

Opinnäytetyö (YAMK)

Insinööri (YAMK), terveysteknologia

2024

Laura Nurmi

Monoklonaalisen vasta-aineen
tuotantomenetelmän vaihto *in*
vivosta in vitroon – muutoksen
vaikutus valmistettavaan
levykomponenttiin

Opinnäytetyö (YAMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Insinööri (YAMK), terveysteknologia

2024 | 61 sivua

Laura Nurmi

Monoklonaalisen vasta-aineen tuotantomenetelmän vaihto *in vivosta in vitroon* – muutoksen vaikutus valmistettavaan levykomponenttiin

Monoklonaalisia vasta-aineita hyödynnetään laajalti immunodiagnostiikassa sekä seulontatarkoituksessa niiden spesifisyyden ja pitkän puoliintumisajan vuoksi. Kehittämistyössä oli vesiputousmallia hyödyntäen tarkoituksena tutkia ja selvittää, onko tuotteessa, joka on osa seulontakäyttöön tarkoitettua kittiä, eroa toiminnallisuudessa ja säilyvyydessä, kun valmistukseen käytettävän vasta-aineen tuotantomenetelmä korvattiin *in vivo*-tuotetusta vasta-aineesta *in vitro*-tuotettuun vastaavaan vasta-aineeseen. Levyvalmistus-tuotantolinjalla valmistettiin yksi verifiointierä, jota verrattiin vastaavaan, askites-vasta-aineella tuotettuun lopputuotteeseen. Lopputuotteena on vastasyntyneiden seulontaan tarkoitettu kitti, jolla tutkitaan biotinidaasin puutostilaa, joka on harvinainen aineenvaihduntasairaus. Verifiointierälle suoritettiin komponenttitason laadunvalvonta, lopputesti, sekä säilyvyytestaus. Kehittämistehtävän lopputuloksena epäeettisen, askites-vasta-aineen käyttö voitiin lopettaa, ja korvata se vastaavalla *in vitro*-tuotetulla vasta-aineella.

Asiasanat:

Vasta-aine, verifiointi, tuotantomenetelmä, askites, *in vivo*, *in vitro*, vastasyntyneiden seulonta

Master's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Master's Degree in Health Technology

2024 | 61 pages

Laura Nurmi

The change of manufacturer's production method for a monoclonal antibody from in vivo to in vitro - effects of the change on the manufactured microtitration strips component

Monoclonal antibodies are widely used in immunodiagnostics and screening purposes due to their specificity and long half-life. The purpose of this thesis was to investigate by utilizing the waterfall model, if a change in the antibody production method from in vivo to in vitro, had any effect on the screening product or final product (kit) functionality and shelf life. One verification batch was produced on the Coated Plate Manufacturing line. The quality of the manufactured component was studied by comparing it to a reference batch, which had been produced with the *in vivo* antibody. The final product is a kit intended for a newborn screening of a rare metabolic disease, Biotinidase deficiency. Component level quality control, final release test and stability studies were performed on the verification batch. As a result of the thesis, the unethical use of *ascites* antibody could be terminated for this final product, and the *ascites* antibody could be replaced with a corresponding *in vitro*-produced antibody.

Keywords:

Antibody, verification, production method, ascites, in vivo, in vitro, newborn screening

Sisältö

Käytetyt lyhenteet tai sanasto	8
1 Johdanto	10
1.1 Toimeksiantaja	12
1.2 Lainsäädäntö	12
1.3 Vastasyntyneiden seulonta	13
2 Vasta-aineet	15
2.1 IgG-vasta-aineen rakenne	17
2.2 Monoklonaaliset vasta-aineet	19
2.3 Tuottomenetelmät	20
2.4 <i>In vitro</i> -vasta-aineen hyödyt	21
2.5 Määrittämisperiaate	21
3 Tutkimusmenetelmä	24
4 Verifiointiin liittyvä taustatyö	26
5 Verifiointin toteutus ja tulokset	28
5.1 Prosessivaihe A	30
5.2 Prosessivaihe B	32
5.3 Prosessivaihe C	33
5.4 Komponenttilaadunvalvonta	35
5.5 GSP®-laitteen toimintaperiaate	36
6 Komponenttilaadunvalvonnan tulokset	37
6.1 Loppulaadunvalvonta	40
6.2 Säilyvyystutkimukset	40
6.3 Kiihdytetty säilyvyystutkimukset	41
6.4 Kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen testimenetelmä	43
6.5 Kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen tulokset	43
6.6 Reaaliaikaiset säilyvyystutkimukset	54

6.6.1 Kuljetusrasitus (shipping treatment)	55
6.6.2 Käytönaikainen (in-use/on-board) rasitus	55
6.7 Reaaliaikaisten säilyvyystestien tulokset sisältäen kuljetus- ja käytönaikaisen rasi- tustestien	56
7 Johtopäätökset	68
Lähteet	71

Kuvat

Kuva 1. Eri tuotantotapojen vertailu. Valdés (2012).	16
Kuva 2. IgG vasta-aineen rakenne. Groff, ym. (2015)	18
Kuva 3. IgG-molekyylin perusrakenne. Virella (2019).	19
Kuva 4. GSP Neonatal Biotinidase määrittysperiaate. Revvity (2023).	22
Kuva 5. Perinteinen vesiputousmalli, muokattu Royce (1970).	24
Kuva 6. Levyvalmistuksen prosessin vuokaavio.	29
Kuva 7. Prosessin A (kouttausvaihe) vuokaavio.	30
Kuva 8. Prosessin B (pesu-kyllästysvaihe) vuokaavio.	32
Kuva 9. Prosessin C (aspiointi-pakkausvaihe) vuokaavio.	33

Kuviot

Kuvio 1. Verifiointierän vertailu edellisiin 20 erään	39
Kuvio 2. Kiihdytetty säilyvyys, yleiskuva tuloksista.	44
Kuvio 3. Kiihdytetty säilyvyys, kontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	45
Kuvio 4. Kiihdytetty säilyvyys, kontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	46

Kuvio 5. Kiihdytetty säilyvyys, kittikontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	47
Kuvio 6. Kiihdytetty säilyvyys, kittikontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	48
Kuvio 7. Kiihdytetty säilyvyys, deficient kontrolli, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	49
Kuvio 8. Kiihdytetty säilyvyys, kittikalibraattorit, pitoisuus ja niiden muutos (%).	50
Kuvio 9. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	51
Kuvio 10. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	52
Kuvio 11. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 3, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	53
Kuvio 12. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 4, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	54
Kuvio 13. Reaaliaikainen säilyvyys, tulokset käytönaikaisesta ja kuljetusrasitustesteistä.	57
Kuvio 14. Reaaliaikainen säilyvyys. Kontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	58
Kuvio 15. Reaaliaikainen säilyvyys, kontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	59
Kuvio 16. Reaaliaikainen säilyvyys, kittikontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	60
Kuvio 17. Reaaliaikainen säilyvyys, kittikontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	61
Kuvio 18. Reaaliaikainen säilyvyys, deficient kontrolli, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	62
Kuvio 19. Reaaliaikainen säilyvyys, kittikalibraattorit, signaalin keskiarvo ja niiden muutos eri aikapisteissä.	63
Kuvio 20. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	64

Kuvio 21. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	65
Kuvio 22. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 3, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	66
Kuvio 23. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 3, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.	67

Taulukot

Taulukko 1. GSP® Biotinidase kitin sisältö (Revvity, 2023).	10
Taulukko 2. Prosessikontrollit prosessissa A.	31
Taulukko 3. Prosessikontrollit prosessissa B.	33
Taulukko 4. Prosessikontrollit prosessissa C.	34
Taulukko 5. Verifiointierän komponenttilaadunvalvonnan tulokset.	37
Taulukko 6. Kokoomalevyjen valmisteluohje.	38

Käytetyt lyhenteet tai sanasto

\bar{x}	keskiarvo
$\pm 2SD$	Hyväksymisrajat, joiden sisään kuuluu 95 % tuloksista
cps	signaali (counts per second)
E_a	aktivaatioenergia (n. 83 736 J/mol)
k	nopeusvakio
k_2	vastaavuusaika
R	kaasuvakio (8,314 JK ⁻¹ mol ⁻¹)
s	keskihajonta/frekvenssitekijä
T	absoluuttinen lämpötila K (273,15 K + lämpötila °C)
v	variaatiokerroin (CV %)
Affiniteetti	Sitoutumiskyky
askites	Vatsaonteloon kertynyt neste.
BTD	Biotinidase (biotiini)
ELISA	Entsyymiavusteinen immunomääritysmenetelmä
ETA	Euroopan talousalue (http://www.europarl.europa.eu/factsheets/fi)
Fab	Vasta-aineen fragmentti, joka sisältää antigeenin vasta-aineen sitoutumiskohdan (Virella, 2019).
Fc	Vasta-aineen raskaista ketjuista muodostunut osa, johon sytotoksiset solut kiinnittyvät. Vasta-aineen kiteytyvä osa: c=crystallizing (Virella, 2019).
GSP®	Genetic Screening Processor (Revvity, 2023)
HFB	Onttokuitubioreaktori (Hollow-fiber-bioreactor)
Ig	immunoglobuliini
<i>in vitro</i>	Bioreaktorissa tai muualla isäntäorganismien ulkopuolella tapahtuva tuotto.

in vivo Isäntäorganismien sisällä tapahtuva tuotto.

Iteratiivinen prosessi, jota on mahdollista kehittää jatkuvasti eri prosessivaiheissa.

IVD *In vitro* diagnostics

mAb Monoklonaalinen vasta-aine, joka on spesifinen vain tiettyä antigeeniä vastaan.

OOS Out of specification. Vaatimusten täyttymättä jääminen. Tulos, joka ei ole ennalta määritettyjen spesifikaatioiden mukainen (Revvity, 2023).

Poikkeama Kun prosessissa havaitaan vikatila, jolla saattaa/olla vaikutusta valmistettavan tuotteen laatuun tai toimivuuteen käyttötarkoituksessaan (Revvity, 2023).

SA Streptavidin

Saske Synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontakeskus Turussa.

SOP Standard Operating Procedure. Menettelyohje. (Revvity, 2023).

Verifiointi Menetelmä, jolla varmistetaan, että tietyt, ennalta määritetyt kriteerit täyttyvät. Kertaluonteinen osoitus (Revvity, 2023).

1 Johdanto

Kehittämistehtävässä oli tarkoituksena tutkia ja selvittää, vaikuttaako komponenttitason tuotteessa käytetyn vasta-aineen tuottomenetelmän muutos lopputuotteen, eli asiakkaalla seulontatarkoitukseen tarkoitettun lääkinnällisen laitteen toimintaan. Tarve vasta-aineen tuottomenetelmän vaihtoon saatiin toimeksiantajalta Wallac Oy/Revvity Inc.:lta nykyisen tuottotavan epäeettisyyden vuoksi sekä vasta-aineen saatavuuden turvaamiseksi tulevaisuudessa.

Kehittämistehtävässä oli tarkoitus selvittää, millaisia riskejä sisältyy mikrotiitterilevyissä käytettävän vasta-aineen tuotantomenetelmän vaihdolla *in vivo*/askites -tuotosta *in vitro* -tuottoon, sekä tutkia, onko *in vitro* -vasta-aineella eroja säilyvyyden tai lopputuotteen laadun kanssa, verrattuna *in vivo* -vasta-aineella valmistettuun, nykyiseen tuotteeseen. Askites-vasta-ainetta tuotetaan isäntäeliön vatsaontelossa (*in vivo*-vasta-aine). *In vitro*-vasta-ainetta tuotetaan bioreaktorissa, eikä sen tuotanto vaadi elävää isäntäorganismia (Valdés, ym. 2012). Vasta-aineiden tuotantomenetelmät ovat kuvattuna tarkemmin luvussa 2.

Lopputuotteena on levykomponentin osalta päivitetty vastasyntyneiden seulonnassa käytettävä kitti, jolla kantapääverinäytteestä havaitaan biotinidaasin puutostila (BTD deficiency). Taulukkoon 1 on kuvattu GSP® Neonatal Biotinidase kitin sisältö, ja stripsilevyt, joihin tässä kehittämistehtävässä ollaan tekemässä muutosta, on lihavoituna. Kitin muut komponentit pysyivät muuttumattomina.

Taulukko 1. GSP® Biotinidase kitin sisältö (Revvity, 2023).

Komponentin nimi
Biotinidase Calibrators
Biotinidase Controls
Biotinidase Substrate Reagent
Biotinidase SA Reagent
Assay Buffer
Anti-Streptavidin Microtitration strips

Biotinidaasin puutostila on synnynnäinen aineenvaihduntasairaus, jolle on tunnusomaista kyvyttömyys hyödyntää ravinnon proteiiniin sitoutunutta biotiinia tai kierrättää endogeenista biotiinia karboksylaasikierrosta. Biotiinin puutos kehittyy asteittain, mikä johtaa tiettyjen biotiinista riippuvaisten karboksylaasien puutokseen. Sairaus on autosomaalinen resessiivinen ja yksilöillä, joilta puuttuu biotinidaasiaktiivisuus, on erilaisia oireita, joista kaikkia ei esiinny heti syntymän jälkeen, mikä osittain vaikeuttaa taudin diagnosointia. Hoitamattoman biotinidaasipuutteen oireet ilmaantuvat 3–6 kuukauden iässä, mutta puhkeamisaika on 1 viikon ikäisestä 10 vuoden ikään. (Kaye, 2006; Wolf, 2012).

Hoitamattoman, vakavan biotinidaasipuutostilan oireita ovat mm. hypotonia (alentunut lihasjänteys), kouristukset, sidekalvontulehdus, hengitysvaikeudet, ihottuma, hiustenlähtö, kuulon heikentyminen ja näköhäiriöt. Vanhemmilla lapsilla voi ilmetä kehityshäiriöitä. Hoito biotiinilla on kuitenkin osoitettu tehokkaaksi, mutta jos hoidon aloitus viivästyy liikaa, mahdolliset neurologiset vauriot eivät välttämättä parane täysin. (Kaye, 2006; Wolf, 2012).

Vasta-aineen tuottomenetelmän vaihtoa varten toimittajalta tilattiin *in vitro* -tuotettua vasta-ainetta, jonka toimivuus todennettiin verifiointissa yhdellä tuotantoerällä. Tuotteelle aloitettiin säilyvyystestit, joilla todennettiin tuotteen samankaltaisuus *in vivo* -valmistetun, referenssinä toimivan tuotteen kanssa. Tutkimuskysymys voitaisiin asetella seuraavasti: *”Onko lopputuote samankaltainen, kun levyjen valmistukseen käytetään eri tuottomenetelmällä valmistettua vasta-ainetta, kun lopputuotetta verrataan referenssinä toimivaan, nykyisellä vasta-aineella valmistettuihin levyihin?”*

Toimeksiantaja ostaa vasta-aineen ulkopuoliselta toimittajalta. Vasta-ainetta käytetään 96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen pinnoittamiseen.

1.1 Toimeksiantaja

Kehittämistehtävän toimeksiantajana toimi Turussa sijaitseva Wallac Oy. Wallac Oy on osa Revvity -konsernia (PerkinElmer vuoteen 2023 saakka). Turun toimipisteessä toimii yksi Revvityn suurimmista tuotekehitysyksiköistä, ja lisäksi yritys on keskittynyt erityisesti vastasyntyneiden harvinaisten synnynnäisten sairauksien seulontaan, seulontaan tarkoitettujen laitteiden valmistamiseen sekä tutkimuskäyttöön tarkoitettujen laitteiden, reagenssien ja ohjelmistojen valmistamiseen.

Levyvalmistus-linjastolla tuotetaan vasta-aineella päällystettyjä 96-kuoppaisia mikrotiitterilevyjä. Yhdessä kuopassa analysoidaan yksi potilasnäyte, jolloin yhdellä levyllä pystytään analysoimaan yhteensä 96 näytettä. Levyt tuotetaan automaattilinjastolla, hiukkaskontrolloidussa tilassa. Levyt eivät kuitenkaan ole steriilejä. Jokainen valmis levy saa IVD-tunnuksen. IVD-tunnuksella valmiille tuotteelle taataan sen toimivuus ja laatu *in vitro* -diagnostiikassa.

Kun levyvalmistuksessa on tuotettu levykomponentti, joka täyttää sille asetetut vaatimukset, valmiille tuotteelle suoritetaan vielä lopputesti, jonka tuloksena on valmis kitti, joka sisältää kaikki komponentit, jotta lopputuote toimisi käyttötarkoituksessaan. Lopputestissä valmiin kitin sisältämien komponenttien on osoitettu toimivan käyttötarkoituksessaan, ja sille kirjoitetaan sertifikaatti. Lopputestin jälkeen kittipakkaamo kokoaa lopputestauksessa hyväksytyn kitin, joka lähetetään asiakkaalle.

1.2 Lainsäädäntö

Euroopan Unioni on asettanut säädöksen, jolla pyritään tiukentamaan selkärankaisten eläinten käyttöä myös tieteen ja tutkimuksen tarpeisiin. (Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/ tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta).

Lainsäädännöstä on kirjoitettu myös ETA:n kannalta merkityksellinen teksti, direktiivin 2010/63 artiklassa 10: *"Vaikka elävien eläinten käyttö olisikin*

suotavaa korvata toimenpiteissä muilla menetelmillä, joihin ei liity elävien eläinten käyttöä, eläviä eläimiä on edelleen tarpeen käyttää ihmisten ja eläinten terveyden ja ympäristön suojelemiseksi. Tämä direktiivi edustaa kuitenkin merkittävää askelta kohti lopullista tavoitetta korvata elävillä eläimillä tieteellisiin tarkoituksiin ja opetustarkoituksiin tehtävät toimenpiteet kokonaisuudessaan heti, kun se on tieteellisesti mahdollista. Tätä varten siinä pyritään helpottamaan ja edistämään vaihtoehtoisten menetelmien kehittämistä. Lisäksi siinä pyritään varmistamaan niiden eläinten suojelun korkea taso, joita edelleen on käytettävä toimenpiteissä. Tätä direktiiviä olisi tarkasteltava säännöllisesti uudelleen tieteen ja eläinten suojelua koskevien toimenpiteiden kehityksen valossa.”
(Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/ tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta).

Koska askites kasvatetaan hiiren vatsaontelossa, ja täten aiheuttaa tarpeetonta kärsimystä hiirelle, oli tälle vasta-aineen tuottomenetelmälle etsittävä vaihtoehto. Puhdistamaton, hiiren askiteksesta eristetty vasta-aine tuotettiin EU:n ulkopuolella, jossa EU:n lainsäädäntö ei päde. Tuottomenetelmä ei siltikään ole eettinen eikä hyväksyttävä. Koska *in vitro*-tuotettua vastaavaa vasta-ainetta on jo kehitetty ja saatavilla vasta-aineen toimittajalta, päätettiin tätä uutta vasta-ainetta testata käyttötarkoituksessaan.

1.3 Vastasyntyneiden seulonta

Vastasyntyneitä seulotaan maakohtaisten seulontaohjelmien mukaisesti. Seulonnan tarkoituksena on tutkia mahdollisimman pian vauvan syntymän jälkeen kantapääverinäytteestä sellaisia aineenvaihduntasairauksia, tai muita vakavia synnynnäisiä sairauksia, joihin suurimpaan osaan on olemassa hoitokeino. Vaikka vain noin 1:4000 seulotusta vauvasta löydetään tällainen harvinainen sairaus, on sen varhainen diagnosointi ja hoidon aloitus ensisijaisen tärkeää, ennen oireiden alkamista ja hoidon onnistumisen vuoksi. Oikeaan aikaan aloitettu hoito voi parhaimmassa tapauksessa estää sairauden tai oireiden puhkeamisen, jolloin lapsi/perhe voivat elää normaalia elämää. (Lapatto, ym., 2018).

Suomessa vastasyntyneiltä otetaan VasSeu-seulontanäyte. Seulontanäyte otetaan noin 2–5 vrk:n ikäiseltä vauvalta kantapääverinäytteestä, joka imeytetään imupaperille. Imupaperin hyötynä on kuljetuksen ja säilytyksen helppous. Imupaperista näyte painetaan pienellä painantatyökalulla esimerkiksi mikrotiitterilevylle, jossa verinäyte liukenee näytepuskuriin. VasSeu:lla seulotaan Suomessa yleisimmin esiintyvät harvinaiset synnynnäiset sairaudet, jotka ovat *synnynnäinen kilpirauhasen vajaatoiminta, synnynnäinen lisämunuaisen liikakasvu, vaikea kombinoitu immuunivaje (SCID), sekä synnynnäisiä aineenvaihdunta sairauksia*. (Lapatto, ym., 2018).

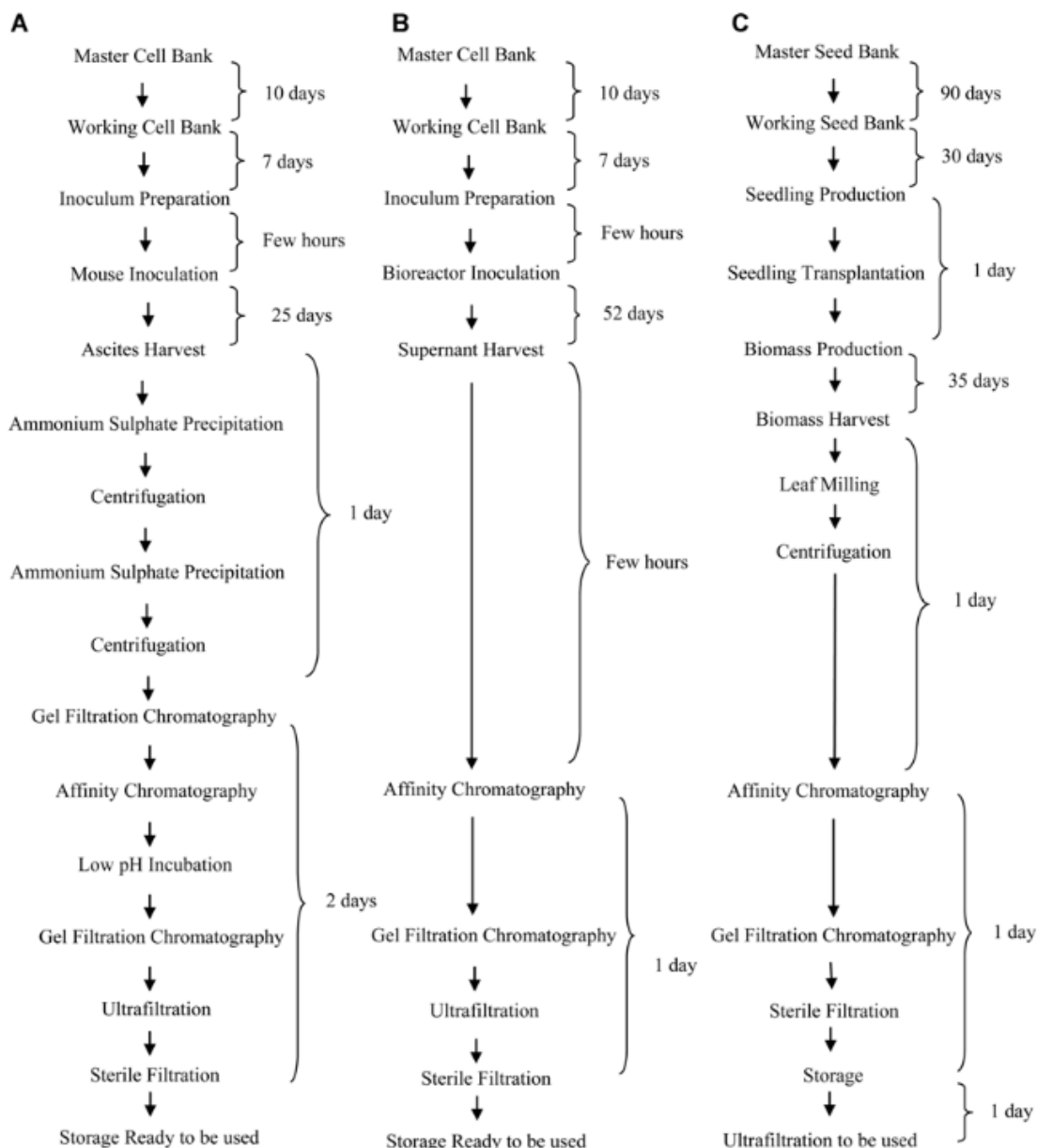
Seulontaan liittyvä näytteenotto tehdään ympäri maailmaa varsin samaan tapaan. Lapsesta otetaan vähintään 48 tunnin iässä kantapääverinäyte, joka imeytetään imupaperiin. Suomessa kuivattu näyte lähetetään Turun seulontakeskukseen, Saskeen, jossa analyysit suoritetaan soveltuvien menetelmin. Poikkeavista löydöksistä laaditaan lausunto, ja lääkäri ilmoittaa poikkeavat löydökset välittömästi puhelimitse vastaavalle lastenlääkärille synnytyssairaalaan. (Lapatto, ym., 2018).

Aineenvaihduntasairauksien seulonnan tarkkuus ja herkkyys ovat erinomaiset. Koska väärin negatiivisten määrä (tilanteet, joissa todellinen sairaus jäisi löytymättä) pyritään minimoimaan, poikkeavia tuloksia tulee myös väistämättä sellaisille vauvoille, joilla ei seulottavaa sairautta todellisuudessa ole (Lapatto, ym., 2018). Jos seulonnan tulos on vain lievästi poikkeava, tehdään yksi uusintatesti. Jos myös tämä uusittu seulontatesti on poikkeava, tai alkuperäinen testi on selvästi viitearvojen ulkopuolella, edetään diagnostisiin testeihin. (Niinikoski, ym., 2021). Joissakin tapauksissa lisäselvityksillä on niin kiire, että lapsi on kutsuttava päivystyksellisesti sairaalaan ja hoito aloitettava heti näytteiden ottamisen jälkeen, koska tauti voi edetä hyvinkin nopeasti. Tällaiset tapaukset ovat kuitenkin hyvin harvinaisia, sillä tilastollisesti Suomessa diagnosoidaan vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksia frekvenssillä 1:4000 (Lapatto, ym., 2018). Biotinidaasin puutostila (BTD) ei kuulu Suomessa seulottaviin aineenvaihduntasairauksiin (TYKS, 2024).

2 Vasta-aineet

Vasta-aineet ovat immuunijärjestelmässä esiintyviä proteiineja, joita hyödynnetään erilaisten sairauksien diagnosointiin, sekä immuunipuutostilojen ja syöpien hoidossa. Vasta-aineista puhuttaessa käytetään yleisesti termiä immunoglobuliini (Ig), ja niille on tunnistettu viisi alaluokkaa: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. (Zheng & Shameem, 2014). Erityisesti monoklonaalisia vasta-aineita hyödynnetään paljon diagnostiikassa niiden spesifisyyden ja pitkän puoliintumisajan vuoksi (Milstein & Cuello, 1983, 538). Tässä kehittämistehtävässä kiinnostuksen kohteena oleva vasta-aine kuului luokkaan IgG, joten erityisesti niiden rakenteeseen tutustutaan tässä kappaleessa lisää.

Valdés ym., (Valdés ym., 2012) tutkivat artikkelissaan monoklonaalisia vasta-aineita (mAb), jotka oli tuotettu eri tuottomenetelmiä käyttäen. Tutkimuksessa vertailtiin askites-tuotantoa hiiressä, onttokuitureaktori-tuotantoa ja mAb:n tuotantoa transgeenisissa kasveissa. Kuvassa 1 (alla) on esitetty artikkelissa tehty vertailu, jossa A on hiiren askites-nesteestä eristetyin valmiin mAb:n valmistus, B on onttokuitubioreaktorissa (HFB; hollow-fiber-bioreactor) valmistetun mAb:n valmistusprosessi ja C kuvaa transgeenisessä kasvissa valmistetun mAb:n valmistusprosessia (Valdés, ym., 2012).



Kuva 1. Eri tuotantotapojen vertailu. Valdés (2012).

Kuvan 1 prosessikaavio A on kestoltaan 45 vrk ja muutamia tunteja, prosessikaavio B 70 vrk ja muutamia tunteja ja prosessikaavion C mukaan valmistettu mAb olisi valmista noin 159 vrk:n kuluessa. Valdés ja muut analysoivat myös kvalitatiivisesti eri tuotantotapoja. He arvioivat, että vaikkakin askites-nesteestä saatu mAb oli volyymiltaan suurin, kun tarkasteluajavälinä pidettiin prosessikaavion C (transgeeniset kasvit) tuotantotapaa, oli sen valmistaminen kuitenkin kaikkein työläin, kallein ja epäeettisin metodi mAb:n

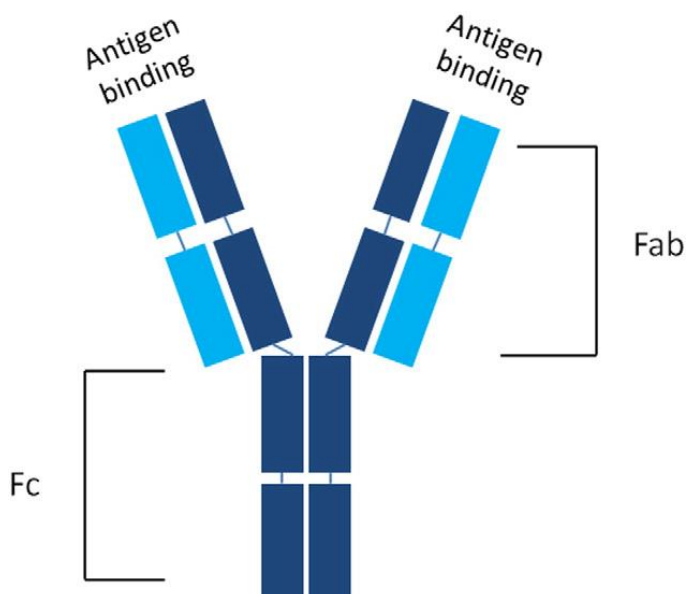
tuottamiseen. Artikkelissa otettiin kantaa onttokuitubioreaktoreiden hyötyihin. Näitä olivat erityisesti tuotetun mAb:n laatu; siinä missä askites-tuotettu vasta-aine oli 1,4 -kertaisesti konsentroitunutta, oli HFB konsentroitunut 10,0 -kertaiseksi. mAb:n tuotanto trangeenisissa kasveissa havaittiin tehottomimmaksi, sekä tuotanto oli myös kalliimpaa verrattuna bioreaktorissa tuotettuun mAb:hen.

HFB:tä voidaan pitää parhaimpana vaihtoehtona askites-tuotetulle mAb:lle, koska loppupään prosessointi oli helppoa, laitostilan tarve oli vähäisempää, vasta-aineen talteen ottaminen oli yksinkertaista, tuotettu vasta-aine oli puhdasta, sekä prosessi oli helppo validoida (Valdés ym., 2012).

2.1 IgG-vasta-aineen rakenne

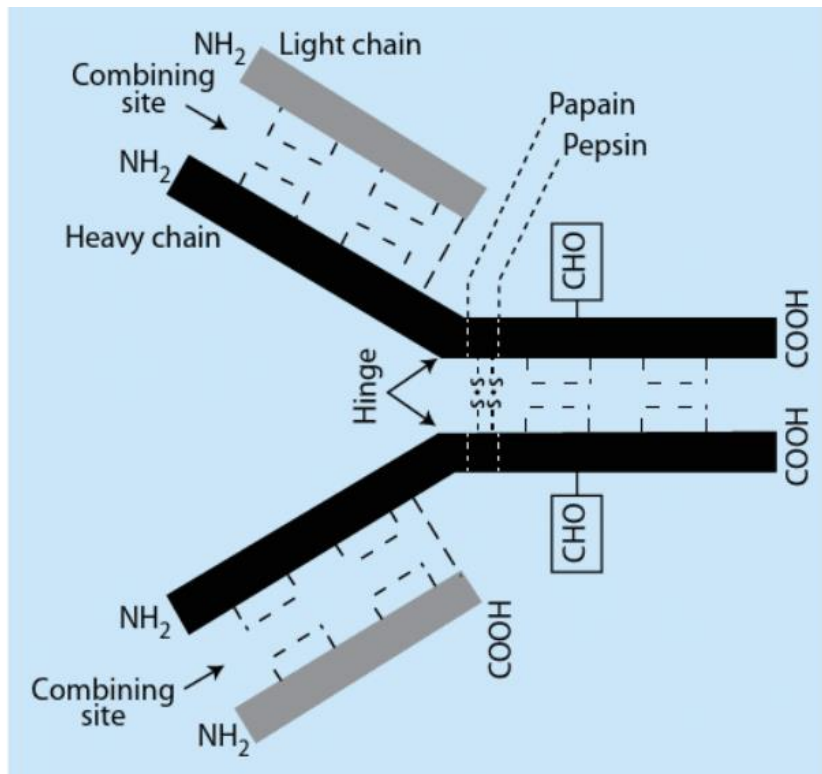
Immunoglobuliinit ovat erikoistuneita glykoproteiineja, jotka ovat muodostuneet B-lymfosyyteissä. Immunoglobuliineja tavataan solukalvoon kiinnittyneessä muodossa, B-lymfosyyttien pinnalla, missä ne toimivat osana antigeenien reseptoreja. Kun lymfosyytti on aktivoitu ja erikoistunut, samanaikaisesti immunoglobuliini, jolla on sama antigeeninen spesifisyys, erittyy kypsän plasmasolun sisään niin sanotuksi kiertäväksi vasta-aineeksi.

IgG-luokan vasta-aineet ovat ihmisen seerumissa sekä suurimmassa osassa nisäkkäiden seerumia yleisimmin esiintyviä vasta-aineita. Kun puhdistettu IgG inkuboidaan proteolyyttisen entsyymin kanssa, jakautuu molekyylillä kahdeksi fragmentiksi, jotka eroavat toisistaan varauksen, antigeenisyyden, biokemiallisten ominaisuuksien ja biologisten toimintojen suhteen. Yksi fragmenteista sisältää vasta-aineen sitoutumiskohdan ja tästä syystä tämä alue nimetään Fab:ksi (fragment; antibody binding), kun taas toinen fragmentti havaittiin kiteytyvän ja tästä syystä siitä alettiin käyttää nimitystä Fc (fragment; crystallizing) (Virella, 2019, 55). (Mak, ym, 2005). Kuvassa 2 (alla) on kuvattuna vasta-aineen perusrakenne.



Kuva 2. IgG vasta-aineen rakenne. Groff, ym. (2015)

Jos IgG-vasta-aine puhdistetaan sellaisella tekniikalla, jolla on mahdollista erotella proteiineja koon mukaan (esim. geelisuodatus), ja joka pystyy erottamaan ei-kovalenttiset sidokset, saadaan tulokseksi kaksi eri fraktiota. Toinen fraktioista vastaa sellaista polypeptidiketjua, jonka molekyylipaino on 55 000 ("raskas ketju") ja toinen vastaa kooltaan sellaista polypeptidiketjua, jonka molekyylipaino on 23 000 ("kevyt ketju"). (Virella, 2019, 56). Kuvassa 3 alla on kuvattuna tarkemmin IgG-molekyylin rakenne, josta näkyvät Fab ja Fc-alueet. Fab-alue koostuu sekä raskaista ketjuista että kevyistä ketjuista, kun taas Fc-alue koostuu ainoastaan raskaista ketjuista.



Kuva 3. IgG-molekyylin perusrakenne. Virella (2019).

Kun puhdistettua IgG:tä inkuboitii proteolyttisen entsyymin kanssa, havaittiin tämän entsyymin pilkkovan raskaat ketjut sarana-alueelta (kuvassa 3 "Hinge"), joka johtaa kahden Fab-fragmentin ja yhden Fc-fragmentin muodostumiseen IgG-molekyylissä. Kaikilla Ig-molekyyleillä on sama perusrakenne: kaksi identtistä antigeeniä tunnistavaa kohtaa Ig-molekyylin kärjissä (Fab-alue), sekä Fc-alue, jolla Ig-molekyyli kiinnittyy solun pintaan. Monoklonaalisen vasta-aineen spesifisyys on sen Fab-fragmentissa, kun taas Fc-fragmentti on hyvin samankaltainen eri monoklonaalisilla vasta-aineilla, jotka on tuotettu toisiaan vastaavalla solulinjalla. (Virella, 2019).

2.2 Monoklonaaliset vasta-aineet

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat hyvin spesifejä ja tunnistavat kohteensa suurella tarkkuudella. Monoklonaalisia vasta-aineita (mAb) voidaan valmistaa joko *in vivo* -tai *in vitro* -tuotettuna. *In vivo* -tuotossa hyödynnetään isäntänä

eläintä, tavallisimmin hiirtä, jonka sisällä vasta-ainetta tuotetaan. Eläimen pernasta eristetään immunosoluja, jotka risteytään syöpäsolujen kanssa. Näin valmistetusta hybridoomasolusta saadaan ”kuolematon”, jolloin solu kasvaa ja jakaantuu rajattomasti. Tästä fuusioituneesta solusta syntyvästä kasvaimesta käytetään termiä hybridooma, ja se erittää toivottua mAb:ta.

(National Research Council ym., 1999)

Jotta valittu hybridoomasolulinja kasvaa ja alkaa erittämään mAb:tä, se on ensin injektoitava hiiren vatsaonteloon. Siellä hybridoomasolut jakaantuvat ja tuottavat nestettä (askites) vatsaan. Tämän nesteen mAb-pitoisuus on hyvin korkea. Askites-menetelmän hyötynä on edullisuus ja menetelmän helppous. Valitettavasti tämä tuottotapa aiheuttaa isännälle usein kipua, varsinkin jos askitestä erittyy hyvin paljon tai jos hybridoomasolulinjaan on valittu aggressiivinen syöpäsolu. Lainsäädäntö kehottaakin, että jos vasta-aineen tuottotapa aiheuttaa turhaa kipua ja kärsimystä, on etsittävä vaihtoehtoinen tuotantomenetelmä. (National Research Council ym., 1999.)

2.3 Tuottomenetelmät

Vasta-aineita voidaan valmistaa joko isäntäsolussa tai vaihtoehtoisesti bioreaktoreissa (*in vitro*). Kun tuotto tapahtuu isännän, kuten hiiren sisällä, puhutaan *in vivo* -tuotosta. Monoklonaalinen askites-vasta-aine, jota kehittämistehtävässä oltiin vaihtamassa vastaavaan *in vitro* -tuotettuun vasta-aineeseen, oli valmistettu injektoimalla hiiren vatsaonteloon hybridoomasolulinjaa, joka alkoi erittää vatsaonteloon nestettä, askitesta. (National Research Council ym., 1999).

In vitro on latinaa ja tarkoittaa ”pullossa”. Tällaisissa tuottomenetelmissä vasta-ainetta tuotetaan elävän organismin ulkopuolella, mutta kasvatusta voi silti tapahtua solun sisällä, bioreaktorissa. Vaihtoehtoinen *in vitro*-vasta-aine kasvatettiin bioreaktorissa.

Kehittämistehtävässä oli tarkoituksena todentaa lopputuotteen, eli kitin, toimivuuden ja turvallisuuden pysyvän ennallaan, kun vasta-aineen tuotantomenetelmä vaihtui *in vivo*:sta *in vitroon*.

Olemassa olevan tuotteen valmistukseen käytettävää askites-vasta-ainetta tuotetaan EU:n ulkopuolella eläinlaboratoriossa hiirissä, ja eristetty, puhdistamaton vasta-aine kuljetetaan Suomeen puhdistettavaksi ja myytäväksi. Vasta-aineen toimittaja on kuitenkin tarjonnut heillä tuotettua vaihtoehtoista *in vitro* -vasta-ainetta, jonka saatavuus on turvatumpaa, eettisempää ja eri vasta-aine-erien välinen laadun vaihtelevuus pienempää, sillä bioreaktorissa tuotetun vasta-aineen tuotanto-olosuhteet ovat kontrolloidummat kuin askites-tuotetun vasta-aineen. Bioreaktorituoetta varten valmistetaan solupankki, jolloin lähtömateriaalina on aina toisiaan vastaavat soluampullit ja prosessista saadaan näin toistettava.

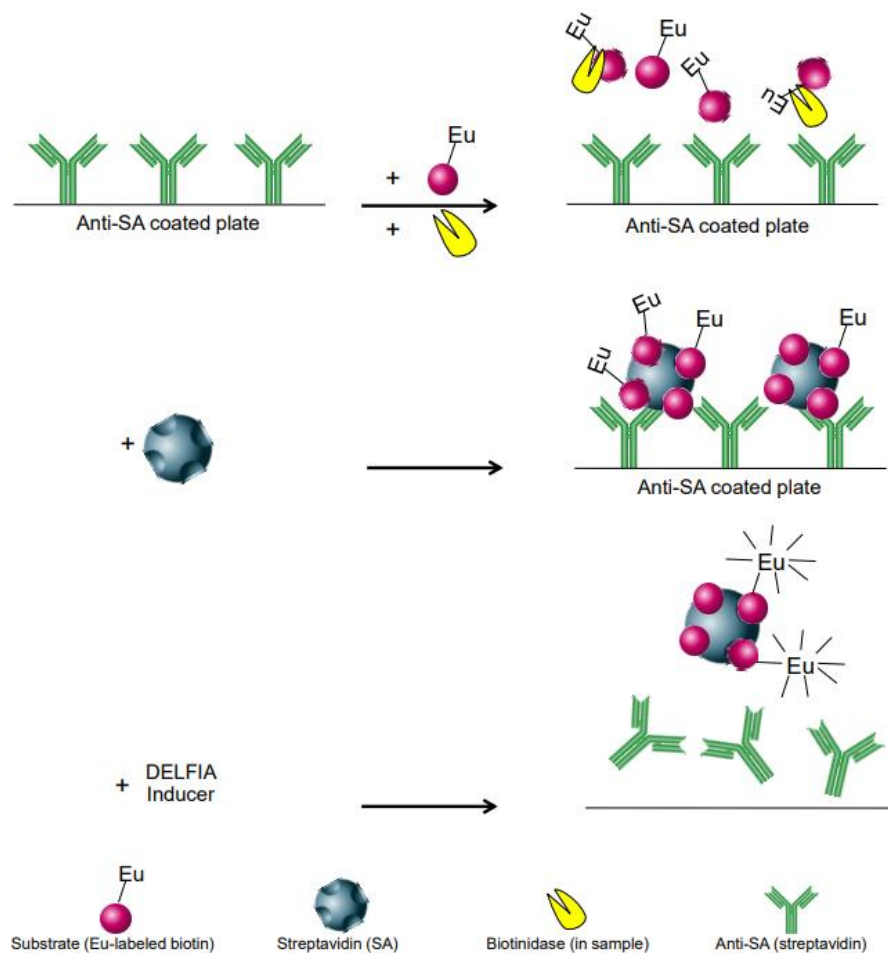
2.4 *In vitro* -vasta-aineen hyödyt

Kun kyseessä on lääketeollisuudessa laajamittaiset tuotantoskaalat, valitaan useimmiten *in vitro* -menetelmät, koska viljely on helpompaa verrattuna isäntäeläinten käyttöön ja taloudellisesti *in vitro*-vasta-aineen käyttö tulee askites -vasta-ainetta halvemmaksi. Ei ole myöskään tarvetta eläinlaboratoriolle, eikä eläinten käsittelyyn perehtyneille laboranteille. *In vitro* -tuotantomenetelmissä, joissa käytetään puoliläpäiseviä kalvopohjaisia bioreaktoreita, tuotetun mAb:n pitoisuudet ovat usein yhtä korkeat kuin askitesnesteessä, ja niissä ei ole hiiren askitesnesteelle tyypillisiä epäpuhtauksia. (National Research Council ym., 1999; Bruce, ym., 2002, 59-68).

2.5 Määrityisperiaate

Kiinnostuksen kohteena oleva vasta-aine on Monoclonal mouse anti-Streptavidin. *In vitro* -vasta-aine kasvatetaan siis hiiren hybridoomasolulinjassa,

joka on adaptoitu siten, että se kykenee kasvamaan bioreaktorissa. Kuvassa 4 (alla) on esitettynä määrittysperiaate. Kuva on tuotteen GSP® Neonatal Biotinidase kit tuoteselosteesta, joka lähetetään asiakkaille valmiin kitin kanssa (Revvity, 2023).



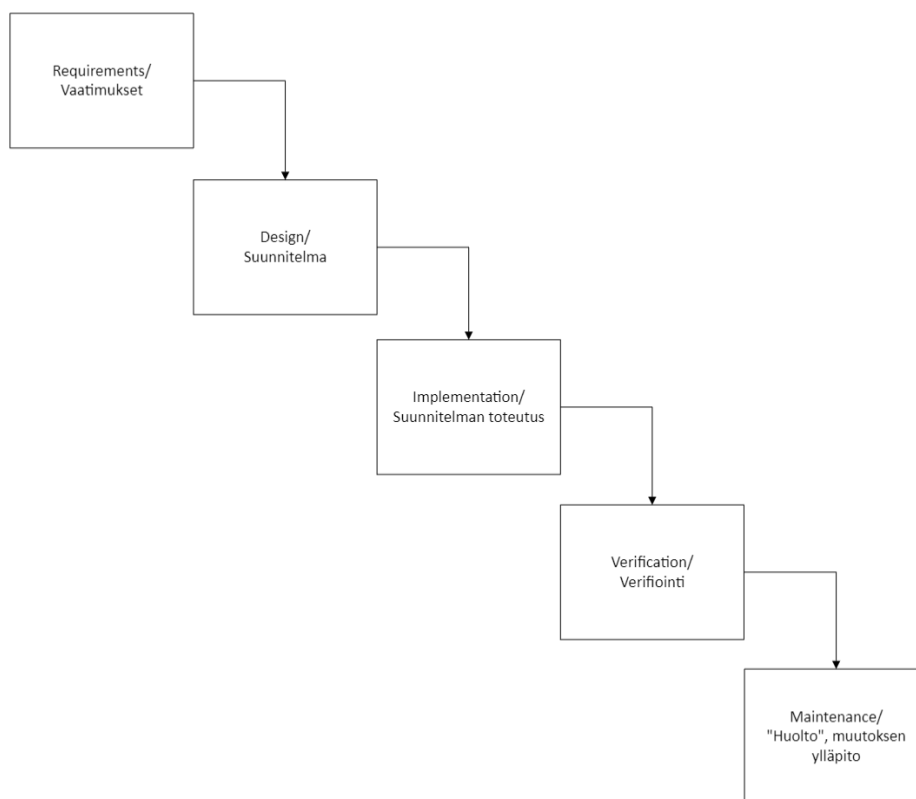
Kuva 4. GSP Neonatal Biotinidase määrittysperiaate. Revvity (2023).

Määrittäksessä yhdistyy entsyymireaktio sekä aikaerotteinen immunofluoresenssimäärittäminen. Määrittäminen perustuu biotinidaasientsyymien kykyyn katkaista amidisidos Eu-leimatussa biotiinissa. Entsyymireaktio pysäytetään lisäämällä streptavidiniä, jolla on korkea affiniteetti (kiinnittymiskyky) biotiiniin (tässä tapauksessa joko vapaaseen biotiiniin tai Eu-leimattuun biotiiniin). (Ricci, ym., 2021). Streptavidini-biotiini-kompleksit pysäytetään streptavidiniä vastaan suunnatulla kiinteäfaasisella monoklonalisella vasta-aineella, joka on

kiinnittyneenä kuoppalevyn pinnalle. DELFIA® Inducer hajottaa molekyylit liuokseen, josta Europiumin fluoresenssi mitataan. Mitattu fluoresenssi on kääntäen verrannollinen näytteen biotinidaasiaktiivisuuteen. (Revvity, 2023).

3 Tutkimusmenetelmä

Kehittämistehtävän ratkaisemista varten hyödynnettiin vesiputousmallia. Sen kehittäjänä pidetään Winston Roycea, joka esitteli vesiputousmallin konferenssissa vuonna 1970. Vaikkakin tämä kyseinen tutkimusmenetelmä on kehitetty aikanaan ohjelmistojen kehittämiseen, se on toimiva myös muissa kehittämis-/tutkimusprojekteissa. Vesiputousmallia on hyvä hyödyntää silloin, kun projekti alkaa suunnitteluvaiheesta, ja jonka jokainen suoritettu osa ”vesiputousta” aloittaa seuraavan prosessin. Vesiputousmalli voi olla myös iteratiivinen, ja tätä tutkimusmenetelmää käytetään usein hieman mukaillen. (Bassil, 2012). Alla on esitettynä kuva 5, miten projektin vaiheet kulkevat vesiputousmallissa.



Kuva 5. Perinteinen vesiputousmalli, muokattu Royce (1970).

Vesiputousmallin hyödyntäminen alkaa yleisimmin vaatimuksien määrittelyllä. Kehittämistehtävän mielenkiinnon kohteena olevalla lopputuotteella on tarkat vaatimukset, jotka sen täytettävä, jotta tuote olisi laadukas, turvallinen ja toimiva käyttötarkoituksessaan. Kuvan 5 ”design” tarkoittaa joko tuotteen ulkomuotoa ja sitä, millaisena asiakas kokee tuotteen käytön, tai tutkimusvaiheen suunnitteluosiota. Ensimmäinen vaihtoehto koskee enemmän ohjelmistonkehittämisen tai palvelumuotoilun työkaluja, joten sovellettuna tähän kehittämistehtävään design-vaiheessa on tarkoituksena koota esitietoa, ja tehdä suunnitelma, jonka pohjalta tutkimusta lähdetään ajamaan eteenpäin (Bassil, 2012).

”Implementation”-vaiheessa edetään hyväksytyn suunnitelman mukaisesti, ja ”verification”-vaiheessa edellisen vaiheen työn tuloksista kootaan yhteen tulokset, tarkastellaan suunnitelman onnistumista ja mahdollisesti verifioidaan muutos. Verifiointin tilalla voi olla suuremmassa projektissa esimerkiksi prosessivalidointi. ”Maintenance”-vaihe, eli ”huoltovaihe” on muutoksen jälkeistä aikaa. Tällöin tutkitaan tuotteen tai muutetun prosessin tilaa, ja sitä voidaan tarpeen mukaan muokata. Jos muokkausta vaaditaan, aloitetaan projekti vesiputousmallin mukaisesti mallin ylimmältä tasolta. (Bassil, 2012)

4 Verifiointiin liittyvä taustatyö

Kehittämistehtävä aloitettiin keräämällä aikaisempi tutkimustieto yhteen, keskustelemalla tuotekehityskemistien kanssa, sekä tutkimalla valmistajan alustavia raakadatoja. Koska *in vivo*- ja *in vitro*- tuotetut vasta-aineet olivat raakadata-vertailujen osalta affiniteetiltään lähes samat, todettiin yhden verifiointierän, sisältäen säilyvyystutkimukset, olevan riittävä osoittamaan valmiin lopputuotteen toimivuus.

Verifiointin tarkoituksena on todentaa tuotteen toimivuus muutoksen myötä, kun tuotteella on jo olemassa olevat, valmiit, sille asetetut käyttötarkoitukset, sekä kriittiset parametrit. Vesiputousmallia on paras hyödyntää juurikin sellaisissa tilanteissa, kun lopputuotteella on tarkat, ennalta määritetyt vaatimukset (Bassil, 2012). Verifiointilla voidaan muuttaa tai tutkia joko tuotteen rakennetta, yhtä valmistusvaihetta tai muuta kriittistä valmistusvaihetta, ja sitä varten valmistetaan yleisesti joko yksi tai useampi verifiointierä, sekä referenssierä olemassa olevilla raaka-aineilla sekä valmistusprosesseilla, jolloin saadaan vertailukohde, johon tuotteessa tai prosessissa muutettavaa asiaa on tarkoitus verrata.

Kehittämistehtävässä laadittiin verifiointisuunnitelma, jossa kuvattiin työn tarkoitus, työn laajuus, riskianalyysi, suunnitelma teknisestä toteutuksesta, säilyvyystestausten aloitus ja toteutus, työn vastuuhenkilöt, kustannukset ja aikataulu. Lisäksi suunnitelmassa määriteltiin verifiointin hyväksymiskriteerit, sekä mahdollisten poikkeamien käsittely. Verifiointisuunnitelma katselmoitiin ja hyväksyttiin ennen toteutusvaiheen aloitusta.

Työn toteutusvaiheessa valmistettiin yksi verifiointierä suunnitelman mukaisesti. Kun kaikki verifiointille asetetut hyväksymiskriteerit täyttyivät, implementoitiin muutos suunnitelman mukaisesti verifiointiraportin hyväksynnän jälkeen. Implementoitava muutos oli kehittämistehtävässä vaihtaa tuotteen GSP® Neonatal Biotinidase kit valmistuksessa käytettävä vasta-aine. Muutokset implementoitiin ja muutos koulutettiin asianomaisille henkilöille toimeksiantajan laatujärjestelmän muutoshallinnan mukaisesti.

Alustavaa tutkimustyötä aloitettiin jo hieman aikaisemmin ennen kuin kehittämistehtävää ja projektia alettiin toteuttamaan. Wallac Oy:n tuotteissa käytettävät kemikaalit, komponentit ja materiaalit ovat lähes kaikki identifioitu toiminnanohjausjärjestelmään, jossa hallinnoidaan nimikkeiden varastomäärää, sekä muita tarpeellisia toimintoja. Projekti aloitettiin tutkimalla toiminnanohjausjärjestelmästä kiinnostuksen kohteena olevan vasta-aineen nykyistä materiaalispesifikaatiota. Materiaalispesifikaatiossa määritellään materiaalin kriittiset ominaisuudet, pitoisuus, yksikkö, sekä ilmoitetaan materiaalin valmistaja, valmistajan tuotenumero ja alkuperämaa.

Tämän vasta-aineen omistajaksi/asiantuntijaksi oli ilmoitettu Wallac Oy:n tuotekehityksessä työskentelevä kokeneempi kemisti, jota lähestyttiin aiheella. Hänelle esiteltiin vasta-aineen toimittajan tarjoama vaihtoehtoinen *in vitro*-tuotettu vasta-aine, sekä valmistajan raakadata *in vivo* vs. *in vitro* arviointia varten. Raakadatassa oli verrattu keskenään *in vivo*- ja *in vitro*- vasta-aineita. Vertailukohteena oli vasta-aineen toimittajalta saadut *in vivo* ja *in vitro* -vasta-aineiden affiniteetit eli sitoutumiskyvyt ja ELISA-testien tulokset. (Henkilökohtainen tiedonanto, Pekka Mattsson ja Teemu Korpimäki. 30.06.2021).

Kahdessa eri lämpötilassa varastoituja *in vivo*- ja *in vitro*-vasta-aineita verrattiin keskenään eri aikapisteissä ja affiniteeteista piirrettiin kuvaaja. Michaelis-Mentenin yhtälöön sovitettuna saatiin affiniteettivakion arvio. Affiniteettivakiot olivat lähes identtiset, joten alustavat riskit vasta-aineen tuottomenetelmän vaihdolle lopputuotteen toimivuuden kannalta katsottiin hyvin pieniksi. Tuotekehityskemistin arvion mukaan tarvetta suurelle, tuotekehityksen suorittamalle vastaavuusverifiointille ei ollut, jolloin tuotannossa toteuttava, vähemmän työläämpi, yhdellä erällä osoitettava verifiointi olisi riittävä. (Henkilökohtainen tiedonanto, Pekka Mattsson ja Teemu Korpimäki. 30.06.2021).

5 Verifioinnin toteutus ja tulokset

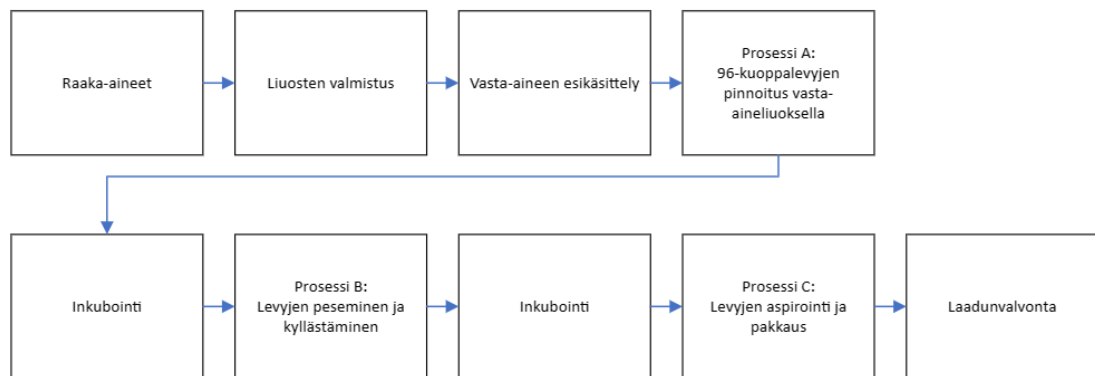
Kun verifiointisuunnitelma oli hyväksytty 08.02.2023, aloitettiin työn tekninen toteutus. Vasta-aineen vaihtoa varten laskettiin, kuinka paljon *in vitro* -vasta-ainetta tarvittiin yhden verifiointierän valmistukseen, kun valmistettiin kyseisen levynimikkeen validoitu maksimieräkokko. Vasta-aineen valmistajalta pyydettiin tarjous, jonka mukaisesti vasta-aine tilattiin. Vasta-aineella oli vaatimuksena tietty vähimmäispitoisuus, joka ilmoitettiin valmistajalle, sekä tietty säilöntäainevaatimus.

Kun vasta-aine saapui, varmistettiin, että kuljetusolosuhteet olivat vaaditussa (+ 2 °C - + 8 °C) lämpötilassa. Tilattu vasta-aine vastasi tilausta, ja vähimmäispitoisuus sekä säilöntäainevaatimus täyttyivät.

Levyvalmistusprosessissa on kolme valmistusvaihetta: prosessi A, B ja C. Levyraaka-aine eli 96-kuoppalevy ostetaan kvalifioidulta valmistajalta ostosopimuksen mukaan, ja levyt on valmistettu toimeksiantajan tarpeisiin. Levyt käsitellään automatisoiduilla valmistuslinjastoilla, ja prosessivaiheiden A ja B sekä B ja C välissä levyt inkuboidaan. Inkubointi tapahtuu tuotteen mukaan joko huoneenlämmössä tai n. +36 °C:ssa. Inkubointiaika on tuotekohtainen.

Prosessissa A levyn kuoppiin annostellaan vasta-ainetta sisältävä kouttausliuos, sekä levyille printataan tuotekohtainen viivakoodi sekä selkokielineen teksti. Prosessissa B kouttausliuos poistetaan kuopista, ja levyt pestään tuotekohtaisten reseptien mukaan. Prosessin B lopuksi levyille annostellaan sokeripitoista kyllästysliuosta, jonka jälkeen levyjä inkuboidaan tuotekohtaisen reseptin mukaan. Prosessissa C levyjen kuopat aspiroidaan kuiviksi ja levyt pakataan erillisellä pakkauslinjastolla.

Kuvassa 6 on esitetty levyvalmistusprosessin vuokaavio.



Kuva 6. Levyvalmistuksen prosessin vuokaavio.

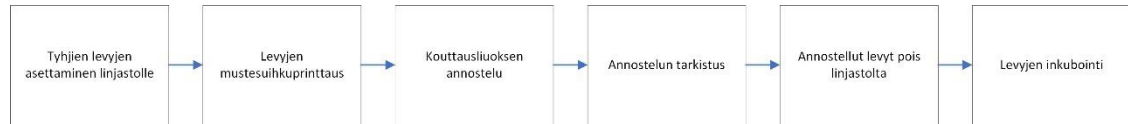
Verifiointisuunnitelman lisäksi suunnitteluvaiheessa luonnosteltiin eräohjedraft, jonka mukaan verifiointierä valmistettiin. Jokainen tuotettu levyerä tuotetaan oman eräohjeensa mukaan, joka toimii ikään kuin päiväkirjana tietyn eränumeron levyerälle. Siitä käyvät ilmi valmistuksessa käytetyt raaka-aineet ja niiden määrät, tarvittavat laskutoimitukset, jokaisen prosessivaiheen (A, B ja C) valmistuksen kriittiset parametrit, inkubointiolosuhteet, sekä lopulta erälle suoritettu laadunvalvonta tuloksineen.

Verifiointia varten valmistettiin yksi verifiointierä maksimieräkoolla. Liuosten valmistus aloitettiin 13.02.2023. Verifiointierän ero normaaliin tuotantoerään oli käytetty vasta-aine, muut valmistusvaiheet ja raaka-aineet pysyivät muuttumattomina.

Valmistus toteutettiin kuvassa 6 esitetyn vuokaavion mukaisesti. Ensin varmistettiin, että verifiointierän valmistukseen tarvittavia raaka-aineita oli riittävästi. Levyvalmistuksen tuotantotiloissa toimii oma liuosvalmistustila, jossa valmistetaan kaikki levyvalmistuksen tarvitsemat liuokset. Seuraavaksi valmistettiin vasta-aineliuos, jonka valmistuksessa oli käytetty *in vitro* -vasta-ainetta. Vasta-aineliuoksesta käytetään talon sisäisesti termiä kouttausliuos. Kouttausliuokset ovat yksinkertaisia fosfaattipuskureita, joihin lisätään liuoksen valmistusvaiheen lopussa haluttu esikäsitelty vasta-aine. Myös muut tarvittavat käyttöliuokset valmistettiin liuosvalmistustilassa.

5.1 Prosessivaihe A

Kuvassa 7 on esitetty prosessin A yleinen vuokaavio.



Kuva 7. Prosessin A (kouttausvaihe) vuokaavio.

Prosessivaihe A aloitettiin samana päivänä, kun vasta-aineliuos oli valmistettu. Automatisoitu tuotantolinja, johon oli integroitu pumpputorniannostelija, annosteli levyille tarkan, eräohjeen ilmoittaman määrän vasta-ainetta sisältävää kouttausliuosta. Ennen verifiointierän valmistuksen aloittamista, tämä annosteltu liuosmäärä varmistettiin oikeaksi punnitsemalla stripsilevyjen stripsit analyysivaaka’alla. Tyhjien levyjen/stripsien paino, joita käytettiin punnituslevyinä, oli punnittu ennen erän valmistuksen aloittamista. 96-kuoppalevy koostuu erillisestä kehyksestä, johon kiinnitetään 8 irtostripsiä, joissa kussakin on 12 kuoppaa/kaivoa. Tyhjät stripsit punnitaan ennen erän valmistusta, jolloin saadaan liuosta punnittaessa tulos, joka on 12 kuopan keskiarvo. Kuoppalevyille annostellaan kouttausliuosta kuitenkin sellainen määrä, josta on mahdollista havaita visuaalisesti pienetkin eroavaisuudet. Tuotantolinja, pumpputornit sekä analyysivaaka olivat verifiointierän valmistuksen aikana kvalifioituneet ja kalibroidut.

Alun punnituksen jälkeen verifiointierän valmistus aloitettiin. Jokaisen levyn kehykseen printattiin mustesuihkutulostimilla yksilöivä, selkokielineen teksti, sekä kehyksen toiselle puolelle viivakoodi määrityksessä käytettävien GSP® -laitteiden viivakoodinlukijaa varten. Myös viivakoodien lukeutuvuus varmistettiin lukemalla viivakoodit GSP®-laitteilla ennen erän valmistuksen aloittamista.

Kun sekä viivakoodin toimivuus että annostelun tasaisuus saatiin varmistettua, aloitettiin verifiointierän valmistus. Automaattilinjaston ollessa käynnissä, levyjen annostelun oikeellisuus varmistettiin jokaiselta levyltä erillisellä ultraäänilukijalla, joka tarkisti jokaisen levyn kuopalle annostellun liuoksen olevan

levynimikekohtaisissa toleransseissa. Lisäksi prosessia kontrolloitiin erän valmistuksen aikana punnitsemalla liuoksen määrä erän alussa, keskellä ja lopussa. Linjastoon kuuluva viivakoodinlukija tarkisti jokaisen levyn viivakoodin laadun. Linjastolle syötettiin tyhjiä, tarkastettuja levyjä, jotka annostelun päätteeksi siirtyivät linjaston toiseen päähän, josta operaattorit siirsivät levyt inkuboitumaan reseptinmukaisiin olosuhteisiin eräohjeessa ilmoitetun ajan mukaisesti. Verifiointissa näihin ei tehty muutoksia. Alla esitetyt taulukot 2-4 kuvaavat prosessikontrolleina toimivien punnituslevyjen tuloksia. Punnituslevyn sisäiseen hajontaan (CV %) on käytetty kaavaa (1). Hajonnasta käytetään myös termiä variaatiokerroin, joka ei ole sidottu tiettyyn mittayksikköön.

$$v = s/\bar{x} \cdot 100\% \quad (1)$$

missä v on variaatiokerroin, s on keskihajonta ja \bar{x} keskiarvo.

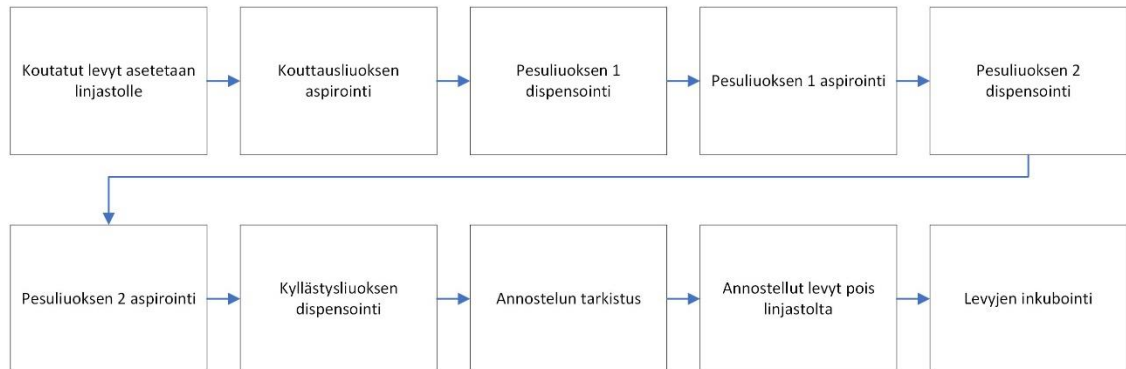
Taulukko 2. Prosessikontrollit prosessissa A.

Punnituslevy	ka / 8 stripsiä (µL)	Punnituslevyn sisäinen hajonta (CV %)
Erän alusta	203,2	0,2
Erän puoliväli	202,9	0,3
Erän lopusta	203,2	0,3

Taulukossa 2 on kuvattu prosessin A valmistuksen aikaiset punnituslevyt, jotka toimivat prosessikontrolleina. Hyväksymisraja annostilavuudelle oli reseptin mukainen annostelutilavuus $\pm 5 \mu\text{L}$ / kuoppa. Punnituslevyjen sisäiselle hajonnalle (CV %) ei ole asetettu rajoja, mutta koska tulokset ovat hyvin matalat, voidaan sanoa annostelun olleen hyvin tasainen.

5.2 Prosessivaihe B

Kuvassa 8 on esitetty prosessin B yleinen vuokaavio.



Kuva 8. Prosessin B (pesu-kyllästysvaihe) vuokaavio.

Prosessivaihe B aloitettiin, kun ennalta määritetty, prosessin A jälkeinen inkubointiaika oli täyttynyt. Prosessivaihe B suoritettiin samalla automaattilinjastolla kuin vaihe A, mutta eri reseptillä. Automaattilinjastolle asetetut reseptin parametrit vaikuttavat levyjen käsittelyyn linjastolla, sekä osaltaan myös valmiiden levyjen laatuun. Resepteihin ei tehty muutoksia verifiointissa. Prosessivaiheessa B levyiltä imettiin edellisen vaiheen koutausliuos pois, jonka jälkeen levyille annosteltiin pesuliukuksia, jotka imettiin levyiltä pois. Pesuliukset ovat normaalisti yksinkertaisia suolaliukuksia. Pesu-aspiointisyklejä suoritettiin eräohjedraftin mukainen määrä. Viimeisenä levyille jätettiin sokeripitoinen kyllästysliuos, jonka jälkeen levyt siirrettiin inkuboitumaan.

Ennen prosessivaiheen aloitusta levyille dispensoidun liuoksen määrä tarkistettiin kuten prosessivaiheessa A, eli punnitsemalla ne analyysiväällä. Prosessivaiheen B aikana prosessia kontrolloitiin alussa tehtävällä punnituksella, puolivälissä suoritettavalla visuaalisella eli silmämääräisellä tarkastuksella ja lopussa tehtävällä punnituksella. Lisäksi linjaston ultraäänilukija tarkasti jokaiselta levytä kuoppakohtaisesti, että viimeisen levyille annosteltavan liuoksen tilavuus oli levynimikekohtaisissa toleranssirajoissa.

Kun prosessivaihe B:n levyt oli annosteltu, siirrettiin levyt inkuboitumaan eräohjedraftin mukaisiin inkubointiolosuhteisiin.

Taulukko 3. Prosessikontrollit prosessissa B.

	Alusta	Alusta	Alusta	Lopusta	Lopusta	Lopusta
	Pesuliuos 1	Pesuliuos 2	Kyllästysliuos	Pesuliuos 1	Pesuliuos 2	Kyllästysliuos
ka / 8 stripsiä (µL)	306,7	307,8	296,1	302,2	303,3	293,9
CV%	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3

Taulukossa 3 on kuvattu prosessin B valmistuksen aikaiset punnituslevyt. Pesuliuoksilla 1 ja 2 on sama annostilavuuden hyväksymisraja, reseptin mukainen annostelutilavuus $\pm 10 \mu\text{L}$ /kuoppa. Punnituslevyjen sisäiselle hajonnalle (CV %) ei ole hyväksymisrajoja, mutta se antaa tietoa stripsien annostelun tasaisuudesta. Koska CV%:n arvot olivat pesuliuoksilla 0,2–0,4, ovat stripsien tulokset olleet hyvin samankaltaiset, eikä levyillä esiinny driftiä tuloksissa.

5.3 Prosessivaihe C

Kuvassa 9 on esitetty prosessin C yleinen vuokaavio.



Kuva 9. Prosessin C (aspirointi-pakkausvaihe) vuokaavio.

Prosessivaihe C aloitettiin, kun ennalta määritetty, prosessin B jälkeinen inkubointiaika oli täyttynyt. Prosessivaihe C suoritettiin samalla automaattilinjastolla kuin kaksi edellistä prosessivaihetta. Vaiheessa C levyiltä

imettiin pois inkuboitunut kyllästysliuos siten, että levyt olivat tasaisesti kuivia. Näiden levyjen jäännöskosteus tarkastettiin punnitsemalla levyt analyysivaa'alla. Jäännöskosteudelle on asetettu raja, joka ilmoitettiin eräohjedraftissa. Jäännöskosteus tarkastettiin erän alussa, puolivälissä ja lopussa punnitsemalla.

Kun levyt olivat hyväksytysti aspiroitu, ne siirtyivät automaattilinjastolta erillistä kuljetushihnaa pitkin pakkauskoneelle, jossa levyt pakattiin ilmatiiviisti. Pakkaukseen sisältyy silikarakeita sisältävä kuivapussi, jonka tehtävänä on imeä mahdollinen ylimääräinen kosteus levypaketista. Levypakkauksen kanteen printattiin yksilöivä tuotetunniste, jossa ilmoitettiin tuotteen nimi, eränumero ja viimeinen käyttöpäivä. Kun pakkausvaihe oli suoritettu, levyt siirrettiin varastoon +4 °C:n odottamaan niille suoritettavaa laadunvalvontaa. Taulukossa 4 on kuvattu prosessivaiheen C prosessikontrollien tulokset.

Taulukko 4. Prosessikontrollit prosessissa C.

	Alusta 1	Alusta 2	Puoliväli	Lopusta
ka / 8	Vaatimusrajoissa	Vaatimusrajoissa	Vaatimusrajoissa	Vaatimusrajoissa
stripsiä				
(g/kuoppa)				
CV%	15,6	13,4	18,4	12,8

Prosessissa C punnituslevyillä tutkitaan levyille jäänyttä jäännöskosteutta. Jäännöskosteudelle on asetettu rajaksi 0,02 g/kuoppa. Sisäiselle hajonnalle ei ole asetettu tuotekohtaisia vaatimuksia, mutta sitä tarkkailemalla on mahdollista saada parempi käsitys aspiroinnin tasaisuudesta prosessissa. Taulukossa 4 tulokset on myös ilmaistu punnituslevyn keskiarvona. Prosessin C punnituslevyjä arvioidessa on hyvä huomata, että vaikka punnituslevyjen sisäinen hajonta on suhteellisen suuri, johtuu tämä hyvin pienistä punnituista jäännöskosteuksista, jolloin pienikin heitto stripsien välillä aiheuttaa suuren hajonnan arvon. Punnituslevyjen tulokset olivat kuitenkin eräohjetta tarkasteltaessa tasaiset, eikä driftiä ollut havaittavissa. Prosessivaiheiden A-C kesto oli 4 vrk, (16.02.2023 – 20.02.2023) ja se sisälsi myös ennen

prosessivaihetta A valmistettavien liuosten valmistuksen, joka tyypillisesti voidaan tehdä jo prosessin aloitusta edeltävänä päivänä.

5.4 Komponenttilaadunvalvonta

Levyvalmistuksessa valmistettaville kaikille levynimikkeille suoritetaan oma laadunvalvonta ennen lopullista lopputestiä. Laadunvalvonnan tarkoituksena onkin varmentaa valmistettavan erän tasalaatuisuus. Kullekin levyvalmistuksessa valmistettavalle levynimikkeelle on asetettu omat, ennalta määritetyt hyväksymisvaatimukset, jotka erän on täytettävä, ennen kuin se voidaan hyväksyä käytettäväksi loppulaadunvalvonnan lopputestiin, jossa valmiista komponenteista kootaan keskenään käyttötarkoituksessaan toimiva kitti. Jos hyväksymiskriteerit eivät täyty, seuraa OOS-tulos (Out of specification) ja on siirryttävä mahdollisesti poikkeamamenettelyyn ongelman juurisyyn löytämiseksi. Tällaisissa tilanteissa on mahdollista, että erä joudutaan romuttamaan, jos uusintatestauksilla ei saavuteta hyväksymiskriteereitä. Tämän komponenttilaadunvalvonnan on läpäistävä levynimikkeelle asetetut hyväksymiskriteerit, tai muuten erä saatetaan joutua romuttamaan.

Verifiointierälle suoritettiin eräohjedraftin mukainen laadunvalvonta. Koska asiakaskäytössä valmiin lopputuotteen GSP® Neonatal Biotinidase kitin määrittäminen suoritetaan GSP®-laitteilla, myös kyseisen levynimikkeen laadunvalvonta suoritettiin näillä määrittäslaitteilla.

Jotta laadunvalvonta saatiin kattamaan kaikki n. 3000 levyä, kerättiin Wallac Oy:ssä käytössä olevan näyteotantataulukon mukaisesti harvennetulla otannalla verifiointierästä 8 levyä tasaisesti läpi koko sarjan. Näille 8 levyille suoritettiin homogeenisuustesti. Lisäksi erästä kerättiin 4 levyä kokoomalevytestiin.

5.5 GSP®-laitteen toimintaperiaate

GSP®-laite (Genetic Screening Processor) on tarkoitettu käytettäväksi seulontalaitteena GSP reagenssikittien kanssa. GSP®-laite on täysin automatisoitu, korkean suorituskyvyn omaava aikaerotteisen fluoresenssin analysaattori, jolla analysoidaan näytteitä mikrotiitterilevyiltä. Laitetta käytetään *in vitro* analyyttien kvantitatiiviseen/kvalitatiiviseen määrittämiseen sille tarkoitetuilla määrityksillä.

Laitteen peruseriaate on hyvin yksinkertainen, mutta sen käyttö vaatii koulutetun henkilön. GSP®-laitteeseen asetetaan levyt, joiden kaivoihin on ”punssattu” eli ns. lyöty läpi näytteet, jotka on imeytetty imupaperiin. Tätä samaa näytetekniikkaa käytetään myös vastasyntyneiden seulonnassa, jossa vauvan kantapääverinäyte on imeytetty imupaperille, kuivattu, ja kuljetettu laboratorioon seulottavaksi.

Verifiointierän komponenttilaadunvalvonnassa ei kuitenkaan käytetä näytteitä, vaan levyt asetetaan GSP®-laitteeseen tyhjinä. Koska biotinidaasin määrittystulos on kääntäen verrannollinen näytteessä olevan biotinidaasin määrään, aiheuttaisi näytteen levyille lisääminen mahdollisesti epävarman tuloksen levyn laadusta.

Yksi kuoppalevyn kuoppa edustaa valmiissa kitissä asiakaskäytössä yhtä potilasnäytettä. Homogeenisuustestin tarkoituksena onkin varmistaa erän tasainen laatu läpi sarjan, joten laadunvalvonnan tuloksille on asetettu tuotteen kehitysaikana hyväksymisraja levyn sisäiselle hajonnalle sekä mediaanisignaalille.

6 Komponenttilaadunvalvonnan tulokset

Verifiointierälle suoritettujen laadunvalvonnan tulokset sisältäen homogeenisuustestin, kokoomalevytestin ja vertailun referenssierään on kuvattu alla taulukossa 5.

Taulukko 5. Verifiointierän komponenttilaadunvalvonnan tulokset.

Testattavat levyt+ Referenssilevyt	GSP	Levynro	CV%	Signaali (cps)	Ero mediaanista > 5 %	Ero mediaanista > 10 %	Ero mediaanista > 20 %
H1	A	43	1.4	3505416	0	0	0
H2	A	3050	1.0	3539995	0	0	0
H3	A	864	1.2	3537130	0	0	0
H4	A	1849	1.1	3544775	0	0	0
H5	B	403	1.1	3284366	0	0	0
H6	B	2632	0.9	3288293	0	0	0
H7	B	1245	1.0	3280400	0	0	0
H8	B	2228	0.8	3290916	0	0	0
R1 (referenssilevy 1)	A	2987	1.2	3530268	0	0	0
R2 (referenssilevy 2)	B	3005	0.8	3288745	0	0	0
Ohjausraja	---	---	≤ 3.0	≥ 2000000	N/A	N/A	N/A
Hyväksymisraja	---	---	≤ 4.5	≥ 1500000	N/A	N/A	≤ 1 (/8 levyä)
Signaalin suhde	GSP	Levyn mediaanisignaalin ka	Referenssilevyn mediaanisignaali		Suhde		
Testattujen levyjen mediaanisignaalin suhde referenssilevyn signaalista	A	3531829	3530268		1.0		
Testattujen levyjen mediaanisignaalin suhde referenssilevyn signaalista	B	3285994	3288745		1.0		
Ohjausraja	---	≥ 2000000	≥ 2000000		≥ 0.8		
Hyväksymisraja	---	≥ 1500000	≥ 1500000		N/A		
Kokoomalevyt	GSP	Stripsit	CV%	Signaali (cps)	Levyjen välinen CV% Levy 1	Levyjen välinen CV% Levy2	Levyjen välinen CV%, yhdistetty
K1	B	A&E	1.2	3268024	0.7	0.5	0.6
K2	B	G&C	1.0	3293035			
Ohjausraja	---	---	N/A	N/A	N/A	N/A	≤ 2.2
Hyväksymisraja	---	---	N/A	N/A	N/A	N/A	≤ 3.0

Verifiointierässä suoritettujen testien tarkoitus:

Homogeenisuustesti:

Homogeenisuustestiin valikoidaan levyjä tuotetun erän sisältä tasaisesti siten, että saataisiin mahdollisimman tarkasti kartoitettua koko erän laatu.

Homogeenisuuslevyt on merkitty taulukkoon 5 H1-H8. Yksittäiset levyt valitaan kuitenkin pistokoeluontoisesti. Homogeenisuustestin tarkoituksena on varmentaa erän tasalaatuisuus. Levyiltä tutkitaan mediaanisignaalin taso, jolle on tuotteen kehittämisen aikana annettu hyväksymisrajat, sekä jokaisen testatun levyn sisäinen hajonta, jonka on oltava vähintään tuotteelle asetetuissa hyväksymisrajoissa ($\leq 4,5\%$). Ohjausrajan alapuolelle (0-3,0 %) osuvat tulokset ovat ihanteellisella tasolla.

Kokoomalevytesti:

Kokoomalevyt kootaan neljästä erän sisältä poimitusta levystä. Erästä poimitaan yksi levy erän alusta, kaksi levyä erän puolivälistä sekä yksi levy erän lopusta. Näistä levyistä kootaan kokoomalevy eräohjeen mukaisesti siten, että jokaiselta levyltä poimitaan yksi stripsi. Yhdellä levyllä on 8 stripsiä (A-H). Kokoomalevyjen valmisteluohje on kuvattu taulukkoon 6 alla.

Taulukko 6. Kokoomalevyjen valmisteluohje.

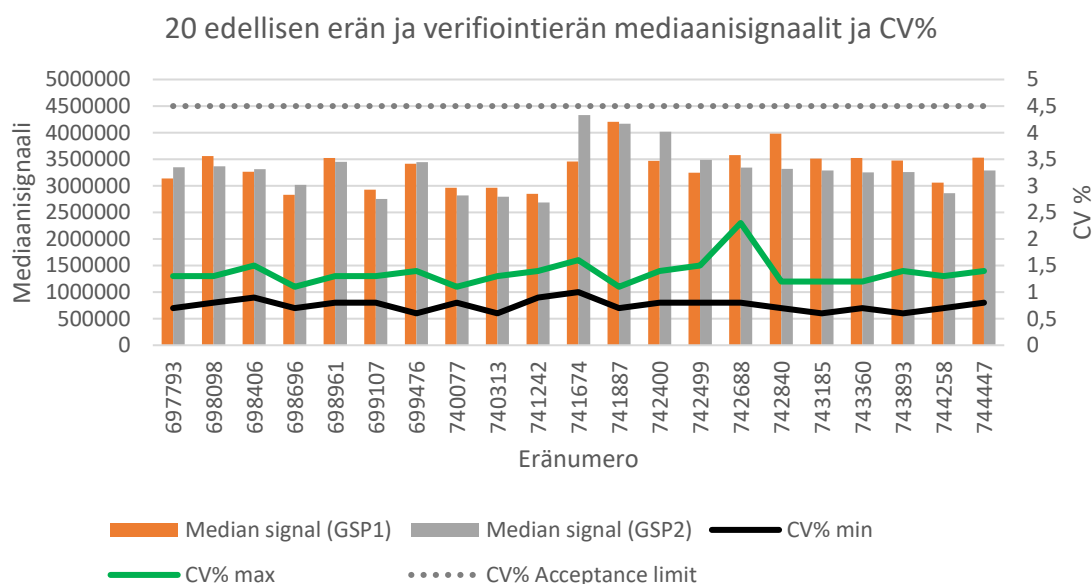
Stripsi	Laadunvalvontalevy	K1	K2
A	Levy alusta	A	G
B	Levy keskeltä 1	A	G
C	Levy keskeltä 2	A	G
D	Levy lopusta	A	G
E	Levy alusta	E	C
F	Levy keskeltä 1	E	C
G	Levy keskeltä 2	E	C
H	Levy lopusta	E	C

Koska yhdessä kokoomalevyssä on edustettuna koko erä, kertoo kokoomalevytesti tuotetun erän tasalaatuisuudesta tuotantoerässä. Testin etuna

on nopeus (yksi määrittyslaite ja kaksi levyä) ja sen avulla saadaan selville mm. signaalitasojen vaihtelut.

Komponenttilaadunvalvonnassa tarkasteltiin myös referenssierän, eli jo hyväksytyn saman nimikkeen erän tuloksia. Taulukossa 5 kuvattu suhdeluku testattavien levyjen ja referenssilevyjen välillä tulee olla yli 0,8, jotta erä olisi hyväksyttävä. Tulokseksi saatiin 1,0, joka osoittaa sen, että erien välistä vaihtelua ei ole havaittavissa *in vivo* -vasta-aineella ja *in vitro* -vasta-aineella valmistettujen erien välillä.

Kuviossa 1 on esitetty 20 edellisen tuotetun erän, jotka on valmistettu *in vivo* -vasta-aineella, mediaanisignaalit ja CV%:t, sekä kuviossa oikealla on vertailuna *in vivo* – vasta-aineella valmistetun verifiointierän (eränumero 744447) tulokset.



Kuvio 1. Verifiointierän vertailu edellisiin 20 erään

Kuviosta 1 nähdään, että 20 edellisen tuotetun erän välillä ei ole merkityksellisiä eroavaisuuksia. Mediaanisignaalin nousu erän 741674 kohdalla on johtunut käytetyistä määrittyskomponenteista ja GSP®-laitteista. Erien sisäiset hajonnat ovat olleet hyvin matalia, joka kertoo erien tasaisesta laadusta. Verifiointierän 744447 tulokset olivat samalla tasolla edellisten tuotettujen erien kanssa.

6.1 Loppulaadunvalvonta

Kun verifiointierälle suoritettu komponenttilaadunvalvonta oli suoritettu ja täytti sille asetetut hyväksymiskriteerit, tehtiin loppulaadunvalvonnassa tätä levyerää 744447 käyttäen kitti, johon koottiin muilla Wallac Oy:n osastoilla valmistetut muut kitin komponentit, jotka olivat täyttäneet kyseisten komponenttinimikkeiden (Taulukko 1) hyväksymiskriteerit. Testattava kitti koottiin mahdollisimman uusista komponenteista, sillä valmis kitti saa viimeisen käyttöpäivän sen komponentin mukaan, jolla on lyhin säilyvyysaika.

Loppulaadunvalvonnassa suoritettiin lopputesti kitille, joka sai laadunvalvonnassa käytettävän ohjelman mukaisesti kombinaationumeron 40261. Tämä ensimmäinen, heti komponenttilaadunvalvonnan jälkeen suoritettu lopputesti toimi samalla 0-aikapisteenä säilyvyystesteille. Normaalisti, kun loppulaadunvalvonta kombinaatiolle on suoritettu hyväksytysti, tätä testattua ja hyväksyttyä kombinaatiota on mahdollista myydä asiakkaille.

Kuitenkaan kittiä ei voitu vielä tässä vaiheessa myydä asiakkaille, sillä sen toimivuus ja testaus säilytyksen aikana tuli ensin varmistaa kiihdytetyillä säilyvyystesteillä, sekä säilyvyystestisuunnitelmassa ennalta määrätyillä reaaliaikaisilla aikapisteillä 1kk, 2kk ja 3kk. Hyväksytysti suoritetun loppulaadunvalvonnan kombinaatiotestin jälkeen siirryttiin testaamaan säilyvyysryhmässä suoritettavat säilyvyystestit, jotka on kuvattu seuraavissa kappaleissa.

6.2 Säilyvyystutkimukset

Kun tuotteeseen tehdään jokin muutos, jonka vaikutusta tuotteen säilyvyyteen halutaan arvioida, on aloitettava myös säilyvyystutkimukset. Suomessa lääkinnällisiin laitteisiin liittyvää lainsäädäntöä ja asetusten noudattamista säätelee Fimea.

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EU) 2017/746, in vitro - diagnostiikkaan tarkoitetuista lääkinnällisistä laitteista, osassa B, kohdassa 5.1

sanotaan seuraavasti: ” *Markkinoille saattamisen jälkeistä suorituskyvyn seuranta koskevassa suunnitelmassa on määritettävä menetelmät ja menettelyt, joiden avulla kerätään ja arvioidaan proaktiivisesti turvallisuus-, suorituskyy- ja tieteellisiä tietoja seuraavia tarkoituksia varten:*

a) varmistetaan laitteen turvallisuus ja suorituskyy koko sen odotettavissa olevan käyttöajan” (Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus IVD/EU/2017/746).

Tarkoituksena on tutkia, onko valmistajan vasta-aineen tuotantomenetelmän vaihdoksella vaikutusta lopputuotteen GSP® Neonatal Biotinidase kit säilyvyyteen (säilyvyysaika nykyisellä tuotteella 12 kk)

Ennen säilyvyystutkimusten aloittamista laadittiin säilyvyystutkimussuunnitelma, joka hyväksyttiin toimeksiantajan säilyvyysasiantuntijalla, laadun tuoteryhmän edustajalla sekä vasta-aineen muutoksista vastaavan tuotekehityskemistillä. Säilyvyystutkimussuunnitelmassa kirjattiin, että muutoksen myötä on aloitettava kiihdytetty säilyvyystutkimus, reaaliaikainen säilyvyystutkimus, joka sisältää kuljetusrasituksen (shipping) sekä käytönaikaisen rasituksen (in-use/on-board).

Säilyvyystutkimuksissa käytettiin jokaisessa testattavassa testissä ja aikapisteessä referenssieränä aikaisemmin hyväksyttyä tuotantoerää, joka ei saanut olla vanhempi kuin 2kk, tulosten luotettavuuden takia.

Koska reaaliaikaisten säilyvyystutkimusten kaikkien 13 kk:n aikapisteiden saamiseen tulee kulumaan aikaa, päätettiin verifiointiin hyväksyntää varten laatia väliraportti, jossa käsitellään kiihdytettyjen säilyvyystutkimusten tulokset, sekä kolmen ensimmäisen reaaliaikapisteen tulokset, sisältäen kuljetus- ja käytön aikaiset rasitukset.

6.3 Kiihdytetyt säilyvyystutkimukset

Kiihdytetty säilyvyystutkimus tarkoittaa tuotteen säilyvyyden testaamista kiihdytetyissä olosuhteissa verrattuna sen normaaleihin säilytysolosuhteisiin. Täten lyhyessä ajassa saadaan arvio, säilyykö tuote koko sen

vähimmäissäilyvyysajan. Kiihdytettyjä säilyvyystutkimuksia varten tuli ensin selvittää, mikä aika korreloi 12 kk:n säilyvyyttä +4°C:ssa, kun levyjä säilytettiin +35°C:ssa.

Kiihdytetystä säilyvyystutkimuksesta saatiin muutosprosessin aikana arvio tuotteen säilyvyydestä, kun reaaliaikaisten säilyvyystutkimustulosten kaikkia tuloksia ei ollut mahdollista saada ennen tuotteen myymistä.

Jotta vasta-aineen tuotantotavan muutosta tuotteessa GSP® Neonatal Biotinidase kit voitiin tutkia, tuli sille laskea Arrheniuksen yhtälön (2) avulla, mikä aika kiihdytetyissä olosuhteissa vastasi tuotteen normaalia säilyvyysaikaa 12 kk:ta +4 °C:ssa.

$$k = se^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2)$$

Kaavassa 2 on kuvattu Arrheniuksen yhtälö, missä

k = nopeusvakio

s = frekvenssitekijä

E_a = aktivaatioenergia

R = kaasuvakio (8,314 JK⁻¹mol⁻¹)

T = absoluuttinen lämpötila K (273,15 K + lämpötila °C)

Yleisesti biomolekyylien, joita myös vasta-aineet ovat, hajoamiselle käytetään aktivaatioenergian approksimaatiota 83 736 J/mol. Tiettyjen matemaattisten toimenpiteiden jälkeen arrheniuksen yhtälö saatiin alla olevaan muotoon (kaava 3), josta vastaavuusaika laskettiin.

$$\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) = \frac{E_a(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2} \quad (3)$$

Kaavasta 3 saatiin laskettua vastaavuusaika seuraavasti: 2595816/710046,965

$$\ln k_2 = \frac{83736 \text{ J/mol}^{-1}(308,15 - 277,15)\text{K}}{8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1} \cdot 277,15\text{K} \cdot 308,15\text{K}} = 3,6558 \quad (4)$$

$$k_2 = e^{3,6558} \approx 39 \quad (5)$$

Tuloksen mukaan 31°C:n nousu aiheuttaa 39-kertaisen reaktionopeuden kasvun. Lopputuotteen säilyvyyksiän tiedetään olevan 365 päivää, jolloin kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen pituudeksi saatiin $365 \text{ d} / 39 \approx 10 \text{ d}$.

Arrheniuksen yhtälöä hyödyntämällä saatiin selville, kuinka kauan *in vivo*-vasta-aineella valmistettuja levyjä pitää säilyttää kiihdytetyissä olosuhteissa, jotta saadaan vastaava aika, kuin jos levyjä säilytettäisiin vuosi +4 °C:ssa.

6.4 Kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen testimenetelmä

Kiihdytetyssä säilyvyystutkimuksessa oli tarkoituksena tutkia vain levyjen säilyvyyttä, sillä muihin kitin komponentteihin ei tehty muutoksia. Vain verifiointierässä valmistetut, uudella vasta-aineella valmistetut levyt kiihdytettiin +35 °C:ssa ja 80 % kosteusolosuhteissa. Testipisteiksi päätettiin 5 vrk ja 10 vrk pisteet. Kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen 0-aikapisteenä käytettiin komponenttilaadunvalvonnan jälkeistä hyväksyttyä lopputestiä.

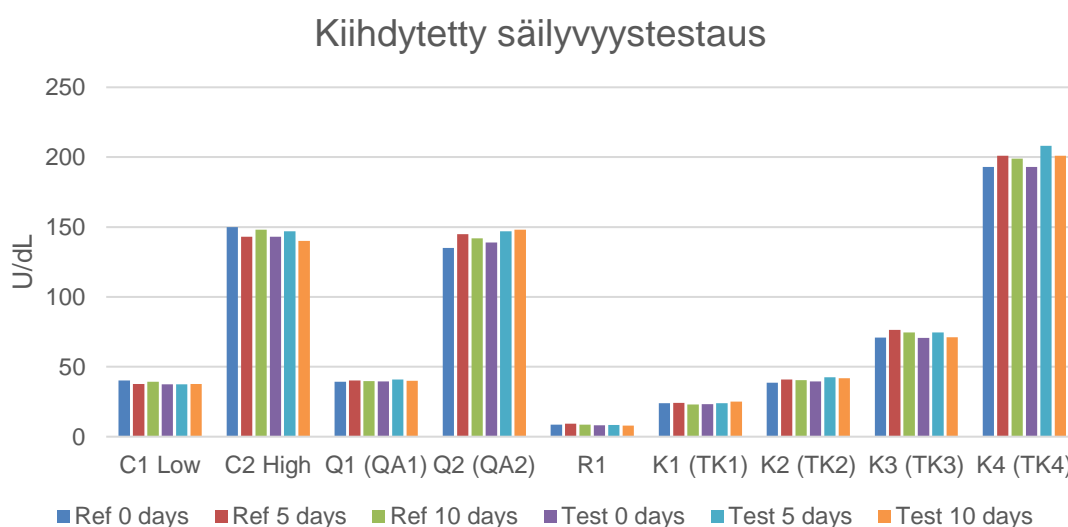
Kiihdytyksen jälkeen levyt säilytettiin niiden normaalissa säilytyslämpötilassa (+4 °C), ennen kuin niille suoritettiin säilyvyysryhmän suorittama, GSP®-laitteilla tehtävä säilyvyystestaus. Säilyvyystestit suoritetaan kuten lopputuotteelle (valmiille kitille) suoritettava lopputestaus, mutta siihen sisältyy yleisesti vähemmän testattavia levyjä. Säilyvyystestin hyväksymisraja oli aikaisemmin määritetty talon sisäisessä tulostenkäsittelyohjelmassa.

6.5 Kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen tulokset

Kun molempien aikapisteiden, 5 pvä ja 10 pvä, säilyvyystestit oli ajettu, tarkasteltiin niiden tuloksia. Testattaville levyille oli punssattu nimikekohtaisen pipetointikaavion mukaan erilaisia näytteitä, joilla kaikille oli määritetty omat hyväksymisrajansa. Hyväksymisrajat näkyvät alla olevissa kuvioissa +2SD / -2SD -limit -viivoina. Kuvioissa on esitettynä referenssierän (ref, 40142) sekä

testattavan erän (test, 40261) käyrät. Suurimmassa osassa kuvioissa on myös esitettyä tavoitepitoisuus/-pitoisuudet katkoviivana (target conc.). Numerot erien perässä ovat yksilöiviä kombinaationumeroita jäljitettävyyden helpottamiseksi.

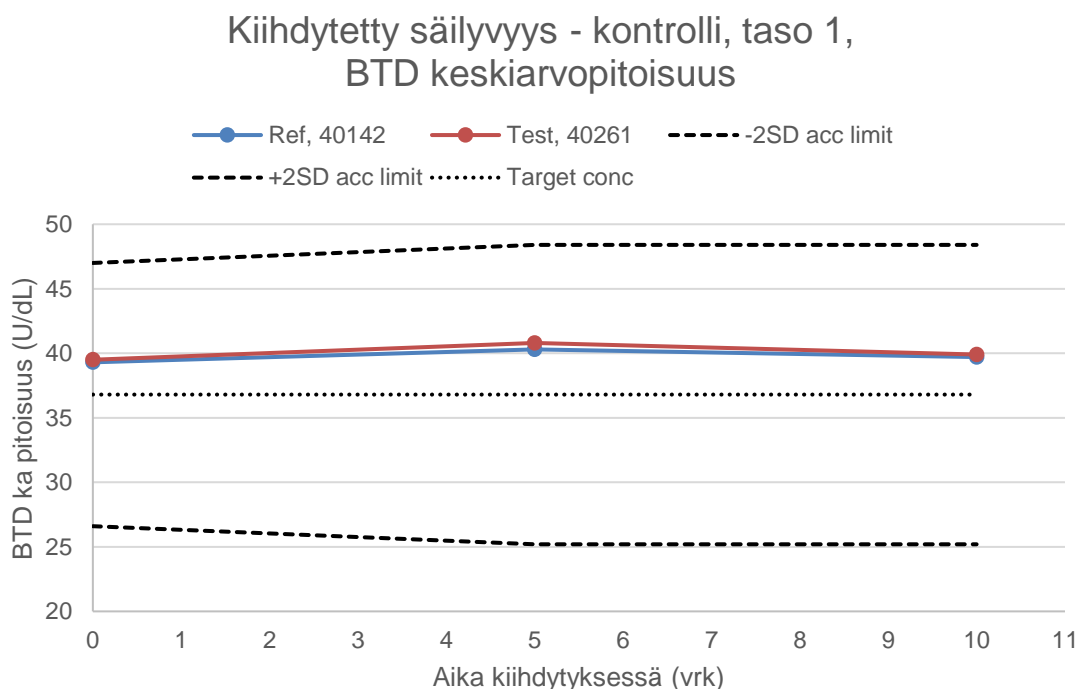
Tulosten tulkitsemisen helpottamiseksi jokaisesta tutkittavasta näytteestä on piirretty oma kuvionsa, ja ne on esitetty kuvioissa 3-12. Kuvio 2 (alla) on yleiskuva suurimmasta osasta kiihdytetyn säilyvyyden testatuista näytteistä ja niiden tuloksista biotinidaasin pitoisuuksina.



Kuvio 2. Kiihdytetty säilyvyys, yleiskuva tuloksista.

Kuviossa 2 on esitettyä yleiskuvaus kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen tuloksista. Kuviossa on esitettyä sekä referenssierän tulokset että testattavan erän tulokset. Säilyvyystesteissä levyille punssattiin seuraavat näytteet: matalan ja korkean tason näytteet C1 ja C2, kontrolli 1 (Q1 (QA1)), kontrolli 2 (Q2 (QA2)), deficient-kontrolli (R1) sekä tasokalibraattorit K1-K4 (TK1-TK4). Levyille punssattiin pipetointikaavion lisäksi myös kittikalibraattorit S1-S6, jotka eivät ole edustettuna kuviossa 2 tulosten luettavuuden helpottamiseksi.

Seuraavissa kuvioissa 3-12 tutkittiin yksittäisten näytteiden käyttäytymistä kiihdytetyn säilyvyystestin aikana, sekä verrattiin keskenään referenssierää ja testattavaa erää. Kuviossa 3 on esitettyä kontrolli 1 (kuviossa 1 QA1).

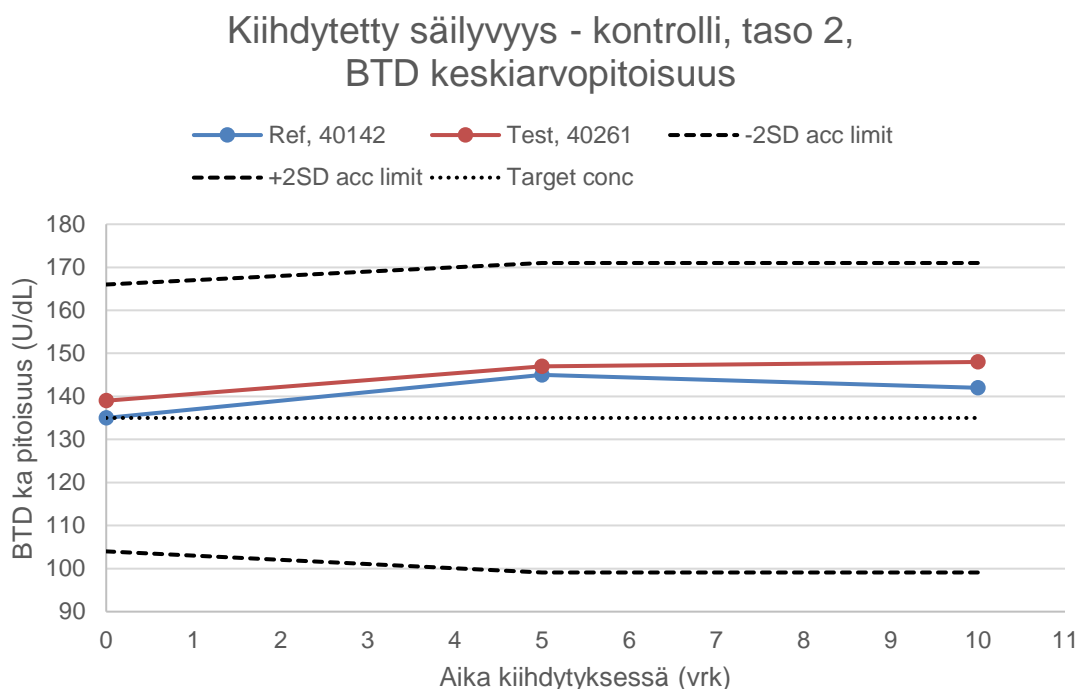


Kuvio 3. Kiihdytetty säilyvyys, kontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviossa on esitetty -2SD/+2SD hyväksymisrajat, sekä kontrollin tavoitearvo (target conc.). Säilyvyystestien tuloksien käsittelyssä käytetään omaa talon sisäistä ohjelmaa, joka laskee hyväksymisrajat sekä tavoitearvon, kun tiedossa on kittikalibraattoreiden eränumero ja niiden tarkat pitoisuudet. Hyväksymisrajat siis vaihtelevat sen mukaan, miten ohjelma sovittaa kittikalibraattoreiden arvojen mukaan muiden tutkittavien näytteiden hyväksymisrajat tietylle kombinaatiolle.

Kontrollin 1 pitoisuus pysyi koko kiihdytyksen ajan lähes samalla tasolla, ja referenssierän tulokset vastasivat testattavan erän tuloksia.

Kuviossa 4 on esitetty kontrollin, taso 2, keskiarvopitoisuudet kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen aikana.

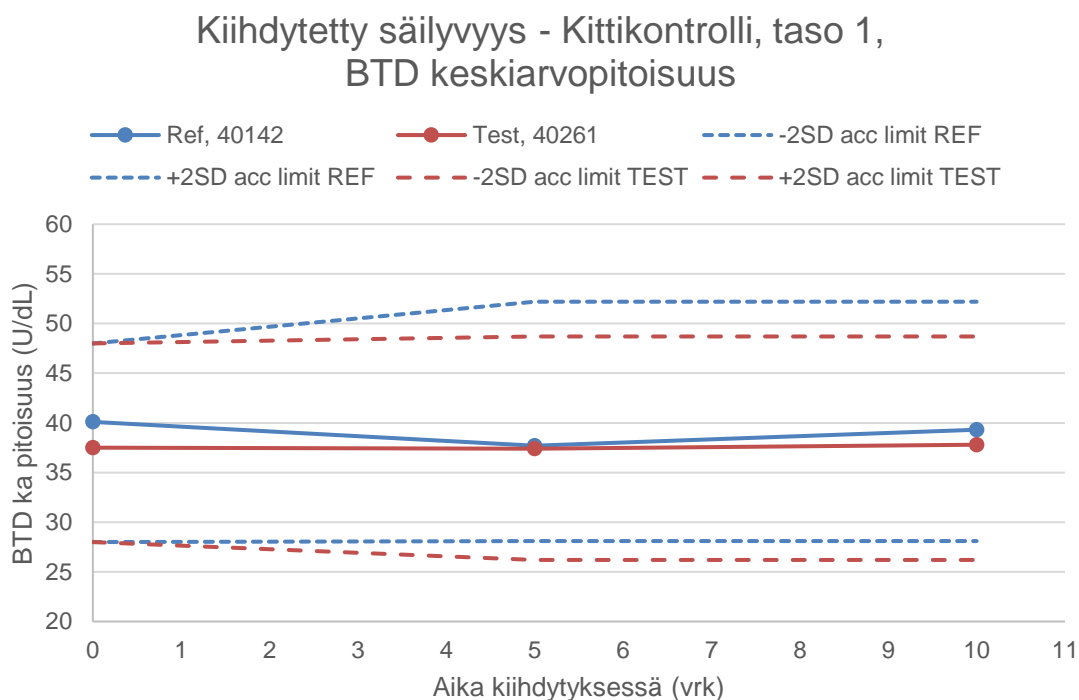


Kuvio 4. Kiihdytetty säilyvyys, kontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kontrolli 2 eroaa tuloksissa hieman kontrollista 1. Referenssiviiva (sinisellä) on koko kiihdytyksen ajan hieman matalammalla tasolla kuin testattavalla erällä, sekä lähempänä tavoitearvoa. Pitoisuuserot tasoittuivat kiihdytyksen puolivälissä, mutta kiihdytyksen lopussa pitoisuusero oli kasvanut n. 8 U/dL.

Kuvioista 3 ja 4 nähdään, että molemmat kontrollit olivat hyväksymisrajoissa vielä kitin säilyvyysajan lopussakin, lähellä tavoitearvoa. *In vitro*-vasta-aineella valmistetulla levynimikkeellä ei ole ollut vaikutusta lopputuotteen/kitin toimivuuteen kontrollien osalta.

Kuviossa 5 on esitettyä kittikontrollin 1 pitoisuus kiihdytetyn säilyvyystestauksen aikana.

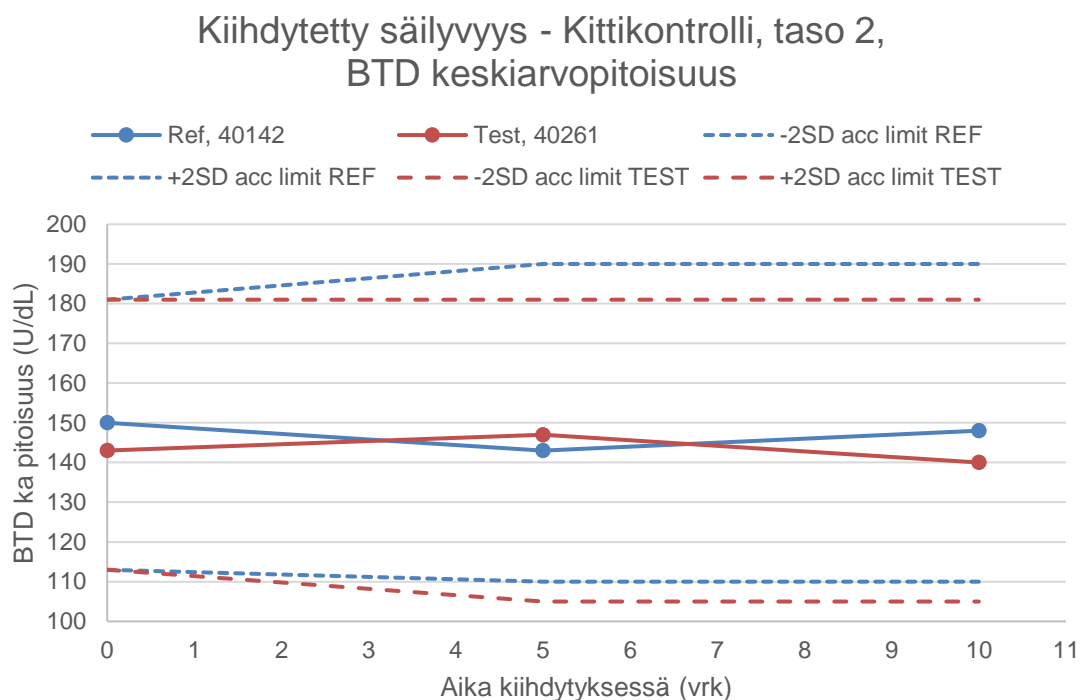


Kuvio 5. Kiihdytetty säilyvyys, kittikontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Sekä referenssierälle että testattavalle erälle on ilmoitettu omat hyväksymisrajat, tavoiterajaa ei ole määritetty. Myös kittikontrolleille lasketaan omat hyväksymisrajat, joiden pitoisuudet määräytyvät kombinaation muiden näytteiden pitoisuuksien mukaan.

Sekä referenssierän että testattavan erän kittikontrollien pitoisuudet ovat hyvin toisiaan vastaavat koko kiihdytyksen ajan.

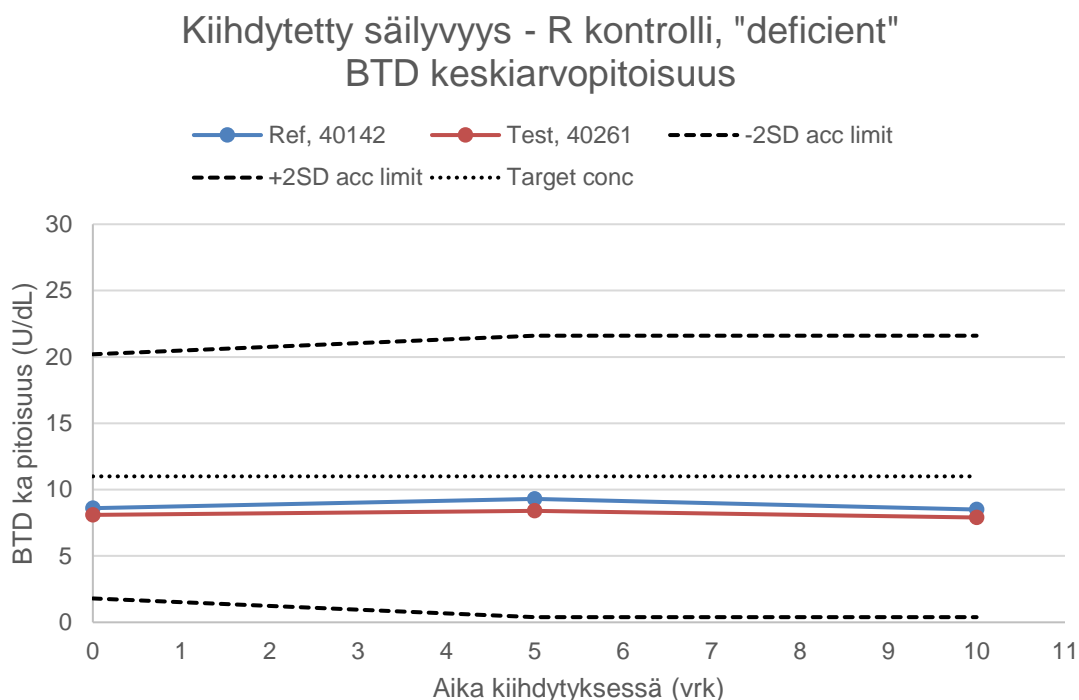
Kuviossa 6 alla on esitetty kittikontrollin, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus kiihdytetyn säilyvyystutkimuksen aikana.



Kuvio 6. Kiihdytetty säilyvyys, kittikontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviossa 6 on myös kaksi eri hyväksymisrajaa, johtuen samasta syystä kuin kuviossa 5 (yllä) oli selitetty. Pitoisuudet vaihtelivat kiihdytyksen ajan referenssierällä sekä testattavalla, mutta pysyen kuitenkin 140-150 U/dL välillä kiihdytyksen loppuun saakka eli kitin säilyvyysajan loppuun.

Kuviossa 7 on esitetty R-kontrollin/deficient-kontrollin pitoisuus eri aikapisteissä.



Kuvio 7. Kiihdytetty säilyvyys, deficient kontrolli, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Deficient kontrolli (R) on oikea potilasnäyte, joka on saatu henkilöltä, jolla on todettu jonkin asteinen biotinidaasin puutostila. Tulokset ovat sekä referenssillä että testattavalla kitillä alle tavoitearvon, mikä on toivottu tulos. Deficient-näytteen tarkoituksena on osoittaa lopputuotteen toimivuus, eli biotinidaasin puutostilan havaitsemisen. R-kontrollin pitoisuus pysyi lähes samana koko säilyvyysajan loppuun, joten GSP® Neonatal Biotinidase kittiin tehtävällä muutoksella ei ollut vaikutusta R-näytteen toimivuuteen kiihdytetyssä säilyvyystutkimuksessa.

Kuviossa 8 (alla) on esitettyä kittikalibraattoreiden S1-S6 keskiarvosignaaleit eri aikapisteissä sekä niiden muutos verrattuna 0-aikapisteeseen.

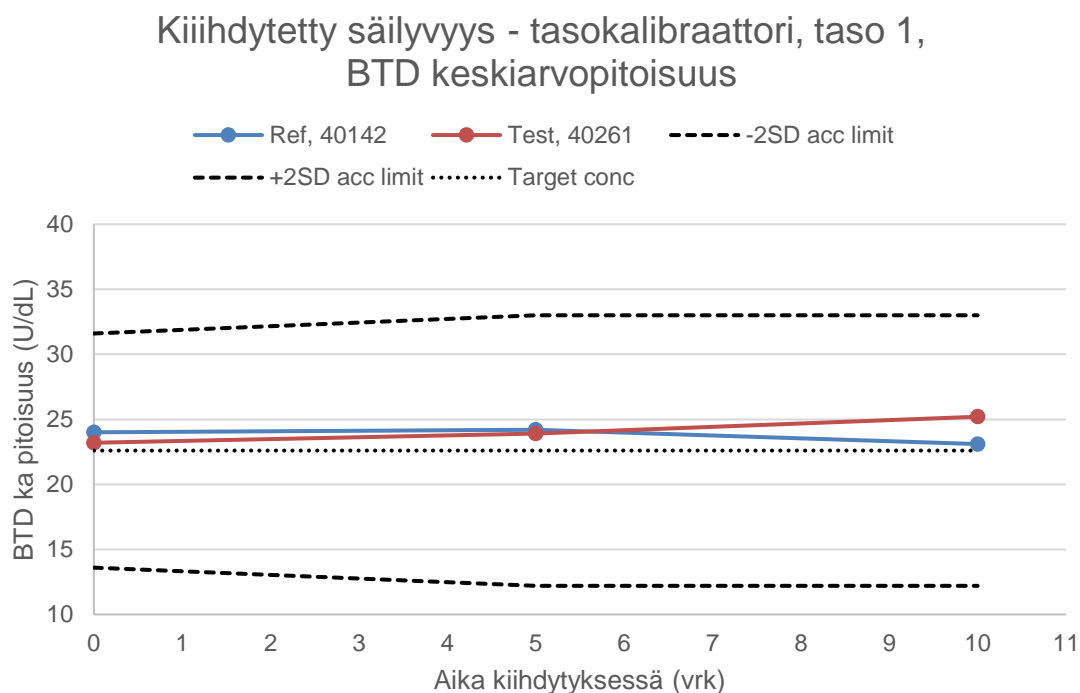


Kuvio 8. Kiihdytetty säilyvyys, kittikalibraattorit, pitoisuus ja niiden muutos (%).

Koska GSP® Neonatal Biotinidase kitin immunomääritys on kilpaileva, kittikalibraattoreiden keskiarvosignaali laskevat, kun biotinidaasin pitoisuus kittikalibraattoreissa kasvaa. S1 kittikalibraattorin pitoisuus on pienin, kun taas S6 pitoisuus on suurin. Tästä syystä myös prosentuaaliset muutokset ovat suuremmat S6 tasolla verrattuna S1 tasoon.

Suurin muutos (21 %) 0-aikapisteeseen verrattuna nähdään referenssierässä 10 päivän kohdalla kittikalibraattorilla S6, kun samassa testipisteessä testattavan erän kohdalla vastaava muutos on vain 1,6 %:a. Referenssierällä eikä testattavalla erällä ole kuitenkaan sellaisia merkittäviä eroja, jotka vaikuttaisivat säilyvyystestien tai verifiointin hyväksyttävyyteen.

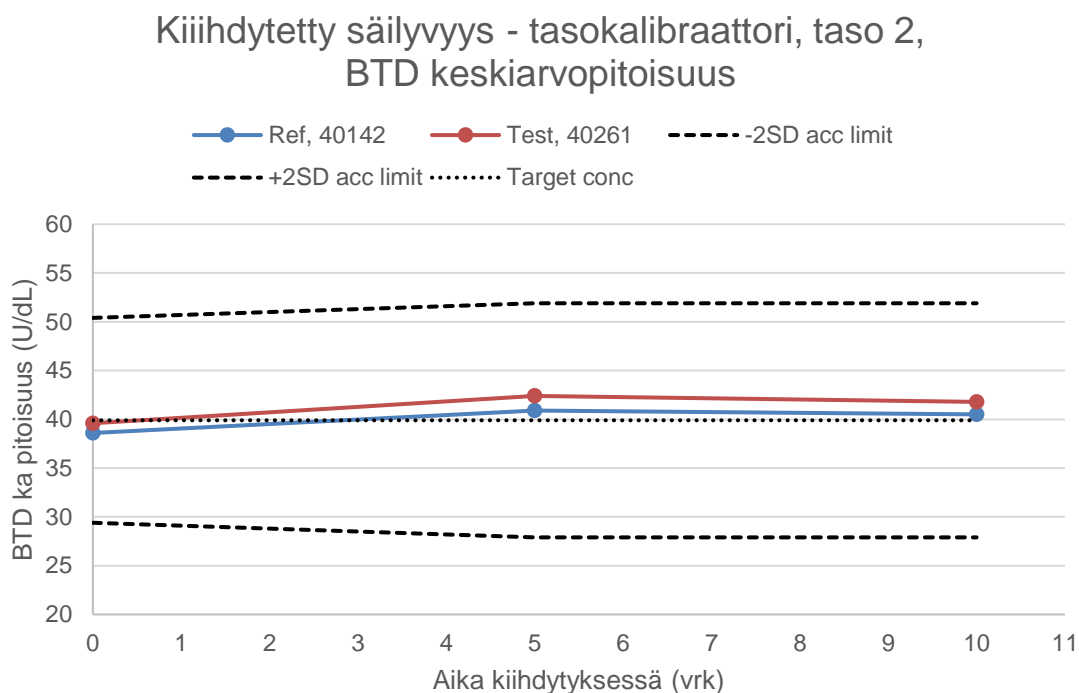
Kuvioissa 9-12 (alla) on esitetty tasokalibraattoreiden 1-4 tulokset. Tasokalibraattorin 1 keskiarvopitoisuus on esitettynä kuviossa 9.



Kuvio 9. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Tasokalibraattoreiden pitoisuudet tiedetään, ja niiden tasoa vastaan lasketaan tai korjataan myös säilyvyystestauksen tulokset Kuvioista 9 huomataan, että sekä referenssin että testattavan erän tasokalibraattorin 1 tulokset ovat lähellä tavoiterajaa ja lähes keskellä hyväksymisrajoja. Konsentraatiot pysyvät lähes samoina koko kiihdytetyn säilyvyystestauksen ajan. Kiihdytyksen lopussa referenssin ja testattavan välinen ero vaikuttaisi hieman kasvavan, mutta kuvioista tarkasteltuna ero olisi kuitenkin vain noin 2-3 U/dL.

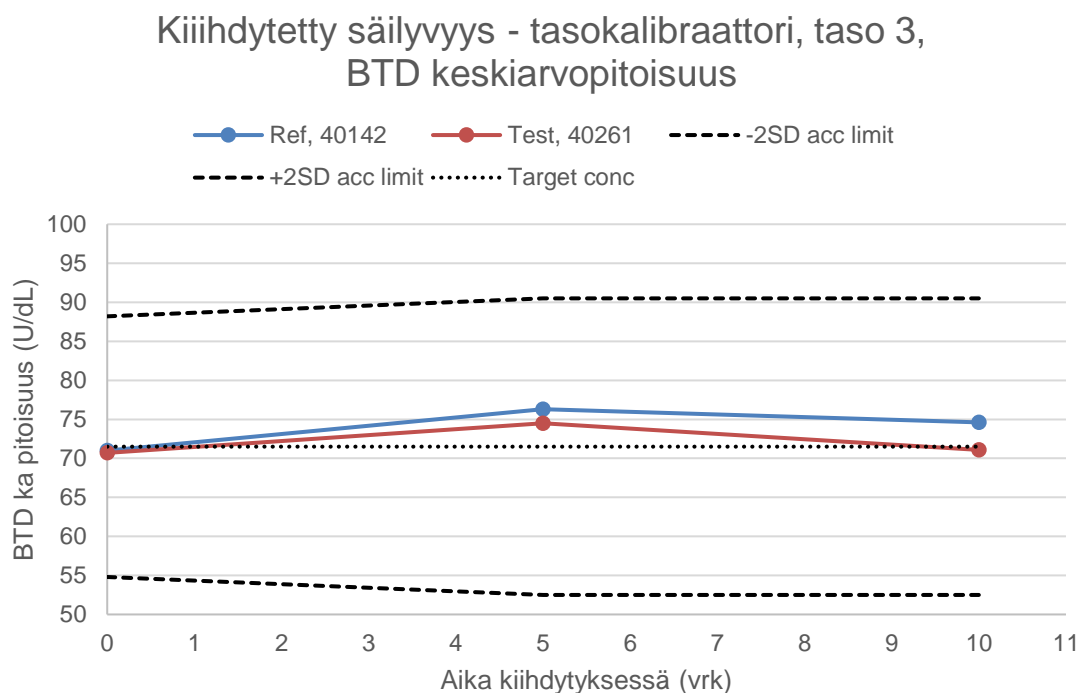
Tasokalibraattorin 2 keskiarvopitoisuus on esitettyä kuviossa 10.



Kuvio 10. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviosta 10 huomataan, että sekä referenssin että testattavan erän tasokalibraattorin 2 tulokset ovat lähellä tavoiterajaa ja lähes keskellä hyväksymisrajoja. Konsentraatiot pysyvät lähes samoina koko kiihdytetyn säilyvyystestauksen ajan. Kiihdytyksen lopussa referenssin ja testattavan välinen ero ei ole kasvanut, vaan pysynyt samalla tasolla.

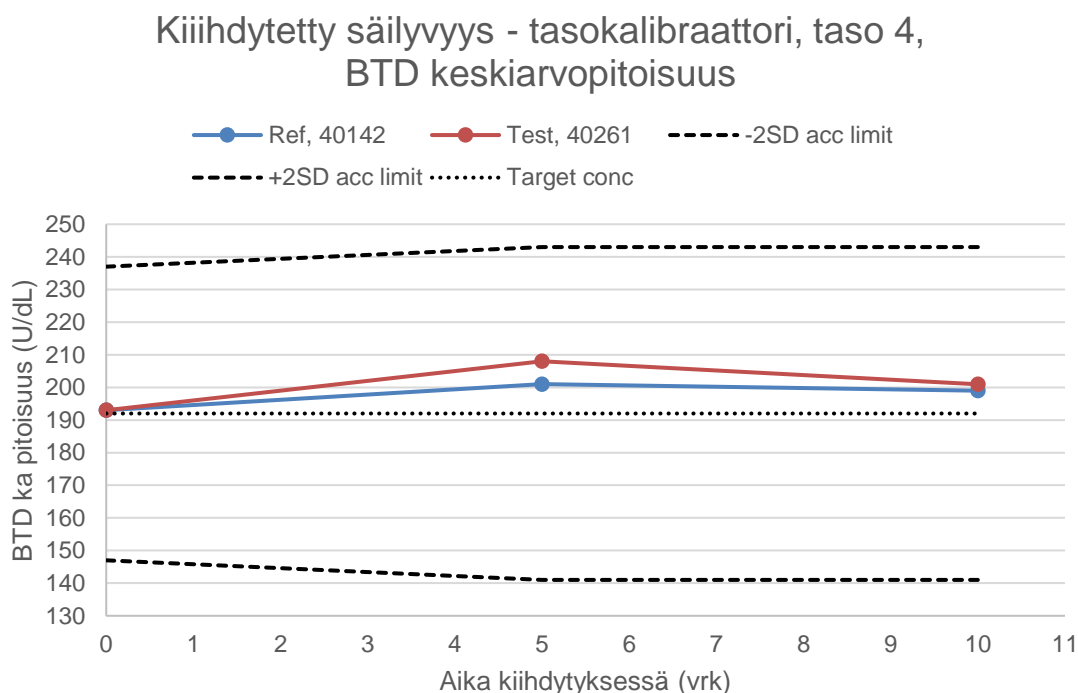
Tasokalibraattorin 3 keskiarvopitoisuus on esitettyinä kuviossa 11.



Kuvio 11. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 3, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviosta 11 huomataan, että sekä referenssin että testattavan erän tasokalibraattorin 3 tulokset ovat lähellä tavoiterajaa ja lähes keskellä hyväksymisrajoja. Testattavan levyn tulos on kiihdytyksen lopussa tavoitearvossa. Konsentraatiot pysyvät lähes samoina koko kiihdytetyn säilyvyystestauksen ajan. Kiihdytyksen lopussa referenssin ja testattavan välinen ero on hieman kasvanut, pysyen silti maltillisena 4-5 U/dL eroavaisuutena.

Tasokalibraattorin 4 keskiarvopitoisuus on esitettyä kuviossa 12.



Kuvio 12. Kiihdytetty säilyvyys, tasokalibraattori, taso 4, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviosta 12 huomataan, että sekä referenssin että testattavan erän tasokalibraattorin 4 tulokset ovat myös lähellä tavoiterajaa ja lähes keskellä hyväksymisrajoja. Testattavan ja referenssin tulokset ovat kiihdytyksen lopussa samalla tasolla keskenään. Konsentraatiot pysyvät lähes samoina koko kiihdytetyn säilyvyystestauksen ajan.

Tasokalibraattoreiden tuloksia tulkiten voidaan todeta, että vasta-aineen tuottomenetelmän vaihdoksella ei ole ollut vaikutusta tasokalibraattoreiden tuloksiin kiihdytetyn säilyvyyden osalta.

6.6 Reaaliaikaiset säilyvyystutkimukset

Kiihdytettyjen säilyvyystestien rinnalla aloitettiin reaaliaikaiset säilyvyystutkimukset. Reaaliaikapisteet määritettiin seuraavasti: 0-aikapiste (0

kk), 1kk, 2kk, 3kk, 6kk, 9kk ja 13kk. Säilyvyystutkimuksissa tutkitaan yleisesti tuotteen säilyvyyttä myös hieman yli tuotteen säilyvyysajan. Verifiointierään kuuluvassa säilyvyystutkimuksessa haluttiin tutkia tuotteen säilyvyyttä muutoksen jälkeen myös 12kk + 1kk aikapisteessä.

6.6.1 Kuljetusrasitus (shipping treatment)

Reaaliaikaisiin säilyvyystutkimuksiin sisällytettiin myös kuljetuksenaikainen rasitustesti, sekä käytönaikainen rasitus. Kuljetuksenaikaiset rasitustestit suoritettiin koko kitille (sisältäen levyt) heti 0-aikapisteen (lopputesti) hyväksymisen jälkeen. Kuljetusrasitustestaus on kuvattuna Wallac Oy:n sisäisissä menettelyohjeissa/SOP:ssa (Standard Operating Procedure).

Kuljetusrasituksella pyritään luomaan "worst case" olosuhteet koko kitille, mutta kuitenkin siten, että kuljetusolosuhteiden katsotaan olevan hyväksyttävät. Osa GSP® Neonatal Biotinidase kitin komponenteista (kalibraattorit ja kontrollit) vaativat kuljetuksen geelijäässä, kun taas muut kitin komponentit käsiteltiin "ambient" olosuhteissa. 'Ambient'-termillä tarkoitetaan tässä tapauksessa kuljetusolosuhteita, jotka stimuloivat mahdollisimman tarkasti valmiin kittipakkauksen ympäröiviä olosuhteita, mutta kuitenkin siten, että suurin osa kuljetuksesta tapahtuu huoneenlämmössä.

6.6.2 Käytönaikainen (in-use/on-board) rasitus

Säilyvyystutkimussuunnitelmaan sisällytettiin myös käytönaikaiset rasitustestaukset. Nämä in-use/on-board-testit oli päätetty suoritettavaksi aikapisteissä 1kk ja 13 kk. Tämä rasitustestaus suoritettiin koko kitille (Taulukko 1). Tuote-esitteessä on kerrottuna eri komponenttien säilyvyys avattuna/GSP®-laitteessa, ja käytönaikaiset rasitustestit suoritettiin niiden mukaan. Rasitustestit ovat kuvattuna alla. (Revvity, 2023). Rasitustestien jälkeen suoritettiin GSP®-laitteilla immunomääritys, kuten kiihdytetyissä säilyvyystesteissä.

Nestemäiset reagenssit

Avaamisen jälkeen Assay Buffer, Biotinidase Substrate Reagent ja Biotinidase SA Reagent säilytetään GSP®-laitteen reagenssikarusellissa 14+1 päivää.

Levyt / Stripsit

Avaamisen jälkeen stripsilevyt säilytetään alkuperäispakkauksessa kuivapussin kanssa suljetun muovipussin sisällä 14+1 päivää pakkauksen ilmoittamassa säilytyslämpötilassa +2 - +8 °C:ssa.

Kalibraattorit ja kontrollit

Avaamisen jälkeen säilytetään +2 - +8 °C:ssa 7+1 päivää alkuperäisissä pakkauksissaan kuivapussin kanssa suljetussa muovipussissa.

Levyt, jotka sisältävät näytteet

Säilytys 15+1 tuntia GSP®-laitteessa (laitteen inkubaattorissa, jonka olosuhteet +27 °C, ± 2 °C, RH 10 – 60 %), ennen määrittelyn aloittamista.

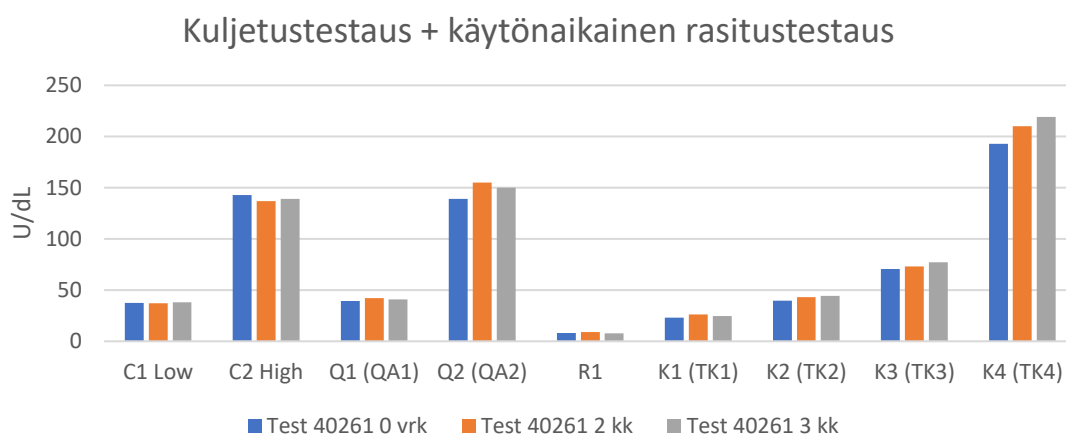
Säilyvyysuunnitelmasta poiketen ensimmäinen aikapiste (1 kk) saatiin suoritettua vasta 2 kk kohdalla, sillä olosuhdekaappi, jonka tarkoituksena oli luoda näytteet sisältäville levyille oikeat olosuhteet, oli epäkunnossa. Kun korvaava laite vapautui käyttöön, levyille päästiin suorittamaan käytönaikainen rasisitestit, jonka jälkeen koko kitille suoritettiin 2 kk kohdalla reaaliaikainen testaus, jonka kaikki komponentit olivat läpikäyneet yllä kuvatut käytönaikaiset testit. 0-aikapisteenä käytettiin samaa lopputestin tulosta, kuin mitä kiihdytetyissä säilyvyystesteissä oli käytetty.

6.7 Reaaliaikaisten säilyvyystestien tulokset sisältäen kuljetus- ja käytönaikaisen rasisitestin

Kun väliraporttiin tarvittavien reaaliaikapisteiden, 2kk ja 3kk sekä in-use/on-board sekä kuljetusrasisitestit oli ajettu nimikekohtaisten säilyvyystestiohjeiden mukaisesti, tarkasteltiin niiden tuloksia. Testattaville levyille oli punssattu

nimikekohtaisen pipetointikaavion mukaan erilaisia näytteitä, joille kaikille oli määritetty omat hyväksymisrajansa. Hyväksymisrajat näkyvät alla olevissa kuvioissa $+2SD$ / $-2SD$ -limit -viivoina. Kuvioissa on esitetty referenssierän (ref, 40142) sekä testattavan erän (test, 40261) käyrät. Mahdollinen tavoitepitoisuus on ilmaistu kuvioissa katkoviivana (target, conc.). Numerot erien perässä ovat yksilöiviä kombinaationumeroita jäljitettävyyden helpottamiseksi ja ne ovat samat kuin kiihdytetyissä säilyvyystesteissä.

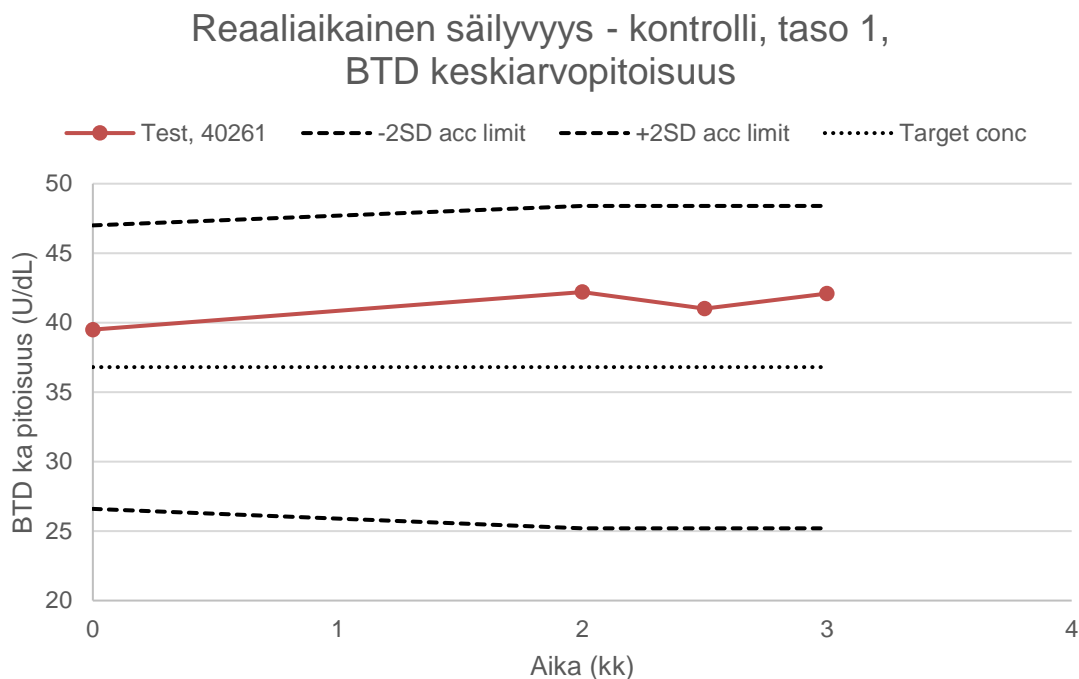
Kuviossa 13 (alla) on kuvattu reaaliaikaisessa säilyvyystestauksessa testattujen näytteiden pitoisuuden keskiarvot. Kaikki testatut näytteet eivät kuitenkaan ole edustettuna kuviossa 13 tulosten ymmärrettävyyden helpottamiseksi.



Kuvio 13. Reaaliaikainen säilyvyys, tulokset käytönaikaisesta ja kuljetusrasitustesteistä.

Kuvio 13 edustaa suurinta osaa reaaliaikaisessa säilyvyystestauksessa testattuja näytteitä 0 kk, 2 kk ja 3 kk kohdalla. Sininen palkki on 0 kk aikapiste, oranssi 2 kk aikapiste ja harmaa edustaa 3 kk aikapistettä. Kuviossa on esitetty testattavan erän tulokset. Säilyvyystesteissä levyille punssattiin seuraavat näytteet: matalan ja korkean tason näytteet C1 ja C2, kontrolli 1 (Q1 (QA1)), kontrolli 2 (Q2 (QA2)), deficient-kontrolli (R1) sekä tasokalibraattorit K1-K4 (TK1-TK4). Levyille punssattiin lisäksi myös kittikalibraattorit, jotka eivät ole

edustettuna kuviossa 13. Kuviossa 14 on esitetty kittikontrollin, taso 1, biotinidaasin keskiarviopitoisuus eri reaaliaikapisteissä.

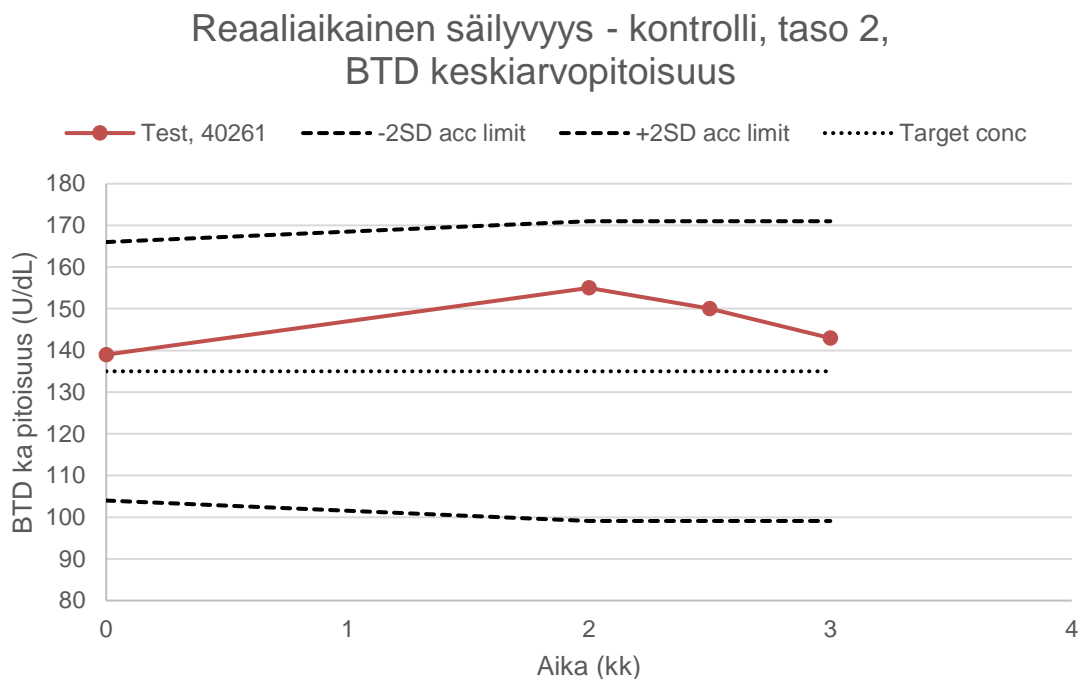


Kuvio 14. Reaaliaikainen säilyvyys. Kontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviossa 14 on esitettynä -2SD/+2SD hyväksymisrajat, sekä kontrollin tavoitearvo (target). Säilyvyystestien tuloksien käsittelyssä käytetään omaa talon sisäistä ohjelmaa, joka laskee hyväksymisrajat sekä tavoitearvon, kun tiedossa on kittikalibraattoreiden eränumero ja niiden tarkat pitoisuudet. Hyväksymisrajat siis vaihtelevat sen mukaan, miten ohjelma sovitaa kittikalibraattoreiden arvojen mukaan muiden tutkittavien näytteiden hyväksymisrajat tietylle kombinaatiolle.

Kontrollin 1 pitoisuus pysyi koko reaaliaikaisen säilyvyystutkimuksen ajan lähes samalla tasolla, ja referenssierän tulokset vastasivat testattavan erän tuloksia. 3 kk aikapisteen kohdalla konsentraatiossa on havaittavissa pientä nousua, joka

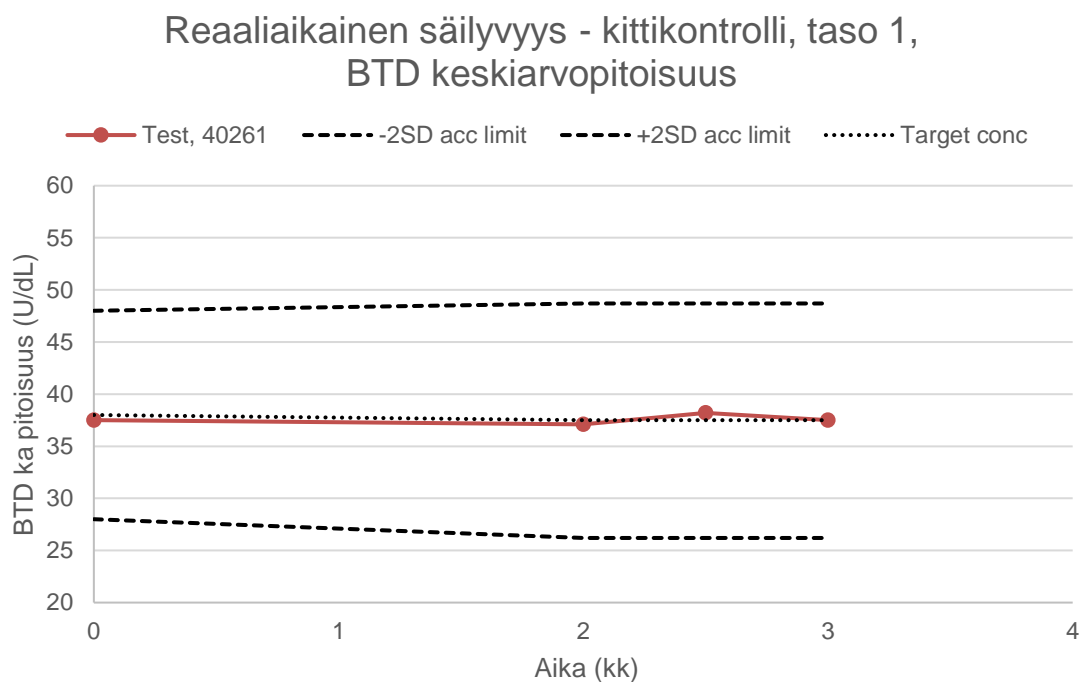
kuitenkin on maltillinen ja hyväksymisrajoissa. Kuviossa 15 on esitetty kittikontrollin, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.



Kuvio 15. Reaaliaikainen säilyvyys, kontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kontrolli 2 eroaa tuloksissa hieman kontrollista 1. 0 kk ja 2 kk aikapisteiden välillä havaitaan konsentraatioissa 15 U/dL nousua, joka kuitenkin laskee lähelle tavoitearvoa 3 kk aikapisteen kohdalla.

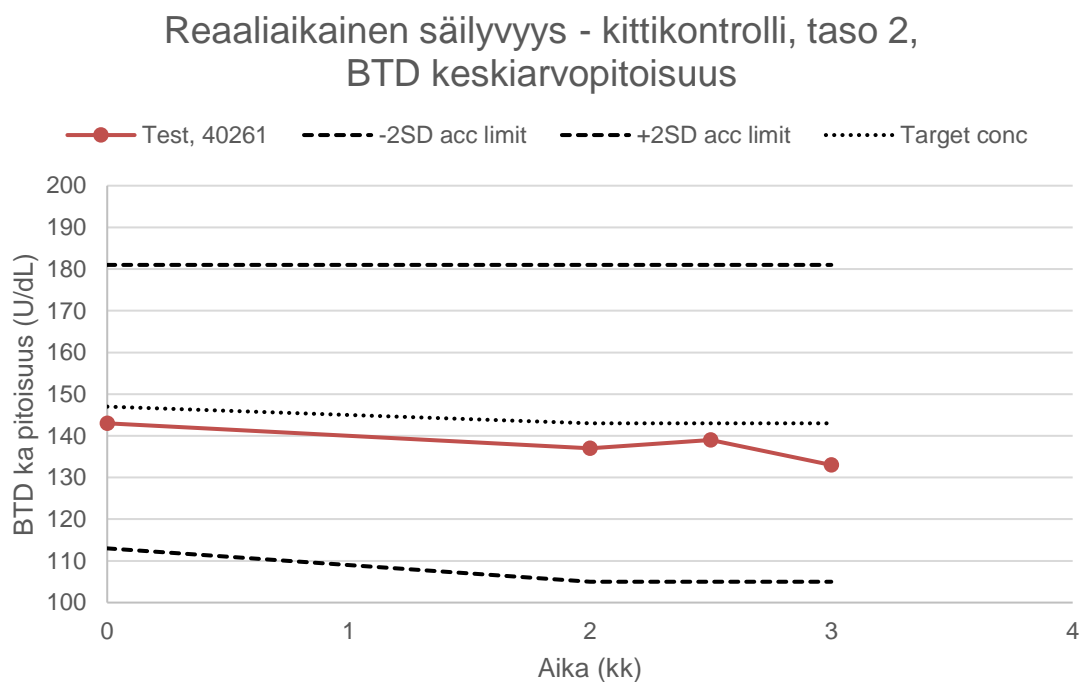
Kuvioista 14 ja 15 nähdään, että molemmat kontrollit olivat hyväksymisrajoissa vielä kitin säilyvyysajan lopussakin, lähellä tavoitearvoa. *In vitro*-vasta-aineella valmistetulla levynimikkeellä ei ole ollut vaikutusta lopputuotteen/kitin toimivuuteen kontrollien osalta. Kuviossa 16 on esitettyä kittikontrollin 1 pitoisuus reaaliaikaisen säilyvyystestauksen aikana.



Kuvio 16. Reaaliaikainen säilyvyys, kittikontrolli, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

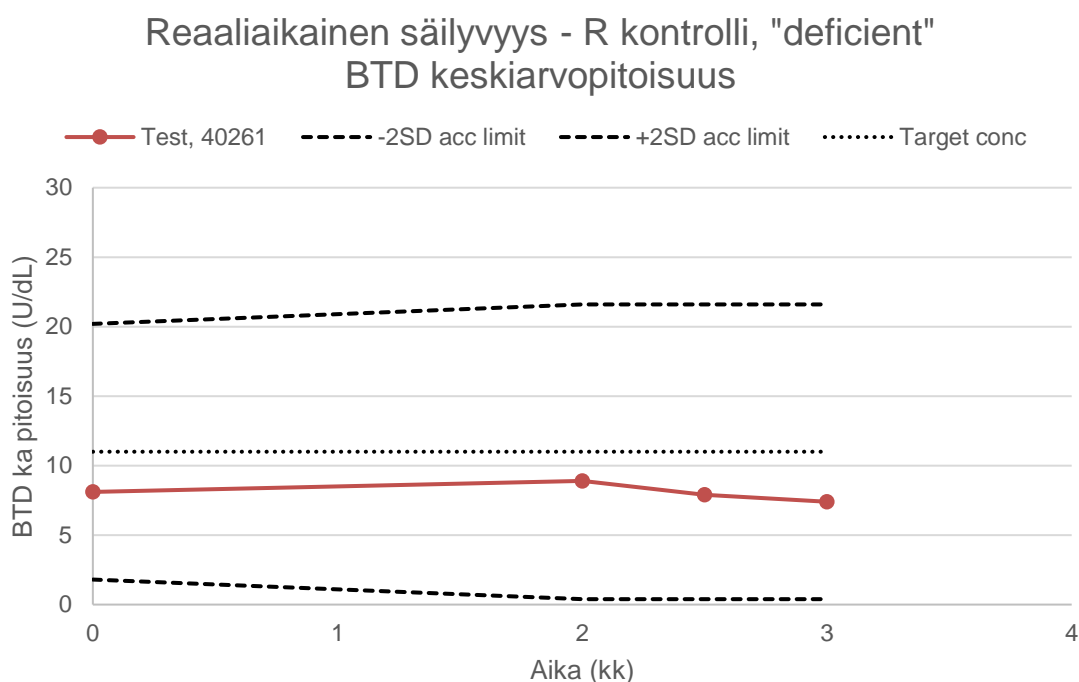
Myös kittikontrolleille lasketaan omat hyväksymisrajat, joiden pitoisuudet määräytyvät kombinaation muiden näytteiden pitoisuuksien mukaan.

Testattavan erän kittikontrolli 1:n pitoisuudet ovat hyvin toisiaan vastaavat koko reaaliaikaisen säilytyksen 0 kk – 3 kk ajan. Kuviossa 17 on esitetty kittikontrollin, taso 2, reaaliaikaisen säilyvyystestauksen tulokset.



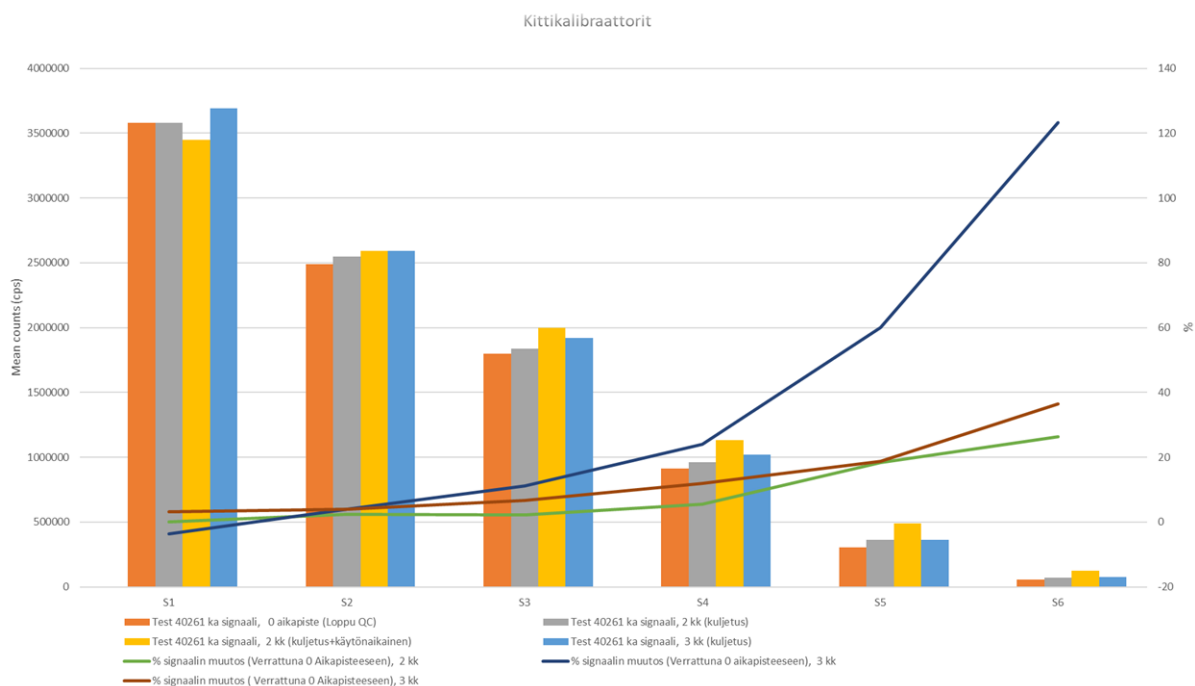
Kuvio 17. Reaaliaikainen säilyvyys, kittikontrolli, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Pitoisuudet vaihtelivat testipisteiden (0 kk – 3 kk) välillä, pysyen kuitenkin 132-145 U/dL välillä. 3 kk aikapisteen kohdalla havaitaan selkeää laskua 0 kk aikapisteseen verrattuna. Tulos voi johtua myös kuljetusrasituksesta, joka suoritettiin ennen säilyvyystestien suorittamista, sillä samankaltaista konsentraation laskua ei ollut havaittavissa kiihdytetyssä säilyvyystestissä kittikontrollilla 2 (kuvio 6). Kuviossa 18 on edustettuna reaaliaikaisessa säilyvyystutkimuksessa testatun R-kontrollin konsentraatiot.



Kuvio 18. Reaaliaikainen säilyvyys, deficient kontrolli, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Deficient kontrolli (R) on oikea potilasnäyte, joka on saatu henkilöltä, jolla on todettu jonkin asteinen biotinidaasin puutostila. Tulokset ovat testattavalla kitillä alle tavoitearvon, mikä on toivottu tulos. Deficient-näytteen tarkoituksena on osoittaa lopputuotteen toimivuus, eli biotinidaasin puutostilan havaitsemisen. R-kontrollin pitoisuus laski hieman reaaliaikaisen säilyvyystestin aikapisteiden 0 kk – 3 kk aikana. GSP® Neonatal Biotinidase kittiin tehtävällä muutoksella ei ollut vaikutusta R-näytteen toimivuuteen reaaliaikaisessa säilyvyystutkimuksessa. Kuviossa 19 on esitetty kittikalibraattoreiden S1-S6 keskiarvosignaalit, sekä niiden prosentuaalinen muutos eri reaaliaikapisteissä.



Kuvio 19. Reaaliaikainen säilyvyys, kittikalibraattorit, signaalin keskiarvo ja niiden muutos eri aikapisteissä.

Palkkikuvaajat esittävät kittikalibraattoreita S1-S6 eri reaaliaikapisteissä (0–3 kk). Signaalin prosentuaalinen muutos on kuvattu viivakuvaajana, ja se kertoo testattavan yhdelmän 40261 prosentuaalista muutosta kunkin kittikalibraattorin kohdalla eri reaaliaikapisteissä. Kuviosta 19 nähdäänkin, että suurin muutos on kittikalibraattorin S6 kohdalla, kun on verrattu keskenään 0-aikapistettä ja 3 kk testipistettä, jota ennen kitille suoritettiin käytönaikainen testi ja kuljetusrasitustestaus. Suuri prosentuaalinen muutos saattaa osaltaan johtua S6 kittikalibraattorin matalasta keskiarvosignaalist, jolloin pienikin signaalien välinen vaihtelu eri aikapisteissä vaikuttaa kasvattavan prosentuaalista muutosta.

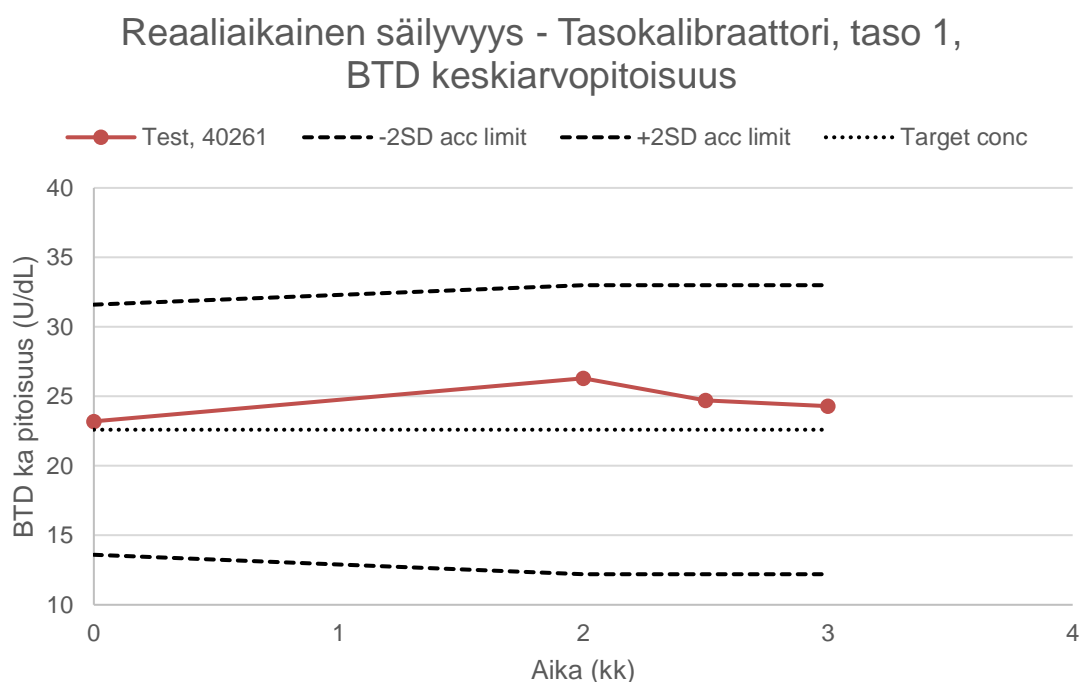
Keskiarvosignaaleissa on havaittavissa hieman nousua reaaliaikaisissa säilyvyystesteissä, erityisesti kittikalibraattoreilla S4, S5 ja S6.

Kehittämistehtävän aikana GSP® Neonatal Biotinidase kitistä oli tullut muutama asiakasvalitus koskien kuviossa 19 näkyvää ilmoitusta. On todennäköistä, että

keskiarvosignaalin nousu aiheutui kuljetus- ja käytönaikaisista räsitusüsteistä, sillä samankaltaista nousua ei havaittu kiihdytetyissä säilyvyystesteissä.

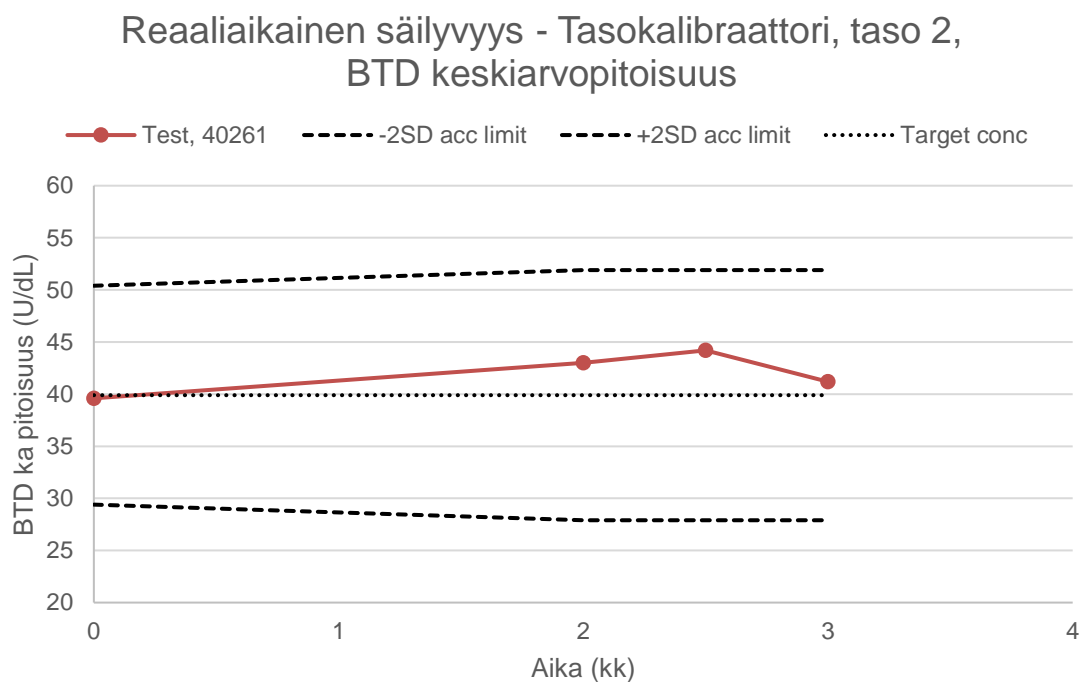
Kuvioissa 20-23 (alla) on esitetty tasokalibraattoreiden 1-4 tulokset.

Tasokalibraattorin 1 keskiarvopitoisuus on esitetty kuviossa 20.



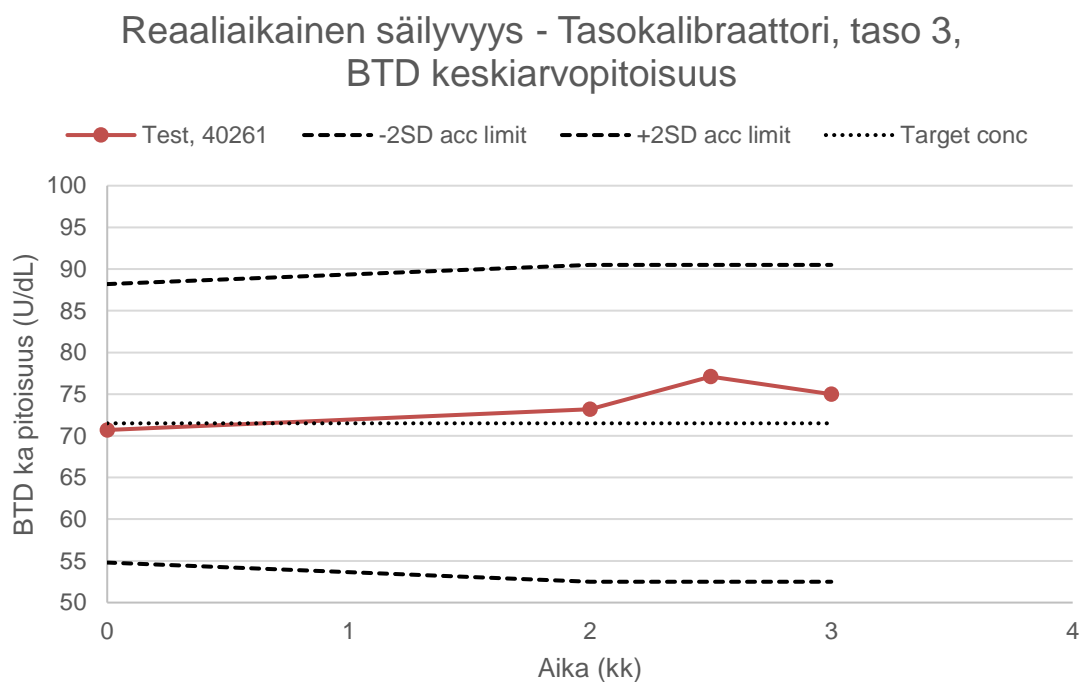
Kuvio 20. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 1, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Tasokalibraattoreiden pitoisuudet tiedetään, ja niiden tasoa vastaan lasketaan tai korjataan myös säilyvyystestauksen tulokset. Kuviosta 20 huomataan, että testattavan erän tasokalibraattorin 1 tulokset ovat lähellä tavoiterajaa ja lähes keskellä hyväksymisrajoja. Konsentraatiot pysyvät lähes samoina koko reaaliaikaisen säilyvyystestauksen ajan. Aikapisteessä 3 kk testattavan erän tasokalibraattorin konsentraatio tasoittui lähemmäs tavoitearvoa, kun tulosta vertaa 2 kk aikapisteeseen. Tasokalibraattorin 2 keskiarvopitoisuus on esitetty kuviossa 21.



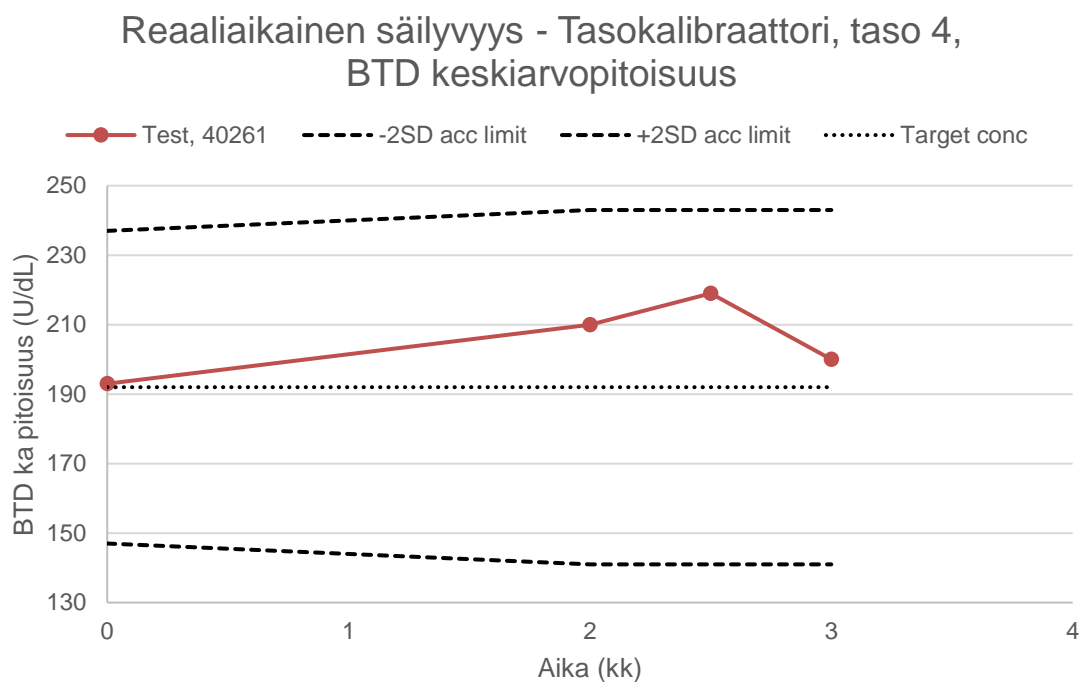
Kuvio 21. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 2, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviosta 21 huomataan, että testattavan erän tasokalibraattorin 2 tulokset ovat lähellä tavoiterajaa ja lähes keskellä hyväksymisrajoja. Aikapisteessä 2 kk konsentraatio on hieman noussut, mutta palautunut lähes tavoitearvoon 3 kk aikapisteen kohdalla. Tasokalibraattorin 3 keskiarvopitoisuus on esitettyä kuviossa 22.



Kuvio 22. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 3, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviosta 22 huomataan, että testattavan erän tasokalibraattorin 3 tulokset ovat lähellä tavoiterajaa 2 kk aikapisteeseen saakka. 2,5 kk kohdalla konsentraatio on hieman noussut (noin 7 U/dL), jonka jälkeen aikapisteessä 3 kk se on palautunut hieman lähemmäs tavoitearvoa. Tasokalibraattorin 4 keskiarvopitoisuus on esitettyinä kuviossa 23.



Kuvio 23. Reaaliaikainen säilyvyys, tasokalibraattori, taso 3, biotinidaasin keskiarvopitoisuus.

Kuviosta 23 huomataan, että testattavan erän tasokalibraattorin 4 tulokset ovat lähellä tavoitearjaa 0 kk aikapisteen kohdalla. Konsentraatio onkin lähtenyt selkeästi nousuun 2 kk - 2,5 kk välillä arvosta 190 U/dL arvoon 219 U/dL. Muutosta on siis tapahtunut 29 U/dL, joka on huomattavan suurta vaihtelua. Vaihtelun syynä saattaa olla kuljetusrasitus, joka suoritettiin kitin kaikille komponenteille. 3 kk aikapisteen kohdalla tasokalibraattori 4 konsentraatio on kuitenkin palautunut lähes samalle tasolle, kuin mitä se oli 0 kk aikapisteessä, ja lähelle tavoitearvoa.

Johtopäätöksenä suoritetuista kiihdytetyistä ja reaaliaikaisista säilyvyystesteistä voidaan sanoa, että vasta-aineen tuottomenetelmän vaihdoksella ei ole ollut vaikutusta lopputuotteen eikä komponenttitason säilyvyyteen. Kiihdytetyllä säilyvyystutkimuksella varmistuttiin lopputuotteen vähimmäissäilyvyysaika 12 kk. Reaaliaikaiset säilyvyystutkimukset jatkuvat edelleen, ja niistä raportoidaan erikseen toimeksiantajan laatujärjestelmän vaatimusten mukaisesti.

7 Johtopäätökset

Kehittämistehtävän tavoite saavutettiin, ja levyvalmistuksen Streptavidin -levynimikkeessä käytettävä *in vivo* -vasta-aine pystyttiin onnistuneesti korvaamaan vastaavalla *in vitro* -vasta-aineella. Tuotannon näkökulmasta katsottuna vain yksi käytettävistä raaka-aineista vaihtui, joten vaihdoksella ei ollut vaikutusta linjan toimintaan tai menettelytapoihin. Suoritettujen tutkimusten, laadunvalvonnan ja säilyvyystutkimusten mukaan verifiointierä täytti kaikki sille asetetut hyväksymisvaatimukset.

Työn suunniteltu aikataulu: 02/2023 – 08/2023

Työn toteutunut aikataulu: 02/2023 – 11/2023

Työn suunniteltu aikataulu laskettiin siten, että 2023 elokuun lopussa olisi saatu säilyvyystestien kolme ensimmäistä aikapistettä testattua ja raportoitua. Kehittämistehtävässä ilmeni aikataulullisia haasteita, eikä suunnitellussa aikataulussa onnistuttu pysymään.

Verifiointierät suunnitellaan valmistettaviksi aina normaalien tuotantoerien rinnalle, ja nämä normaalit tilaukset priorisoidaan ensin, sillä vastasyntyneiden seulonta on turvattava kehittämistehtävienkin viivästymisten uhalla. Verifiointierä saatiin valmistettua levyvalmistuksessa suunnitellun aikataulun mukaisesti.

Työn empiirinen osuus johdatteli mukaillen Roycen (1987) vesiputousmallia. Vaikka alkuperäinen malli on optimoitu käytettäväksi ohjelmistokehitykseen, oli malli toimiva myös tässä kehittämistehtävässä. Projekti eteni yhden vesiputousmallin osion verran kerrallaan, mikä on tyypillistä tässä kehittämistehtävässäkin kyseessä olleessa tarkoin säädellyssä prosessissa, jossa kaikki muutokset tuotteisiin on pystyttävä perustelemaan riskiperusteisesti.

Kehittämistehtävässä kiinnostuksen kohteena olevalle verifiointierälle asetetut hyväksymiskriteerit täyttyivät. Verifiointierä 744447 täytti komponenttien

laadunvalvontatestin hyväksymiskriteerit ja lopputuotteen yhdelmän 40261 lopullinen laadunvalvontatesti oli hyväksyttävä. Yhdelmää 40261 käytettiin 0-pisteenä säilyvyystesteissä ja kiihdytetty säilyvyystestit ja kuljetus + käytönaikaiset säilyvyystestit hyväksyttiin. Reaaliaikaiset säilyvyystestit ovat edelleen käynnissä ja viimeinen aikapiste (13 kuukautta) suoritetaan verifiointierän viimeisen käyttöpäivän jälkeen.

Kehittämistehtävässä kyseessä olleen kitin säilyvyysajan ollessa 12 kk, ei jäljelle jääneitä valmiita kittejä enää lähetetty asiakkaille, sillä kitillä oli säilyvyysaikaa muutoksen implementoimisvaiheessa vain vähän jäljellä. Aikataulullisia haasteita toivat henkilökunnan resurssihaasteet sekä rikkoutunut olosuhdekaappi, jonka takia reaaliaikaiset säilyvyystestit päästiin aloittamaan hieman aikataulusta myöhässä. Loput verifiointierän levyt jätettiin käytettäväksi reaaliaikaisiin laadunvalvontatesteihin, ja ylimääräiset levyt romutettiin, jottei niitä lähetetä eteenpäin asiakkaille.

In vitro-tuottomenetelmällä valmistetun vasta-aineen käyttö tuo toimeksiantajalle joustavuutta töiden suunnitteluun, sillä uuden vasta-aineen saatavuus on paremmin ennakoitavissa kuin *askites*-tuotetun vasta-aineen. *In vitro*-tuotettu vasta-aine valmistetaan olosuhteiltaan kontrolloidussa bioreaktorissa, jolloin mahdolliset vasta-aine-erien vaihtelut tulevat vähentymään. Lisäksi vasta-aineen valmistuksen siirtyessä kokonaan Suomeen, on turvattu myös mahdolliset kuljetushaasteet, kun puhdistamaton *askites*-vasta-aine on kuljetettu EU:n ulkopuolelta Suomeen.

In vitro -tuotettu vasta-aine on lisäksi eettistä, eikä tarvetta vanhan *askites*-vasta-aineen käytölle enää ole. Tulosten luotettavuutta lisää se, että testimenetelmät (GSP-määrytykset, komponenttilaadunvalvonta, lopputestit, säilyvyystestit) pysyivät muuttumattomina. Verifiointierän valmistukseen osallistuneet henkilöt olivat koulutettuja. Prosessikontrollit (taulukot 2-4) olivat vertailukelpoisia muihin valmistettuihin eriin verrattuna.

Loppulaadunvalvonnassa suoritettu 0-aikapiste/lopputesti osoitti sen, että *in vitro* -vasta-aineella valmistetut levyt toimivat kootussa kitissä käyttötarkoituksensa mukaisesti. Kitin käyttötarkoitus ja hyväksymiskriteerit

pysyivät muuttumattomina. Verifiointilla pystyttiin osoittamaan, että vasta-
aineen tuottomenetelmän vaihdolla ei ollut vaikutusta komponentti- tai
lopputuotteen laatuun eikä toimivuuteen käyttötarkoituksessaan.

Lähteet

Bassil, Y. (2012). A simulation model for the waterfall software development Life cycle. [Simulaatiomalli Waterfall-ohjelmistokehityksen elinkaarelle]. *International Journal of Engineering*, 2(5).

Bruce, M. P., Boyd, V., Duch, C., & White, J. R. (2002). Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies—Alternatives to ascites production in mice. [Dialyysipohjaiset bioreaktorijärjestelmät monoklonaalisten vasta-aineiden tuotantoon – Vaihtoehtoja askitestuotannolle hiirissä.] *Journal of Immunological Methods*, 264(1–2), 59–68.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00081-9)

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010 , tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (ETA:n kannalta merkityksellinen teksti). EUVL L 276, 33–79.
<http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

Fimea. (n.d.). *Lääkinnällisen laitteen määritelmä* Haettu 29.05.2024 osoitteesta
https://fimea.fi/laakinnalliset_laitteet/mita-ovat-laakinnalliset-laitteet-/laakinnallisen-laitteen-maaritelma

Groff, K., Brown, J. & Clippinger, A. (2015). Modern Affinity Reagents: Recombinant Antibodies and Aptamers. [Modernit affiniteettireagenssit: Rekombinantti vasta-aineet ja aptameerit]. *Biotechnology advances*. 33.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.004>

IVD/EU/2017/746 (2017). Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EU) 2017/746, annettu 5 päivänä huhtikuuta 2017, in vitro -diagnostiikkaan tarkoitetuista lääkitämisistä laitteista sekä direktiivin 98/79/EY ja komission , päätöksen 2010/227/EU kumoamisesta. Euroopan Union virallinen lehti L117, 60. vuosikerta, 5.5.2017. s.328. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2017:117:FULL>

Kaye, C. I. & Committee on Genetics (2006). Newborn Screening fact Sheets [Vastasyntyneiden seulonnan faktatietoa]. *Pediatrics*, 118(3), e934-e963.
<https://doi.org/10.1542/peds.2006-1783>

Lapatto, R., Niinikoski, H., Nääntö-Salonen, K. & Mononen, I. (2018). Viitattu 05.06.2024 osoitteesta: [duo14149.pdf \(duodecimlehti.fi\)](#)

Mak, T. W., Saunders, M. E., Tamminen, W. L., & Chaddah, M. R. (2005). The Immune Response: Basic and Clinical Principles. [Immuunivaste: perus- ja kliiniset esimerkit]. *Elsevier Science & Technology*.

Milstein, C. & Cuello A. C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunochemistry. [Hybridi hybridoomasolut ja niiden käyttö immunokemiassa]. *Nature* 305: 537–541. <https://doi.org/10.1038/305537a0>

National Research Council, Institute for laboratory animal research, & Committee on methods of producing monoclonal antibodies. (1999). Monoclonal Antibody Production. [Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotanto.] *National Academies Press*.

Niinikoski, H., Karppinen, S., Loo, B-M. & Kurkijärvi, R. (2021). Aineenvaihduntatauteja on seulottu lähes neljännesmiljoonalta vastasyntyneeltä. *Lääkärilehti.fi*.
<https://www.laakarilehti.fi/tieteessa/katsausartikkeli/synnynnaisia-aineenvaihduntatauteja-on-seulottu-suomessa-jo-lahes-neljannesmiljoonalta-vauvalta/?public=d15f8c63aa59ba6619e35e91be428c32>

Revvity (2023). GSP® Neonatal Biotinidase kit. Time-resolved immunofluorescence assay. Tuote-esite.

Ricci, V., Esteban, M. P., Sand, G., & Meneses, M. M. (2021). Interference of anti-streptavidin antibodies: More common than we thought? In relation to six confirmed cases. [Streptavidiinivasta-aineiden häiriöt: yleisempää kuin

luulimme? Kuusi vahvistettua tapausta.] *Clinical Biochemistry*, 90, 62–65.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.01.013>

Royce, W. (1987). Managing the development of large software systems: concepts and techniques. [Suurten ohjelmistojärjestelmien kehittämisen hallinta: konseptit ja tekniikat.]. In Proceedings of the 9th international conference on Software Engineering (ICSE '87). IEEE Computer Society Press 328–338.

Seulottavat sairaudet. (2024). TYKS. Verkkosivu. Viitattu 04.10.2024.
<https://www.tyks.fi/tietoa-tyksista/tyksin-organisaatio/saske/seulottavat-sairaudet>

Valdés, R., Tamayo, A., González, M., Padilla, S., Geadá, D., Ferro, W., Milá, L., Gómez, L., Alemán, R., Leyva, A., García, C., Mendoza, O., Alvarez, T., Dorta, L., Villega, Y., Cecilia, D., Aragón, H., González, T., La O, M., & López, J. (2012). Production of a monoclonal antibody by ascites, hollow fiber system, and transgenic plants for vaccine production using CB.Hep-1 mAb as a study case. [Monoklonaalisen vasta-aineen tuotanto askites-, onttokuitujärjestelmän ja siirtogeenisten kasvien avulla rokotteen tuotantoa varten käyttämällä CB.Hep-1 mAb:tä tutkimustapauksena]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering : BBE*, 17(1), 145–159. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0196-2>

Virella, G. (2019). Medical Immunology, 7th Edition, 55-56. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9780824745097>

Wolf, B. (2012): Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". [Biotinidaasin puutostila: "jos sinulla olisi oltava joku perinnöllinen aineenvaihduntasairaus, se olisi tämä".] *Genet. Med.*, 14(6), 565-575. <https://doi.org/10.1038/gim.2011.6>

Zheng, L., & Shameem, M. (2014). Monoclonal antibodies: development, delivery and applications. [Monoklonaaliset vasta-aineet: kehittäminen, kuljettaminen ja soveltaminen.]. *Future Science*.