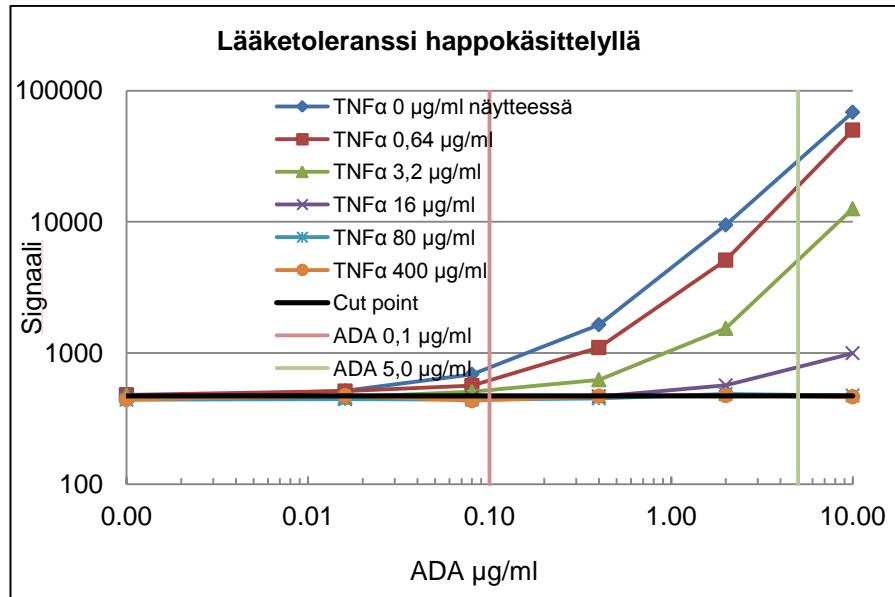


Kuva 7. Happokäsittely.

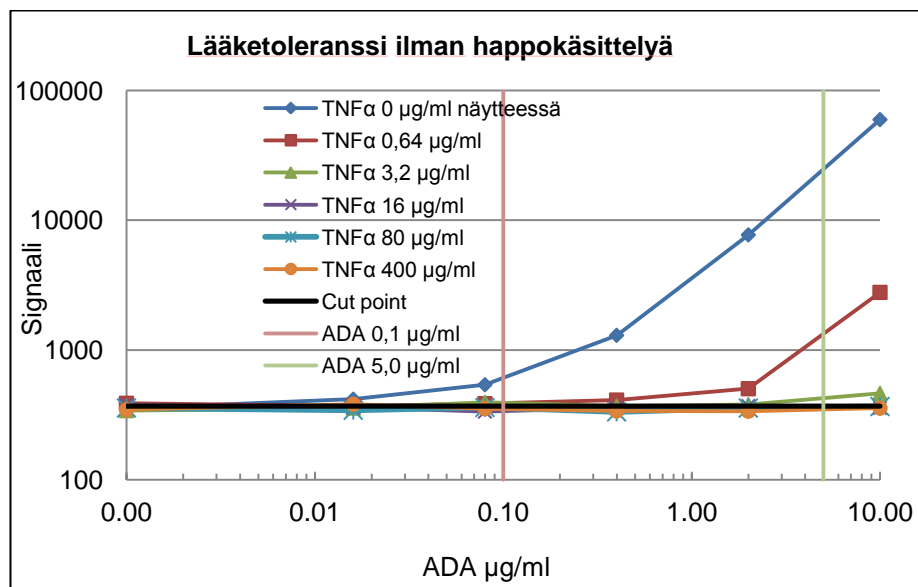
Kun määritystä verrattiin edellisiin tuloksiin, happokäsittelystä ei ainakaan vaikuttanut olevan haittaa määrittäksessä. Määrittäksen tilavuus kuitenkin muuttui 50 μl :sta 100 μL :aan, joten tuloksia ei voida suoraan verrata toisiinsa. Jatkettiin siis happokäsittelyn tutkimista seuraavissa määrittäksissä.

7.10 Vapaan lääkkeen sietokyky ja happokäsittely

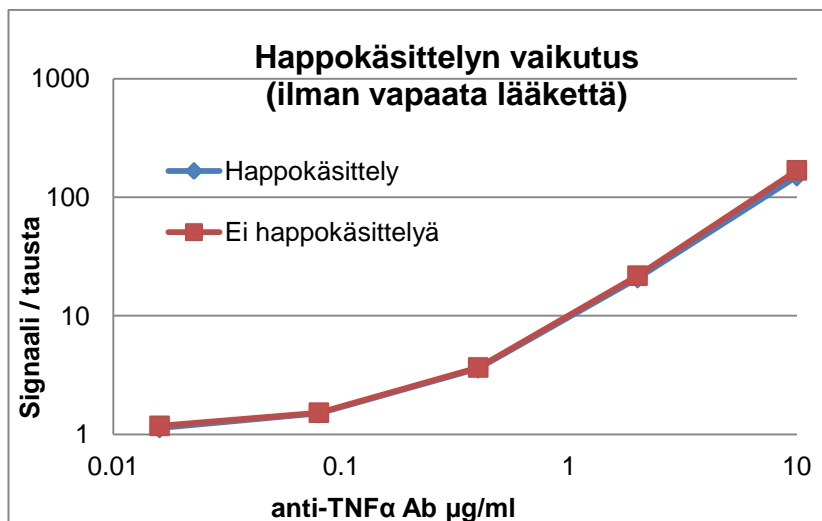
Kuvassa 8 on kuvattu vapaan lääkkeen sietokyky happokäsittelyllä, kuvassa 9 ilman happokäsittelyä ja kuvassa 10 happokäsittelyn vaikutus ilman vapaata lääketä. Liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu. Happokäsittely parantaa vapaan lääkkeen sietokykyä eli lääketoleranssia, mutta happokäsittely ei vaikuta määrittäkseseen muuten, jos vapaata lääketä ei ole.



Kuva 8. Vapaan lääkkeen sietokyky happokäsittelyllä.



Kuva 9. Vapaan lääkkeen sietokyky ilman happokäsittelyä.



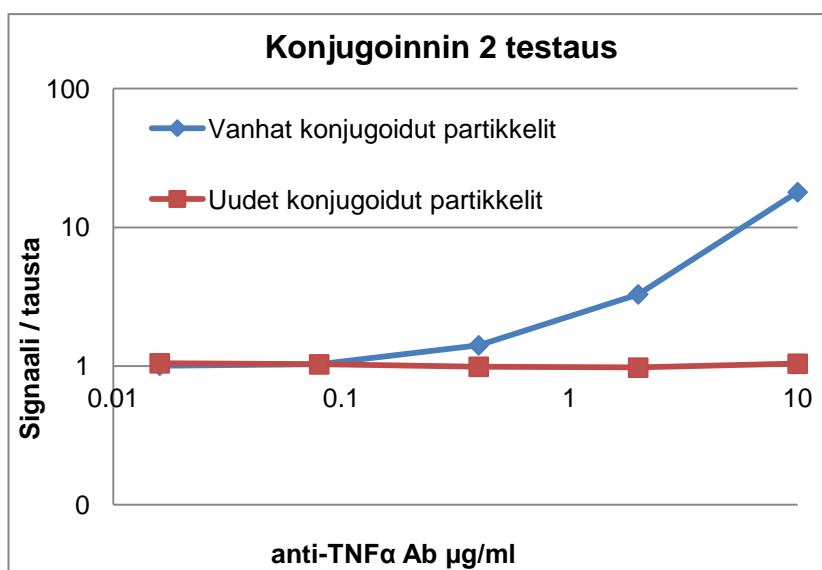
Kuva 10. Happokäsittelyn vaikutus ilman vapaata lääkettä.

7.11 Cut point

Cut point –määryksiä tehtiin yhteensä kolme ajoa. Tässä vaiheessa resurssien puitteissa oli mahdollista suorittaa vain puolet cut point –ajoista eli yksi määrittäjä suoritti kolme ajoa. Kun ensimmäinen cut point –ajo oli suoritettu oli valmistettava lisää konjugoituja partikkeleita, joiden valmistus ja testaus on kuvattu konjugoinnin 2 ja 3 yhteydessä. Cut point –ajoja jatkettiin konjugoinnin 3 partikkeleilla. Partikkelien vaihtuminen aiheutti osaltaan vaihtelua tuloksiin, jolloin saatiin korvattua myös osittain sitä vaihtelua, joka jäi puuttumaan, kun määrittäjiä oli vain yksi. Cut point -tulosten käsittelyyn on käytetty Syrinxissä valmistettua laskentapohjaa (pohja on liitteessä 2), joka huomioi saatujen tulosten varianssia ja hajontaa. Laskentapohjasta saadaan myös suositus cut pointin laskentatavasta, joka saatujen tulosten perusteella oli parametrinen menetelmä. Menetelmän perusteella cut point -arvoksi saatiin signaaliluku 752. Normalisaatiofaktoriksi saatiin signaaliluku 14. Normalisaatiofaktori lisätään määryksissä taustasignaaliin, jolloin saadaan laskettua määrytyskohtainen cut point.

7.12 Konjugointi 2 sekä testaus

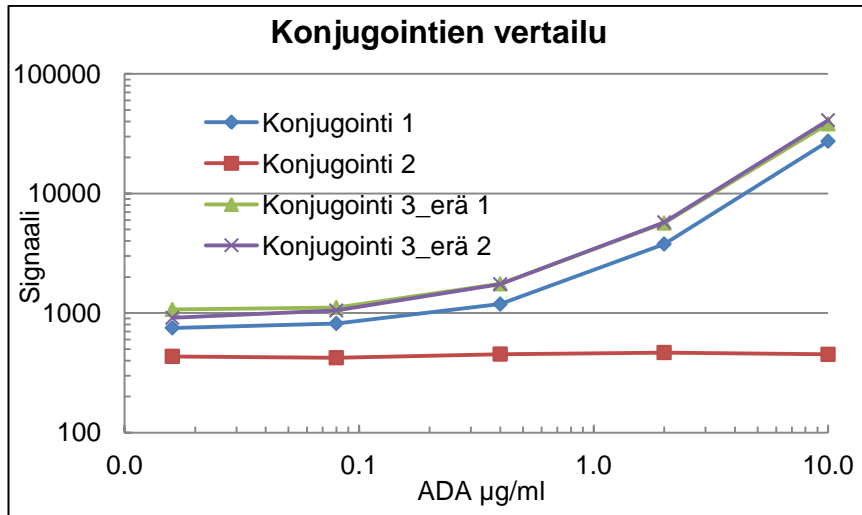
Konjugoinnin 2 suoritus sujui niin kuin aikaisemminkin, paitsi että konjugoitava määrä ja reagenssien määrät olivat suuremmat. Testauksessa kävi ilmi, että konjugoidut partikkelit eivät toimineet ollenkaan eli niillä ei saatu nousevaa signaalia vaan signaali oli kaikilla pitoisuuksilla taustasignaalin tasoa. Kuvassa 11 on verrattu vanhoja ja uusia konjugoituja partikkeleita ja liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu.



Kuva 11. Konjugoinnin 2 testaus.

7.13 Konjugointi 3 sekä testaus

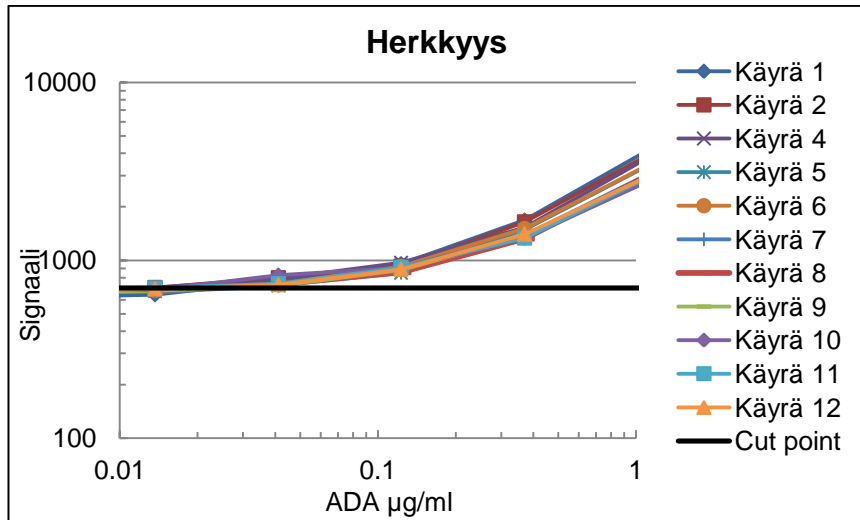
Konjugoinnin 3 suoritus sujui niin kuin ensimmäinenkin konjugointi eli kaikki toistettiin täysin samoin kuin aiemmin. Testauksessa nähtiin, että uudet konjugoidut partikkelit toimivat. Testauksessa oli mukana myös konjugoinnin 2 partikkelit vielä uudelleen, mutta ne eivät edelleenkään toimineet. Kuvassa 12 on verrattu vanhoja ja uusia konjugoituja partikkeleita ja liitteeseen 1 on koottu raakasignaalit sekä signaali/tausta-vertailu.



Kuva 12. Konjugoinnin 3 testaus.

7.14 Herkkyys, lineaarisuus ja koukkuefekt

Herkkyuden määrittämiseksi valmistettiin yhteensä 12 laimennossarjaa, joiden perusteella laskettiin määrittämisen herkkyys. Jokaiselle käyrälle piirrettiin trendisuora, jolta määritettiin pitoisuus cut pointin kohdalla ja sen perusteella laskettiin määrittämisen herkkyys ja LoQC –pitoisuus. Herkkyuden laskennassa huomioidaan cut point -konsentraatioiden keskiarvo ja hajonta: herkkyys = keskiarvo cut pointin kohdalla ($n=12$) + $t_{0.01,df}$ x cut point -konsentraatioiden keskihajonta. Kaavassa keskihajonnan kerroin $t_{0.01,df}$ on t-jakauman kriittinen arvo, joka vastaa 1 % väärän negatiivisen todennäköisyyttä. Kuvaajat ja tarkemmat laskelmat ovat liitteessä 3. Kuvassa 13 on kuitenkin kaikkien käyrien alaosa cut pointin leikkauspisteessä. Käyrän 3 valmistuksessa tapahtui virhe, joten se on jätetty laskuista pois. Kuvaajastakin näkee, että käyrä 3 kulkee aivan eri linjassa muihin käyriin verrattuna, jolloin se vääristää tulosta. Cut point on myös lisätty kuvaajaan. Taulukossa 15 on laskettuna määrittämisen herkkyys ja LoQC-pitoisuus.

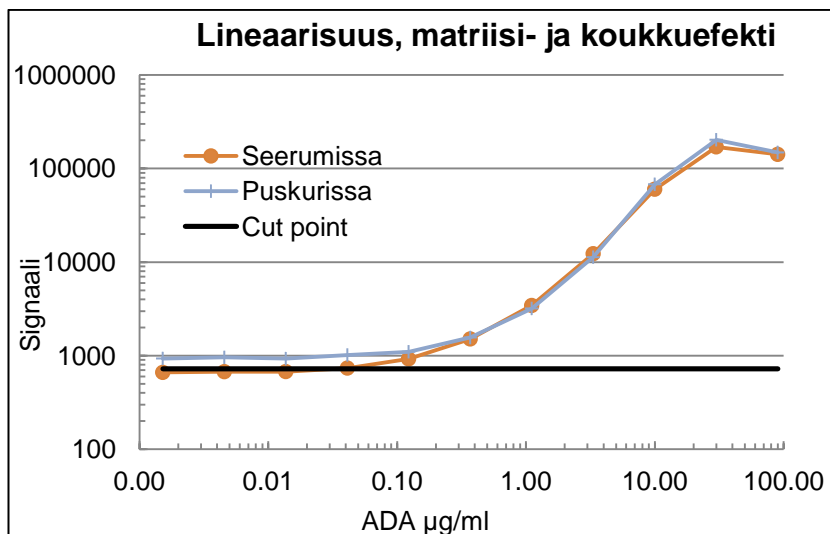


Kuva 13. Herkkyyys

Taulukko 15. Herkkyyys

Herkkyyys (keskiarvo + 2,764 x keskihajonta)	
N	11
Keskiarvo, µg/ml	0,04323
Keskihajonta, µg/ml	0,01
CV, %	32,0
Herkkyyys, µg/ml	0,1

Lineaarisuuden määrittämiseksi verrattiin sekä seerumiin, että puskurin valmistettuja annos-vaste-kuvaajia, kuva 14. Laimennokset antoivat jonkin verran erilaisen vasteen matalilla pitoisuuksilla, mikä voi johtua matriisiefektistä. Matriisiefekti tarkoittaa sitä, että seerumi vaikuttaa mitattuun näytepitoisuuteen; seerumi voi esimerkiksi sisältää jotakin häiritsevää ainetta, joka laskee mitattua signaalia. Matriisiefektiä tullaan todennäköisesti testaamaan vielä lisää tulevaisuudessa. Signaali kasvoi molemmilla kuvaajilla määritysalueella analyttipitoisuuden kasvaessa, joten voidaan todeta laimennosten olevan lineaarisia.

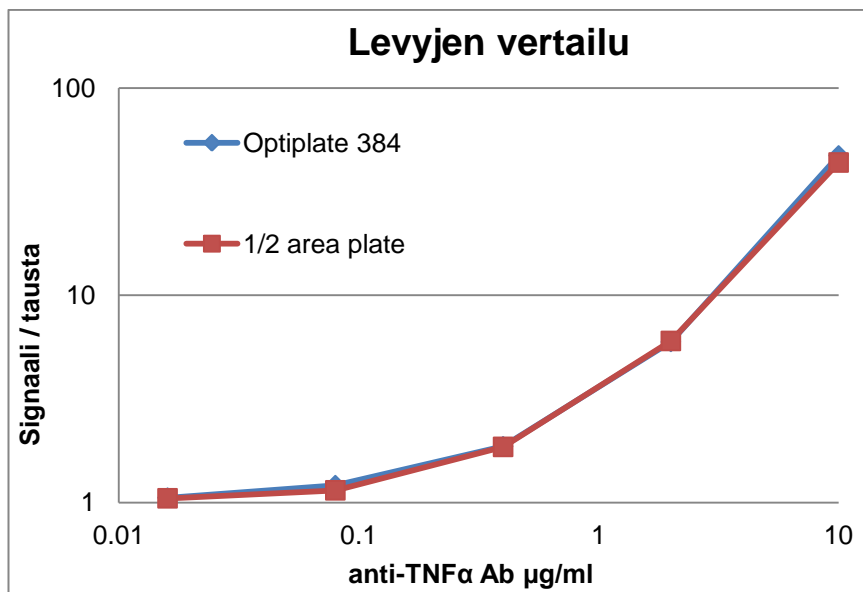


Kuva 14. Lineaarisuus, matriisi- ja koukkuefetti

Koukkuefektin määrittämiseksi laimennossarjoissa oli mukana korkea näytepitoisuus. Mikäli määrittäksessä olisi koukkuefetti, voisi käydä niin, että erittäin korkea näytepitoisuus antaisikin matalan signaalin. Lineaarisuutta kuvaavasta kuvasta 14 voidaan huomata, että määrittäksellä on hieman koukkuefettiä eli kuvaaja alkaa kaartua korkeimmalla pitoisuudella jo hieman alaspäin vaikka analyytin pitoisuus nousee. Analyyttipitoisuus 90 $\mu\text{g/ml}$ on kuitenkin jo niin korkea pitoisuus, että näytteissä ei todennäköisesti tulisi olemaan niin korkeita pitoisuuksia, joten todellisella määrittäksalueella koukkuefettiä ei ole.

7.15 Määrittäkslevyjen vertailu

Testattiin, onko levyn vaihtamisella vaikutusta määrittäkseseen. Huomattiin kuvasta 15, että määrittäks toimii samoin sekä Optiplate 384 –levyllä että 96 $\frac{1}{2}$ Area plate –levyllä. Signaalitaso on hieman alhaisempi 96 $\frac{1}{2}$ Area –levyllä, mutta kaikki signaalit laskevat samassa suhteessa, jolloin voidaan todeta, että määrittäks toimii kuitenkin samalla tavalla kummallakin levytyypillä. Molempia levyjä voidaan käyttää. Liitteessä 1 on signaalitulokset sekä signaali/tausta-vertailu.



Kuva 15. Levyjen vertailu

7.16 Saanto

Määritettiin määrittelyn saanto laimentamalla kontrollivasta-ainetta kymmenen individuaaliseen seerumiin sekä puskuriliuokseen. Käytettiin pitoisuuksina LoQC ja HiQC -pitoisuuksia. Valmistettiin tähän testiin vielä kolme eri LoQC-pitoisuutta 0,05; 0,1 ja 0,2 μ g/ml. Seeruminäytteitä verrattiin puskuriin valmistettuihin näytteisiin, minkä perusteella laskettiin saanto Saanto-%:tit on laskettuna taulukossa 16 ja signaalitulokset löytyvät liitteestä 1. Matalilla pitoisuuksilla näyttäisi siltä, että matriisi saattaa häiritä määrittystä, koska saanto pienenee.

Taulukko 16. Saanto-%

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	5
Puskuri	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Individuaali 1	80,1	79,2	82,0	80,8	94,6
Individuaali 2	79,6	77,4	74,6	82,2	87,9
Individuaali 3	83,7	78,8	79,1	80,4	85,7
Individuaali 4	77,6	79,5	74,6	80,6	83,7
Individuaali 5	75,8	75,8	71,5	78,0	82,2
Individuaali 6	88,0	85,3	80,3	85,3	89,6
Individuaali 7	80,3	92,3	78,3	82,8	86,1
Individuaali 8	79,8	81,2	81,2	86,0	93,2
Individuaali 9	79,9	78,4	75,0	83,9	85,5
Individuaali 10	84,1	83,4	75,7	79,3	84,7

7.17 Tarkkuus ja häiriöalttius

Tarkkuusmääryksissä analysoitiin etukäteen valmistettujen LoQC (0,1 $\mu\text{g/ml}$) ja HiQC (5,0 $\mu\text{g/ml}$) -näytteiden rinnakkaisnäytteitä sekä seulonta- että varmistusmääryksissä. Määryksissä oli mukana myös negatiivinen kontrolli. Myös tarkkuusmääryksissä oli tarkoitus olla kaksi eri tekijää, mutta koska se ei ollut mahdollista, aiheutettiin määrykseen tarkoituksella pientä vaihtelua vaihtelemalla viimeisen inkuboinnin kestoa (27, 30 tai 33 min). Määryksissä oli myös käytössä eri konjugointierät. Siten samalla testattiin myös määryksen häiriöalttiutta. Taulukossa 17 on koottuna yhteenvetolaskelmat tuloksista. Liitteessä 4 on tarkemmat laskelmat ja signaalit. Immunogeenisyysmääryksissä tarkkuuden tavoitearvo on $\leq 30\%$ vaihtelua määrysten välillä ja sisällä, tämä kriteeri saavutettiin. Tuloksille nro 1-12 inkubointiaika on ollut 30 min, tuloksille 13-24 27 min ja 25-36 33 min. Tulosten laskennassa käytettiin Syrinxillä käytettävää laskentapohjaa, jonka perusteella saatiin laskettua tuleville määryksille kontrollien hyväksyntäraajat.

Taulukko 17. Tarkkuus

Tarkkuus		0 µg/ml	0,1 µg/ml	5,0 µg/ml
# Tulokset	N	36	36	36
Keskiarvo	Keskiarvo	715	884	12106
Variaatio	Keskihajonta	87	83	837
Tarkkuus	Määrittystenvälinen (%CV)	5.4	3.8	5.9
	Määrittämyksen sisäinen (%CV)	12.2	9.4	6.9

7.18 Lääkkeensietokyky

Lääkkeensietokyky eli lääketoleranssi (se vapaan lääkkeen määrä, jolla ADA antaa vielä positiivisen signaalin) laskettiin uudelleen alkuperäisistä määrittetyistä tuloksista käyttäen määritettyä cut point -arvoa. Näytteen sisältämä vapaa lääke häiritsee määrittystä, koska ADA sitoutuu siihen partikkeleiden sijaan. ADA ja lääke erotetaan matalan pH:n avulla, jolloin happokäsittely parantaa lääketoleranssia. Cut point sekä LoQC -pitoisuus 0,1 µg/ml ja HiQC -pitoisuus 5,0 µg/ml ovat merkittävänä kuvaajiin alkuperäisen vapaan lääkkeen sietokyvyn määrittämisen yhteydessä kuvissa 8 ja 9 kappaleessa 7.10. Kuvaajien perusteella voidaan todeta, että happokäsittelyprotokollalla näyte, jossa ADA-pitoisuus on 0,1 µg/ml sietää vapaata TNF α :aa 3,2 µg/ml ja näyte ADA-pitoisuudella 5,0 µg/ml sietää 16 µg/ml TNF α :aa. Protokollalla ilman happokäsittelyä näyte, jossa ADA-pitoisuus on 0,1 µg/ml ei siedä ollenkaan vapaata TNF α :aa ja näyte ADA-pitoisuudella 5,0 µg/ml sietää 3,2 µg/ml TNF α :aa.

8 ARVIOINTI JA POHDINTA

Työssä osoitettiin AlphaLISA –teknologian soveltuvuus immunogeenisyysmäärittäisiin. Menetelmä on toistettava ja kliinisiin määrittäisiin suositeltu herkkyys (suositusraja 0,25 – 0,5 µg/ml) saavutettiin. Menetelmän etuja ovat pieni näyte- ja reagenssikulutus ja lisäksi se on yksinkertainen ja nopea suorittaa.

Partikkelien konjugoiteja testattaessa todettiin, että partikkelierien välillä voi olla vaihtelua. Suuren määrän konjugointi ei onnistunut. Partikkelierien vaihtelu vaikutti jonkin verran myös tutkimuksen tuloksiin. Partikkelierä vaihtui kesken cut point -määrittäysten, jolloin määritettyyn cut point -signaaliin aiheutui enemmän variaatiota. Cut point on määrittäiskohtainen signaaliraja, joka lasketaan kullekin määrittäykselle aina erikseen, jolloin määrittäyksen cut point -arvo on kuitenkin täysin luotettava.

Menetelmänkehityksessä oli alun perin tarkoitus olla joidenkin parametrien määrittämisessä kaksi eri tekijää. Tutkimuksessa ei kuitenkaan voitu resurssien puitteissa käyttää kahta tekijää, joten se osuus jäi vielä vakaaksi. Jatkossa tutkimusta voitaisiin vielä täydentää joiltakin osin toistamalla testejä toisen tekijän tekemänä. Kahden eri tekijän merkitys menetelmänkehityksessä olisi lähinnä se, että määrittäisiin saataisiin luonnollista variaatiota ja menetelmän häiriöalttiutta pystyttäisiin testaamaan. Osaltaan tätä puutteellista osiota saatiin korvattua aiheuttamalla joihinkin määrittäisiin tietoisesti hieman vaihtelua. Cut point- ja tarkkuusmäärittäyksissä oli käytössä eri konjugoidut partikkelierät ja tarkkuusmäärittäyksissä vaihdeltiin viimeisen inkubointivaiheen kestoa. Herkkyysmäärittäyksissä sama määrittäjä teki kaksi kuuden laimennossarjan määrittäystä, mutta sarjat tehtiin hieman eri tavoin, vaikka pitoisuudet pidettiin samoina.

Vapaa lääke häiritsee määrittäystä, mutta happo-käsittelyvaiheen lisäys paransi lääketoleranssia 5-kertaisesti. Muihin määrittäysformaatteihin verrattuna tällä menetelmällä arvioidaan olevan n. 10 kertaa heikompi lääketoleranssi, mikä on tämän menetelmän heikkous.

Menetelmänkehitys on tehty pääosin käyttäen suoraa määritysmenetelmää, jossa partikkelit on konjugoitu suoraan TNF α :lla. Menetelmää voisi vielä verrata SA-menetelmään, jossa käytetään biotinyloitua TNF α :aa ja luovuttajapartikkelit on konjugoitu streptavidiinilla. Menetelmänkehityksen alkuosassa tehtiin muutama määritys käyttäen bio-TNF α :aa, jolloin huomattiin, että Syrinxissä valmistettu bio-reagenssi ei antanut aivan yhtä suurta signaali/tausta-suhdetta kuin PerkinElmerin reagenssi, joten biotinylointia voisi vielä koittaa saada paremmaksi. Muuten SA-menetelmään vertailemalla voitaisiin tutkia, olisiko siitä hyötyä joidenkin parametrien kehittämisessä, kuten esimerkiksi heikon lääketoleranssin parantamiseksi.

Menetelmällä huomattiin olevan hieman matriisiefektiä matalilla vasta-ainepitoisuuksilla. Signaalitaso oli korkeampi, kun laimennokset oli valmistettu puskuriliuokseen verrattuna seerumiin valmistettuihin laimennoksiin. Tämä täytyy huomioida, mikäli näytemäärityksissä näytteitä joudutaan laimentamaan. Vaikutusta voitaisiin testata vielä tarkemmin ja mahdolliset näytelaimennokset pitäisi valmistaa näytematriisiin, mikäli matriisiefektiä todetaan olevan.

Kaikkien inkubointivaiheiden kestoa ei testattu. Vaikka määritys on jo muutenkin nopea, voisi esimerkiksi happokäsittelyvaiheen kestoa vielä testata. Inkuboinnin kesto on nyt yksi tunti, mutta mikäli lyhyempikin aika riittäisi, saataisiin määrittämisestä vieläkin nopeampi.

Menetelmä on kehitetty mallianalyysi TNF α :lle. Jatkossa menetelmän toimivuutta voisi tutkia muillakin analyteilla ja tehdä esimerkiksi vertailua eri parametrien testauksella. Mielenkiintoista olisi päästä testaamaan menetelmää jonkin todellisen lääkeaineen vasta-aineiden määrittämiseksi.

Tutkimus oli Syrinxissä tehtävä yhteistyöprojekti PerkinElmerin kanssa. Projekti alkoi hyvin ja eteni aluksi hyvällä aikataululla, vaikka tutkimus onkin Syrinxissä ollut aikataulunsa puolesta prioriteetiltaan alempana varsinaisiin aikataulutettuihin asiakasprojekteihin verrattuna. Tutkimuksen keskivaiheilla tuli kuitenkin pieni notkahdus etenemisen suhteen, sillä aikaa sen jatkamiseen ei ollut tarpeeksi ja tekijätkin (työn tekijä ja ohjaaja) olivat vähän hajallaan erilaisissa työtehtävissä.

sä. Tutkimuksen loppuvaihe oli taas aikatauluongelman ja työtehtävien suhteen positiivisempi ja loppuvaihe etenikin ripeästi.

Koska opinnäytetyön aihe liittyy täysin tekijän työhön, oli opinnäytetyön tekeminen erittäin hyödyllistä ja opettavaista. Siitä on jatkossakin hyötyä tekijän työsäään tekemissä tulevissa projekteissa ja tutkimuksissa sekä konkreettisesti kehitettynä menetelmänä että oman tietotaidon kehittymisen kautta asioiden ymmärtämisessä.

LÄHTEET

Bendzen, K., Ainsworth, M., Steenholdt, C., Thomsen, O.Ø., Brynskov, J. (2009), Individual medicine in inflammatory bowel disease: Monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies, *Scand J Gastroenterol* **44**: 774-81.

Boissonneault, M. (2011) Recommended AlphaLISA Assay Protocol for the Detection of Anti-Drug Antibodies (ADA) in Serum, PerkinElmer.

Boissonneault, M. (2012) Recommended change in the study plan, PerkinElmer.

EnVision (2009) Instruction manual, 2104 EnVision Multilabel Reader Valid for instruments with software version 1.12, PerkinElmer.

Hyvärinen, J. (2009) EnVision Multilabel plate reader from PerkinElmer.

Mire-Sluis, A.R., Barrett, Y.C., Devanarayan, E.K., Liu, H., Maia, M., Parish, T., Scott, G., Shankar, G., Shores, E., Swanson, S.J., Taniguchi, D.W., Zuckerman, L.A. (2004), Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods* **289**: 1-16.

Oksanen, E. (2012) Development of an AlphaLISA TNF α ADA assay for immunogenicity assessment, Syrinx Bioanalytics Oy.

PerkinElmer (2011) . Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 20.01.2012]. Saatavilla www.muodossa: http://perkinelmerreagents.onconfluence.com/pages/viewpage.action?pageId=328672.

PerkinElmer (2011) . Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 29.03.2013].]. Saatavilla www.muodossa: http://www.perkinelmer.com/fi/ourcompany/aboutus/default.xhtml.

PerkinElmer (2004), AlphaLISA[®] Assay Development Guide.

Ristelä, J. (2010) GLP –perehdytys, Syrinx Bioanalytics Oy.

Santavuori, A. (2013) GCP – Good Clinical Practice, Hyvä Kliininen Tutkimustapa –koulutus, Crown CRO Oy.

Shankar, G., Devanarayan, V., Amaravadi, L., Barrett, Y.C., Bowsher, R., Finco-Kent, D., Fiscella, M., Gorovits, B., Kirshner, S., Moxness, M., Parish, T., Quarmby, V., Smith, H., Smith, W., Zuckerman, L.A., Koren, E. (2008), Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal* **48**: 1267-81.

Somprayrac, L. (2008) How the Immune System Works. 3. pianos, Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Syrinx Bioanalytics Oy (2009). Internet-lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 20.01.2013]. Saatavilla www.muodossa: http://www.syrinxbioanalytics.com/.

Määrittystulosten raakasignaalit

Bio-TNF α :n laatu

Signaalitulokset

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE), blank	371	346	844	847	271
Bio-TNF α (PE), anti-TNF α Ab	1339	13259	109236	162173	29282
Bio-TNF α (SR), blank	429	382	378	424	351
Bio-TNF α (SR), anti-TNF α Ab	882	9991	55101	58451	18641

Signaali/tausta-vertailu

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE)	3,6	38	129	192	108
Bio-TNF α (SR)	2,1	26	146	138	53

Bio-TNF α :n konsentraatio

Signaalitulokset

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE), blank	376	1588	12878	65409	28248
Bio-TNF α (PE), anti-TNF α Ab	5355	53446	403926	691020	58336
Bio-TNF α (SR), blank	619	3553	21762	50315	12882
Bio-TNF α (SR), anti-TNF α Ab	2811	32854	267036	133684	14162

Signaali/tausta-vertailu

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE)	14,3	33,7	31,4	10,6	2,1
Bio-TNF α (SR)	4,5	9,2	12,3	2,7	1,1

Uuden biotinyloidun TNF α :n laatu

Signaalitulokset

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE), blank	318	281	317	315	267
Bio-TNF α (PE), anti-TNF α Ab	1173	11388	90682	156704	35602
Bio-TNF α (SR), blank	350	329	346	377	343
Bio-TNF α (SR), anti-TNF α Ab	607	7124	73258	74888	2667

Signaali/tausta-vertailu

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE)	3,7	40,5	287	498	134
Bio-TNF α (SR)	1,7	21,7	212	199	7,8

Uuden biotinyloidun TNF α :n konsentraatio

Signaalitulokset

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE), blank	342	1401	10430	52772	28420
Bio-TNF α (PE), anti-TNF α Ab	4953	48589	351107	562621	53699
Bio-TNF α (SR), blank	735	4869	33402	77309	986
Bio-TNF α (SR), anti-TNF α Ab	2691	32669	310136	307114	2601

Signaali/tausta-vertailu

Bio-konsentraatio, nM	0,01	0,1	1	10	100
Bio-TNF α (PE)	14,5	34,7	33,7	10,7	1,9
Bio-TNF α (SR)	3,7	6,7	9,3	4,0	2,6

Partikkelien konsentraatiot

Signaalitulokset, tausta (0 µg/ml anti-TNFα Ab)

Luovuttaja	0 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml
Vastaanottaja					
0 µg/ml	24	69	61	74	98
20 µg/ml	1188	657	661	588	606
40 µg/ml	2359	1292	1133	1168	1130
60 µg/ml	3475	1781	1750	1656	1618
80 µg/ml	4666	2635	2333	2251	2091

Signaalitulokset (10 µg/ml anti-TNFα Ab)

Luovuttaja	0 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml
Vastaanottaja					
0 µg/ml	57	48	48	35	21
20 µg/ml	1855	215701	209428	184184	154357
40 µg/ml	3239	243026	227074	202999	179256
60 µg/ml	4014	154937	144776	124759	106781
80 µg/ml	5002	83895	90700	71251	N/A

Pienin tarvittava seerumilaimennos

Signaalitulokset

Anti-TNFα, µg/ml	0	0,016	0,08	0,4	2	10
0 % seerumi	486	518	838	2282	16638	124370
3,125 % seerumi	466	541	801	2336	15848	117960
12,5 % seerumi	425	485	725	1980	13648	103058
25 % seerumi	409	415	678	1716	12423	89572
50 % seerumi	380	408	580	1628	11178	78683
100 % seerumi	322	391	561	1824	12163	66992

Signaali/tausta-vertailu

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
0 % seerumi	1,0	1,1	1,7	4,7	34,2	255,9
3,125 % seerumi	1,0	1,2	1,7	5,0	34,0	253,1
12,5 % seerumi	1,0	1,1	1,7	4,7	32,2	242,8
25 % seerumi	1,0	1,0	1,7	4,2	30,4	219,0
50 % seerumi	1,0	1,1	1,5	4,3	29,4	207,1
100 % seerumi	1,0	1,2	1,7	5,7	37,8	208,0

Inkubaatioaika

Signaalitulokset

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
0,5 h RT	363	408	533	1550	9262	46307
1 h RT	384	391	541	1415	9344	50241
2 h RT	383	400	510	1195	6580	53536
3 h RT	361	391	477	1177	6615	49556
o/n + 4 °C	335	341	454	1276	9427	94961

Signaali/tausta-vertailu

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
0,5 h RT	1,0	1,1	1,5	4,3	25,5	127,6
1 h RT	1,0	1,0	1,4	3,7	24,3	130,8
2 h RT	1,0	1,0	1,3	3,1	17,2	139,8
3 h RT	1,0	1,1	1,3	3,3	18,3	137,5
o/n + 4 °C	1,0	1,0	1,4	3,8	28,1	283,5

Happokäsittely

Signaalitulokset

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
happokäsittely	459	477	536	974	3585	25866
ilman happokäsittelyä	363	408	533	1550	9262	46307

Signaali/tausta-vertailu

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
happokäsittely	1,0	1,0	1,2	2,1	7,8	56,4
ilman happokäsittelyä	1,0	1,1	1,5	4,3	25,5	127,6

Vapaan lääkkeen sietokyky ja happokäsittely

Signaalitulokset happokäsittelyllä

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Vapaa lääke TNFα						
0	457	515	688	1643	9466	68500
0,0032	480	512	564	1101	5104	50054
0,016	480	460	508	626	1540	12590
0,08	464	446	460	467	567	996
0,4	440	445	441	450	487	474
2	442	473	434	468	474	463

Signaalitulokset ilman happokäsittelyä

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Vapaa lääke TNF α						
0	355	418	540	1299	7728	59756
0,0032	389	370	386	412	504	2783
0,016	341	357	396	369	380	464
0,08	378	362	335	358	371	358
0,4	358	344	361	334	357	367
2	346	382	354	339	338	357

Signaali/tausta-vertailu happokäsittelyllä

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Vapaa lääke TNF α						
0	1,0	1,1	1,5	3,6	20,7	150,1
0,0032	1,0	1,1	1,2	2,3	10,6	104,3
0,016	1,0	1,0	1,1	1,3	3,2	26,3
0,08	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	2,1
0,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1
2	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1	1,0

Signaali/tausta-vertailu ilman happokäsittelyä

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Vapaa lääke TNF α						
0	1,0	1,2	1,5	3,7	21,8	168,3
0,0032	1,0	1,0	1,0	1,1	1,3	7,2
0,016	1,0	1,0	1,2	1,1	1,1	1,4
0,08	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9
0,4	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0
2	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0

Konjugoinnin 2 testaus

Signaalitulokset

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
vanhat partikkelit	511	515	528	722	1682	9164
uudet partikkelit	423	444	436	419	413	441

Signaali/tausta-vertailu

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
vanhat partikkelit	1,0	1,0	1,0	1,4	3,3	18,0
uudet partikkelit	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Konjugoinnin 3 testaus

Signaalitulokset

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
konjugointi 1	784	752	818	1188	3775	27376
konjugointi 2	446	434	423	454	467	451
konjugointi 3_erä 1	1139	1071	1114	1756	5661	38246
konjugointi 3_erä 2	864	912	1050	1743	5750	41044

Signaali/tausta-vertailu

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
konjugointi 1	1,0	1,0	1,0	1,5	4,8	34,9
konjugointi 2	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0
konjugointi 3_erä 1	1,0	0,9	1,0	1,5	5,0	33,6
konjugointi 3_erä 2	1,0	1,1	1,2	2,0	6,7	47,5

Määrittyslevyjen vertailu

Signaalitulokset

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Optiplate 384	811	856	984	1514	4830	38344
1/2 area plate	721	756	826	1338	4340	31516

Signaali/tausta-vertailu

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Optiplate 384	1,0	1,1	1,2	1,9	6,0	47,3
1/2 area plate	1,0	1,0	1,1	1,9	6,0	43,7

Saanto ja LOQC –valinta

Signaalitulokset

Anti-TNF α , $\mu\text{g/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	5
Puskuri	1105	1214	1373	1534	18516
Individuaali 1	885	962	1125	1240	17522
Individuaali 2	880	939	1024	1261	16281
Individuaali 3	925	957	1086	1233	15875
Individuaali 4	857	965	1024	1237	15504
Individuaali 5	837	920	982	1197	15220
Individuaali 6	972	1036	1102	1309	16585
Individuaali 7	887	1120	1074	1271	15942
Individuaali 8	881	985	1114	1320	17250
Individuaali 9	883	952	1030	1287	15822
Individuaali 10	929	1012	1039	1217	15680

Cut point –laskelmat

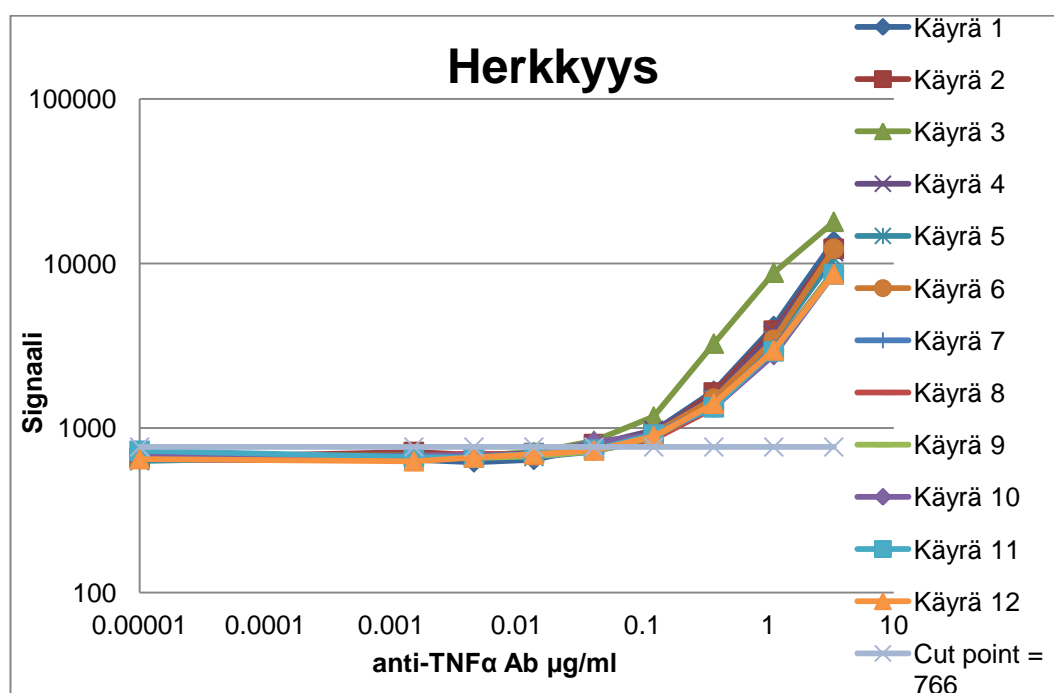
Screening cut-point determination				SYRINX BIOANALYTICS					
PARAMETRIC METHOD									
							N	141	
							K	3	
							N - K	138	
							Pooled		
*Weighted	26641,27660	92138,55319	110871,77660				Weighted		
Variance	579,15819	2003,01203	2410,25601				Variance	1664,142	
SD	24,07	44,76	49,09				Pooled		
Mean	453,81	819,84	779,69				SD	40,7939	
Ni	47	47	47	0	0	0	Mean	684,4468	
Group	1	2	3						
1	395	713	719				Mean + 1.645 SD		
2	444,5	766,5	735,5				751,55		
3	426,5	829,5	831,5				CUT POINT		
4	423	832,5	788,5				752		
5	469	775,5	794,5				MEDIAN BLANK POOL		
6	437,5	838,5	764				738		
7		890	892				NORMALIZATION FACTOR		
8	448	789	773				14		
9	459,5	803,5	880,5						
10	488	807	795,5						
11	452,5	827	731,5						
12	484,5	875	843						
13	455,5	905	846,5						
14	466,5	852,5	826,5						
15	486,5	804,5	791,5						
16	492,5	887,5	887						
17	434	742,5	713,5						
18	469	790,5	760						
19	476	919,5	809						
20	417,5		749						
21	443	826,5	749						
22	457	842,5	760						
23	433,5	754,5	777,5						
24	470	822,5	807,5						
25	462,5	807,5	720,5						
26	471,5	863,5	783,5						
27	445	781,5							
28	450,5	824,5	798						
29	515	866,5	879,5						
30	461	814,5	717						
31	482	808	739						
32			772						
33	505,5	906,5	855						
34	441	798	818						
35	454,5	851,5	765						
36	431,5	775	734,5						
37	428	844,5	773,5						
38	468,5	793	764,5						
39									
40	419	817	745,5						
41	462	782	753,5						
42	416,5	852	764						
43	458,5	863							
44	452,5	843	747						
45	461	819,5	723,5						
46	436,5	777	804,5						
47	448	815	706,5						
48	437	766,5	776						
49	446,5	804	717,5						
50	446	764	762						

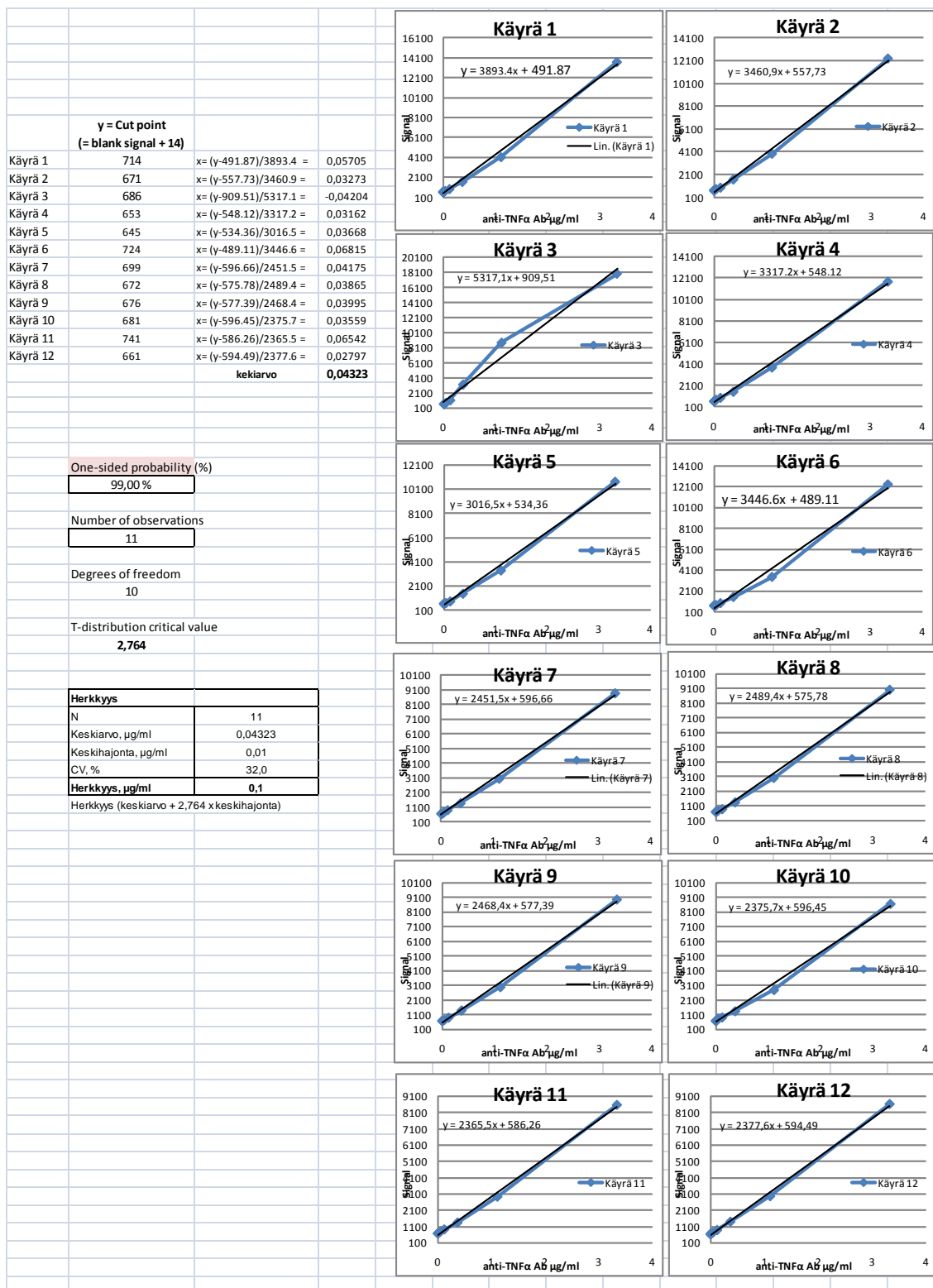
Herkkyyslaskelmat & -kuvaajat

Taulukko: Signaalitulokset

	0	0,00152	0,00457	0,0137	0,0412	0,123	0,370	1,11	3,33	10	30	90
1	700	642	619	641	769	956	1682	4164	13700	61999	178681	149062
2	657	715	687	704	798	928	1644	3903	12270	60613	183388	149154
3	672	683	682	712	836	1172	3258	8794	17932	83316	181332	144874
4	639	640	676	704	790	970	1530	3784	11768	56342	182158	147282
5	631	679	672	671	723	850	1485	3410	10756	50788	163638	153112
6	710	663	675	677	737	924	1509	3437	12285	60048	170208	141545
7	685	666	673	664	718	914	1383	3049	8862			
8	658	675	700	680	737	856	1322	2986	9003			
9	662	670	655	674	720	882	1376	2959	8929			
10	667	679	686	682	825	910	1333	2782	8672			
11	727	665	661	699	738	912	1335	2925	8571			
12	647	628	662	691	730	891	1404	2964	8609			

Kuva:





Tarkkuuslaskelmat

	QC µg/ml (signaali)			QC µg/ml (signaali)			Inhibio -%		
	Neg. QC	LoQC	HiQC		LoQC	HiQC		LoQC	HiQC
Seulonta	0	0,1	5,0	Varmistus	0,1	5,0	%-inhib.	0,1	5,0
1	765	866	12606		666	630		23,1	95,0
2	657	924	12746		631	642		31,7	95,0
3	705	803	11314		633	670		21,2	94,1
4	656	813	11470		680	653		16,3	94,3
5	667	851	12151		675	662		20,6	94,6
6	669	811	12548		613	634		24,5	94,9
7	661	731	13168		574	588		21,5	95,5
8	663	799	12962		592	579		25,9	95,5
9	555	752	11276		556	577		26,1	94,9
10	624	766	11234		601	595		21,6	94,7
11	549	759	12234		546	595		28,1	95,1
12	552	798	12268		657	569		17,7	95,4
13	840	968	12662		758	763		21,7	94,0
14	782	1001	12816		759	786		24,2	93,9
15	780	955	10719		703	734		26,4	93,2
16	844	980	11718		786	749		19,8	93,6
17	809	947	12134		709	776		25,2	93,6
18	783	933	12252		804	806		13,8	93,4
19	707	864	13592		685	704		20,8	94,8
20	729	842	13320		636	654		24,5	95,1
21	734	873	12094		681	676		22,1	94,4
22	646	887	12088		640	634		27,9	94,8
23	662	907	13317		655	714		27,7	94,6
24	656	850	13028		666	673		21,6	94,8
25	842	988	12867		802	801		18,9	93,8
26	781	993	11628		787	832		20,7	92,8
27	831	974	10424		808	786		17,0	92,5
28	781	956	10294		798	746		16,5	92,8
29	819	984	10902		778	777		20,9	92,9
30	791	950	11514		797	806		16,1	93,0
31	739	936	12112		676	671		27,7	94,5
32	691	886	12762		636	663		28,2	94,8
33	736	939	11719		717	655		23,6	94,4
34	691	892	11720		684	668		23,4	94,3
35	669	824	12148		667	643		19,1	94,7
36	669	833	12002	Varmistus	615	647	%-inhib.	26,1	94,6
N	36	36	36		36	36		36	36
Keskiarvo	715	884	12106		685	688		23	94
Keskihajonta	81,9	78,0	821,4		75,6	75,3		4,1	0,8
CV %	11,5	8,8	6,8		11,0	11,0		18,3	0,9

	Analyte (signal)	Blank	LoQC	HiQC
Characteristic	Statistic			
# Results	N	36	36	36
Average	Mean	714,63	884,06	12105,81
Variation	SD	87,07	83,09	837,18
Precision	Pooled intrabatch (%CV)	5,40	3,78	5,94
	Interbatch (%CV)	12,18	9,40	6,92
QC-sample limits				
Upper limit	Mean + $t_{crit,df}SD$	926,87	1110,38	14386,11
Lower limit	Mean - $t_{crit,df}SD$	-	657,74	9825,50
Critical value	t	2,438	2,724	2,724
Failure rate	One-sided probability	0,01	0,005	0,005

	Analyte (inhibition)	Blank	LoQC	HiQC
Characteristic	Statistic			
# Results	N	0	36	36
Average	Mean		22,56	94,28
Variation	SD		4,18	0,89
Precision	Pooled intrabatch (%CV)		17,02	0,35
	Interbatch (%CV)		18,51	0,94
QC-sample limits				
Upper limit	Mean + $t_{crit,df}SD$		33,94	96,70
Lower limit	Mean - $t_{crit,df}SD$		11,19	91,87
Critical value	t		2,724	2,724
Failure rate	One-sided probability	0,01	0,005	0,005