

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2015

Henriikka Salminen

# IMMUNODIAGNOSTISEN TUOTTEEN LOPPUKÄSITTELYVAIHEEN KARAKTERISOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Henriikka Salminen

## IMMUNODIAGNOSTISEN TUOTTEEN LOPPUKÄSITTELYVAIHEEN KARAKTERISOINTI

Opinnäytetyössä tavoitteena on selvittää immunodiagnostisen tuotteen loppukäsittelyajan lyhentämistä. Työn toimeksiantajana toimii DHR Finland Oy Innotrac Diagnostics, joka valmistaa diagnosointiin tarkoitettuja testikasetteja AQT90 FLEX -laitteeseen. Tavoitteena on löytää menetelmä ja kuivausolosuhde, jolla loppukäsittelyaika saataisiin nykyisestä lyhennettyä.

Testeissä tutkittiin kaksi eri kuivausmenetelmää: puhalluskuivaus ja kaappikuivaus. Kuivausparametreja ovat aika, lämpötila ja suhteellinen kosteus. Valittujen olosuhteiden avulla voidaan päätellä kuivauksessa vaadittujen parametrien ylä- ja alarajat. Tuloksista pyritään selvittämään mitkä testatuista parametreista antavat toivottuja tuloksia ja mitkä eivät toimi. Tuloksia analysoimalla selvitetään mitkä kuivausolosuhteet eivät poista kupista riittävästi kosteutta sekä mitkä lämpötilat ja kuivausajat ovat kupin sisältämille biomolekyylille vahingollisia.

Kuivakemian stabiilisuutta testataan rasittamalla kasetteja ääriolosuhteessa: lämpötila +32 °C ja suhteellinen kosteus 80 %. Jokaisesta kuivausolosuhteesta analysoidaan neljä aikapistettä: 0, 7, 14 ja 21 vuorokautta. Stabiilisuustesteillä selvitetään jokaisen olosuhteen kaseteille käyttöikä, kuinka kauan kasetti säilyy laitteessa käyttökelpoisena.

Tuloksista havaitaan, että kaappikuivauksen kontrolloimaton kosteus ei ole riittävän alhainen poistamaan kupista riittävästi kosteutta. Tuotteesta ei poistu riittävästi kosteutta, jos suhteellinen kosteus on yli 10 %. Kuivauskaappituloksista havaitaan, että korkeampi lämpötila mahdollistaa lyhyemmän käsittelyajan. Lisäksi pidempi käsittelyaika parantaa tuotteen rasituksenkestoa.

Puhallusmenetelmät eivät toimineet, koska rasituksen aiheuttamaa signaalinlaskua tapahtui liikaa kaikilla testatuilla olosuhteilla. Tämä menetelmä ei toiminut, koska ympäröivän tilan kosteus oli liian korkea, eikä sitä ollut mahdollista säätää käsittelyn ajaksi. Puhalluslämpötila +45 °C kuitenkin vaikutti lupaavalta, mahdollisella kosteudensäädöllä tästä voisi saada toimivan loppukuivausmenetelmän.

Tuloksien perusteella löytyi kolme olosuhdetta, jotka voisivat korvata nykyisen loppukäsittelyvaiheen. Lisäksi löytyi muutamia kuivausolosuhteita, jotka vaikuttavat lupaavilta pienillä muutoksilla ja lisätutkimuksilla.

### ASIASANAT:

loppukäsittely, loppukuivaus, kuivausolosuhteet, puhalluskuivaus, kaappikuivaus, kuivakemia, immunodiagnostiikka, amorfisuus, stabiilisuus, trehaloosi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 41

Kari Haajanen; Janne Suojanen

Henriikka Salminen

## FINISHING STAGE CHARACTERIZATION OF IMMUNODIAGNOSTIC PRODUCT

The purpose of this thesis was to examine the possibilities of shortening the finishing time of an immunodiagnostic product. The study was commissioned by DHR Finland Oy Innotrac Diagnostics which produces diagnosis cartridges for use in the AQT90 FLEX device. The objective of this study was to find a method and drying conditions which would shorten the finishing time.

Two drying methods were studied, namely through drying and cabinet drying. Duration, temperature and relative humidity were the drying parameters. The required upper and lower limits of the drying parameters could be determined based on the selected conditions. It was determined from the tested results which parameters give desired results and which are not functional for the drying. The results allowed the determination of which drying conditions do not remove enough moisture from the cup and which temperatures and drying times are harmful for the biomolecules.

Dry chemistry stability was tested by straining the test cartridges in extreme conditions (temperature +32 °C and relative humidity 80 %). Four time points, 0, 7, 14, and 21 days, were analyzed for all drying conditions. In-use stability was determined for each time point by stability studies. In-use stability time indicates how long the cartridges are usable in the device.

In cabinet drying the uncontrolled relative humidity is not low enough, because moisture is insufficiently removed by evaporation. If relative humidity is over 10 %, drying is not adequate. Higher drying temperature enables shorter treatment time and longer treatment time improves endurance.

None of the through drying methods worked because there was too much signal decrease caused by the stress. Ambient humidity was too high and it was not possible to lower it. However, the through-drying temperature of +45 °C seemed promising. With controllable ambient temperature the drying method could be applicable.

There were three finishing conditions that could replace the current finishing state. In addition, a few drying conditions seemed promising with some modification and further investigation.

### KEYWORDS:

finishing, final drying, drying conditions, through drying, cabinet drying, dry chemistry, immunodiagnosics, amorphous, stability, trehalose

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 KUIVAKEMIA</b>	<b>9</b>
2.1 Testikupin valmistus	9
2.2 Kupin toiminta ja mittaus	10
2.3 Kasetin käyttöikä	12
<b>3 VÄLIKERROKSEN AINESOSAT</b>	<b>13</b>
3.1 Trehaloosi	13
3.2 BSA	14
3.3 Kaseiini	15
<b>4 KUIVAKEMIAN TOTEUTUS</b>	<b>16</b>
4.1 Amorfisuus ja kiteytyminen	16
4.2 Aktiivisuus ja stabiilisuus	19
<b>5 LOPPUKUIVAUS JA SIGNAALIN MÄÄRITYS</b>	<b>21</b>
5.1 Kuivausolosuhteet	21
5.1.1 Puhallusolosuhteet	21
5.1.2 Kaappiolosuhteet	22
5.2 Rasitus	23
5.3 Signaalin määrittäminen	24
<b>6 TULOKSET</b>	<b>25</b>
6.1 Näytetaustatulokset	25
6.1.1 Puhallusolosuhteet	25
6.1.2 Kuivauskaappiolosuhteet	27
6.2 Näytetulokset	29
6.2.1 Puhallusolosuhteet	29
6.2.2 Kaappiolosuhteet	32
<b>7 POHDINTA JA PÄÄTELMÄT</b>	<b>38</b>

## KUVAT

Kuva 1. AQT90 FLEX immunoanalysaattori (2).	6
Kuva 2. Testikasetti (2).	7
Kuva 3. Testikupin valmistusprosessi (11).	9
Kuva 4. Analyysin vaiheet (6).	10
Kuva 5. Ei -kilpaileva immunomääritys (sandwich).	11
Kuva 6. Lasisiirtymälämpötila (24).	17
Kuva 7. Puhallusolosuhteiden taustatulosten 0 d ja 21 d keskiarvot.	26
Kuva 8. Kaappiolosuhteiden taustatulosten 0 d ja 21 d keskiarvot.	28
Kuva 9. Puhallusolosuhteiden näytetulosten aikapisteiden kautta piirretyt kuvaajat.	31
Kuva 10. Kaappiolosuhteiden näytetulosten aikapisteiden kautta piirretyt kuvaajat.	35

## TAULUKOT

Taulukko 1. Puhallusolosuhteet.	21
Taulukko 2. Kaappiolosuhteet.	22
Taulukko 3. Kuivauskaappien toteutuneet lämpötila- ja kosteusarvot.	23
Taulukko 4. Ajojärjestys.	24
Taulukko 5. Puhallusolosuhteiden taustatulosten keskiarvot sekä 21 d prosentuaalinen muutos.	26
Taulukko 6. Kaappiolosuhteiden taustatulosten keskiarvot sekä 21 d prosentuaalinen muutos.	27
Taulukko 7. Puhallusolosuhteiden näytetulosten keskiarvot.	29
Taulukko 8. Puhallusolosuhteiden näytetulosten prosentuaaliset muutokset.	29
Taulukko 9. Puhallusolosuhteiden maksimi muutos ja käyttöikä.	30
Taulukko 10. Puhallusolosuhteiden näytetulosten CV:t.	31
Taulukko 11. Puhallusolosuhteiden näytetulosten kulmakertoimet sekä selitysasteet.	32
Taulukko 12. Kaappiolosuhteiden näytetulosten keskiarvot.	33
Taulukko 13. Kaappiolosuhteiden näytetulosten prosentuaaliset muutokset.	33
Taulukko 14. Kaappiolosuhteiden maksimi muutos sekä käyttöikä.	34
Taulukko 15. Kaappiolosuhteiden näytetulosten CV:t.	36
Taulukko 16. Kaappiolosuhteiden näytetulosten kulmakertoimet sekä selitysasteet.	37

# 1 JOHDANTO

Turkulaisen DHR Finland Oy Innotrac Diagnostics yrityksen toiminta perustuu kuivakemiaa ja immunodiagnostiikkaa sisältävien analyysikasettien valmistukseen (1). Yritys on perustettu vuonna 1995, vuonna 2001 lanseerattiin AiO! -laite sekä tähän kolme määrittysmenetelmää akuutin sydäninfarktin toteamiseen. Tuotteiden kemia ja määrittysperiaate on pysynyt samana vaikka nykyinen määrittys tehdään AQT90 FLEX -analysaattorilla. AQT90 FLEX immunoanalysaattori kuvassa 1. (1, 2)



Kuva 1. AQT90 FLEX immunoanalysaattori (2).

Vuonna 2006 Tanskalainen Radiometer osti Innotrac Diagnostics Oy:n. Radiometer kehitti AQT90 FLEX -immunoanalysaattorin antigeenin määrittämiseen perustuvien testien instrumentiksi (3). (2)

Innotrac valmistaa testikasetteja, jotka sisältävät jotain yhdeksästä eri analyytistä: Troponiini I, Troponiini T, CK-MB, Myoglobiini, D-dimeeri, CRP, NT-proPNB, PCT ja  $\beta$ hCG (4). Testikasetissa on kertakäyttöisiä analyysikaivoja. Jokainen kaivo sisältää määrittämiseen tarvittavat immunokemialliset reagenssit. (5)

Testikasetin ja AQT -laitteen toiminta yhdessä perustuu ei -kilpailevaan immunomääritykseen (*engl.* sandwich assay), jota käytetään paljon immunodiagnostisissa määrittämissä. Analyysikaivot pakataan muovikasettiin, jonka pohjaan sekä kanteen saumataan laminaatit. Valmis testikasetti on kuvassa 2. (1, 6)



Kuva 2. Testikasetti (2).

Opinnäytetyön tarkoituksena on kuivata testikasetteja käyttäen eri menetelmiä ja näille useampia eri olosuhteita. Valmistettuja testikasetteja rasitetaan ja niiden stabiilisuutta sekä aktiivisuutta tarkastellaan.

Nykyinen prosessin läpivientiaika on tuotannon kasvua ja tuotannonsuunnittelun joustavuutta rajoittava tekijä. Kuivauksessa tarvittavien kuivauskaappien määrä ja niiden viemä tila aiheuttavat kuluja, lisäksi kuivauskaapeilta vaaditut parametrit rasittavat kuivauskaappeja ja aiheuttavat tästä syystä korjaus- ja huoltokustannuksia.

Tuotteen loppukäsittelyaikaa olisi tarpeellista lyhentää 30 %, mutta mielellään 70 %. Saatujen tulosten avulla voidaan suorittaa lisätestauksia ja tätä kautta mahdollisesti kehittää prosessia.



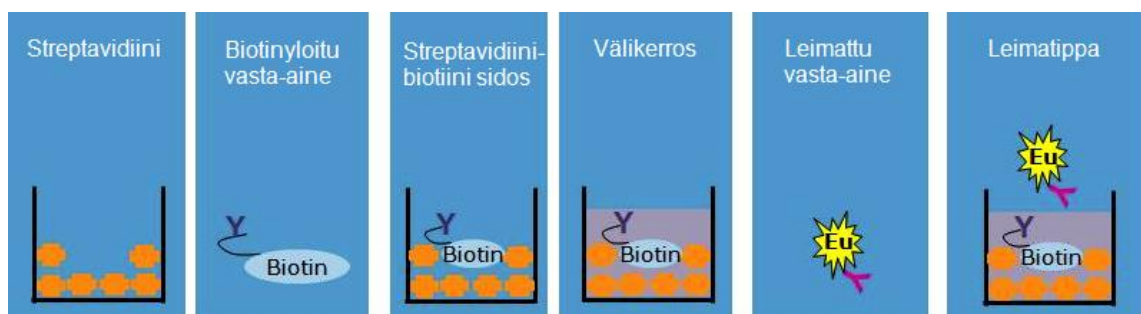
## 2 KUIVAKEMIA

Kuivakemiallisessa konseptissa kaikki tai lähes kaikki tarvittavat reagenssit ovat annosteltu samaan astiaan ja kuivattu kiinteään muotoon. Kuivakemialla mahdollistetaan ns. all-in-one tuotteiden valmistus. All-in-one tuotteella tarkoitetaan kokonaisuutta, jossa kaikki tarvittavat materiaalit ja reagenssit sisältyvät pakettiin. Lisäksi ne ovat helposti ja nopeasti käytettävissä. (7)

Reagenssien käyttö helpottuu, koska vältetään reagenssien valmistamiselta ja sekoittamiselta. Usein myös reagenssien stabiilisuus paranee kuivauksen myötä (8). Kuivakemialliset testit perustuvat yleensä kemiallisten reaktioiden kvantitatiiviseen määrittämiseen (9). Lisäksi kuivakemiatesteistä tulokset saadaan yleensä hyvin nopeasti. (7)

### 2.1 Testikupin valmistus

Testikasetin muoviset kupit päällystetään passiivisen adsorption avulla streptavidiinilla (3). Streptavidiiniproteiinilla on korkea sitoutumisaffiniteetti biotiiniin sekä biotinyloituihin biomolekyyleihin (10). Testikuppeihin lisätään biotinyloitu vasta-aine, joka sitoutuu tiukasti testikupin pohjaan streptavidiinibiotiini sidoksen avulla. (1)



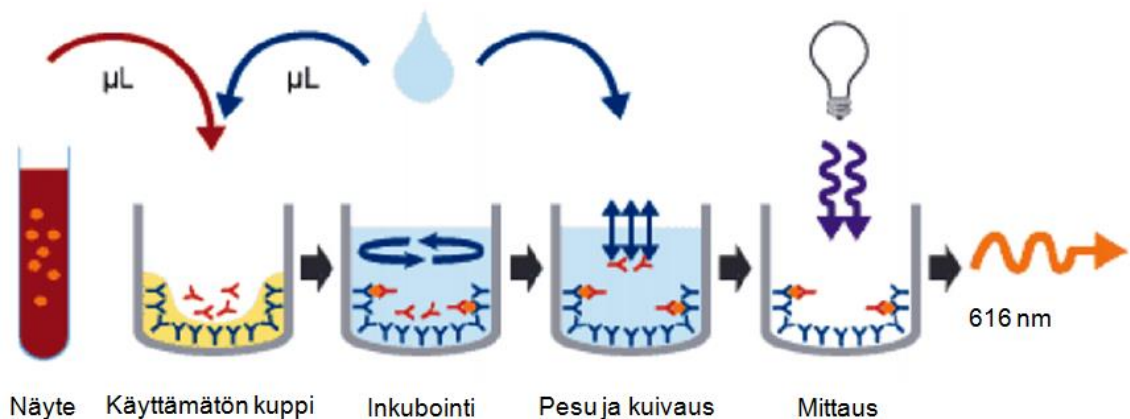
Kuva 3. Testikupin valmistusprosessi (11).

Testikupit päällystetään välikerroksella, jonka tehtävä on peittää ja suojata biotinyloitua vasta-ainetta. Testikupit kuivataan, jonka jälkeen kuppeihin lisätään fluoresoiva europiumkelaatilla leimattu vasta-aine. Lopuksi ennen kasetteihin pakkausta testikupit kuivataan uudelleen, ns. loppukuivaus. Testikasetin kupin valmistus on esitelty kuvassa 3. (1)

## 2.2 Kupin toiminta ja mittaus

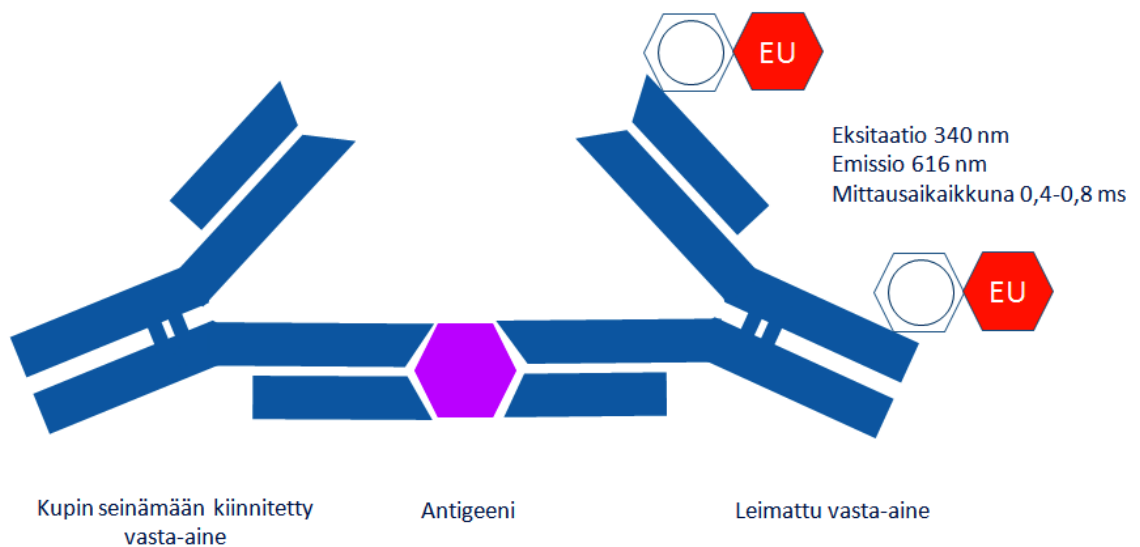
Määrittämiseen AQT90 FLEX -laite tarvitsee testikasetin sekä täysveri- tai plasmanäytteen. Lisäksi laite tarvitsee reagenssipaketin (*engl.* solution pack), joka sisältää ajossa tarvittavan puskurin. Laite kerää käytetyt kupit sekä muut analyysissä syntyvät jätteet solution packiin. (2)

Laite annostelee näytettä sekä puskuria testikasetin kaivoon, jonka jälkeen kaivoa inkuboidaan. Jokaisella analyytillä on oma optimoitu inkubointiaika, korkeintaan 20 minuuttia. (2)



Kuva 4. Analyysin vaiheet (6).

Inkuboinnin aikana näytteen antigeeni tarttuu kupin pohjalla olevaan biotinyloituun vasta-aineeseen sekä europiumleimattuun vasta-aineeseen, muodostaen sandwich rakenteen. Inkuboinnin jälkeen europiumleimattu sitoutumaton vasta-aine pestään pois, ja testikuppi kuivataan. Prosessin kulku AQT –laitteessa on esitetty kuvassa 4. (1, 6)



Kuva 5. Ei -kilpaileva immunomääritys (sandwich).

Sitoutuneen antigeenin laite havaitsee aikaerotteisen fluoresenssin avulla (2). Kaivon sitoutunutta europiumkelaattia viritetään valon aallonpituudella 340 nm. Kiinnittyneet vasta-aineet emittoivat aallonpituudella 616 nm. Mitatun säteilyn valon määrä on suoraan verrannollinen antigeenin pitoisuuteen näytteessä. Vasta-aineiden ja antigeenin sitoutuminen sandwich rakenteella sekä mittaus kuvassa 5. (1, 6)

### 2.3 Kasetin käyttöikä

Laitteita sekä kasetteja myydään ympäri maailman ja ilmasto-olosuhteet joissa laitetta käytetään vaihtelevat paljon. Tästä johtuen kasettien, kuppien ja niiden sisältämän kemian tarvitsee toimia myös ääriolosuhteissa. Laitteelle ja kaseteille on määritetty olosuhteet, jossa niitä saa käyttää: lämpötila-alue 15–32 °C ja suhteellinen kosteus 20–80 %. Suhteellinen kosteus (RH) on ilmassa olevan vesihöyryn määrän suhde maksimi vesihöyryn määrään. (12)

Jokaiselle analyttikasetille on määritelty oma käyttöikä (*engl.* in-use stability). Käyttöikä tarkoittaa aikaa, kuinka kauan kasetti säilyy pakkauksesta poistamisen ja laitteeseen asettamisen jälkeen stabiilina. Kasetit ovat laitteeseen syöttämisen jälkeen määritetyn ajan ajokelpoisia. Tämän ajan jälkeen kasetteja ei voi enää käyttää analyysissä. (13)

Karakterisoitavia kasetteja on rasiattu olosuhdehuoneessa, jonka lämpötila on +32 °C ja suhteellinen kosteus 80 %. Rasiustestillä testataan kasettien toiminta ääriolosuhteissa, jotka ovat maksimi olosuhteet, joissa kasetteja saa käyttää. Opinnäytetyön kartoituksessa analyytille hyväksytään maksimissaan 10 % signaalilasku lähtösignaaliin verrattuna.

Käyttöikä on määritelty signaalilaskun avulla. Käyttöikä on vuorokausimäärä jolloin sallittu 10 % signaalilasku tulee täyteen. Myytävän testikasettikitin ohessa toimitettavassa materiaalissa on mainittu käyttöikä, joka analyytistä riippuen on keskimäärin 14 vuorokautta.

### 3 VÄLKERROKSEN AINESOSAT

Välikerroksen on tarkoitus estää europiumleimattua vasta-ainetta reagoimasta kaivomateriaalin kanssa. Leimattu vasta-aine annostellaan kuppiin puskurissa, jossa on samat ainesosat kuin välikerroksessa (7). Välikerros suojelee biotiiniä sekä molempia vasta-aineita kuivauksen aikana sekä tämän jälkeen. (1)

Välikerros valmistetaan useista eri raaka-aineista, kuten suoloista, proteiineista ja epäorgaanisista yhdisteistä. Pääasialliset komponentit ovat kuitenkin trehaloosi sokeri, kaseiini ja BSA (*engl. bovine serum albumin*). (7)

Välikerroksen trehaloosi ja BSA vaikuttavat kaivomateriaalin säilyvyyteen. BSA vaikuttaa lisäksi taustaan ja toistettavuuteen. Kaseiini ja suola edesauttavat näytteen toimivuutta. (7)

#### 3.1 Trehaloosi

Trehaloosi on ei-pelkistävä disakkaridi, jota tavataan mm. sienissä, hiivoissa, bakteereissa, kasveissa ja hyönteisissä. Näiden organismien kuivassa selviytymisominaisuutta on pidetty juuri trehaloosin ansiona. (5)

Trehaloosi suojelee organismeja kuivumiselta ja kuumuudelta sekä parantaa proteiinien stabiilisuutta sekä laskostumista (14). Muihin sokereihin verrattuna trehaloosilla on ylivoimaiset biologiset suojeluoimaisuudet. Näihin kuuluvat ainutlaatuiset vedenkorvausominaisuudet, korkea lasisiirtymälämpötila sekä kemiallinen inerttisyys. (15)

Trehaloosilla on erityinen kyky stabiloida biomolekyylejä, soluja ja kudoksia kuivauksen aikana. Muihin disakkareihin verrattuna trehaloosilla on ainutlaatuinen kyky muodostaa vetysidoksia. (16)

Trehaloosilla on erityisen korkea lasisiirtymälämpötila  $T_g$ , 100–120 °C, tämän vuoksi disakkaridi säilyy laajalla lämpötila-alueella (5). Trehaloosin kiteytymislämpötilan on mitattu olevan noin 160–190 °C (5). Amorfisen trehaloosin  $T_g$  lämpötilan on mitattu olevan yli 90 °C astetta, jos jäljellä olisi vielä 1–2 % kosteutta. Tämä ominaisuus tarjoaa proteiineille suojaa ääriolosuhteissa. (8)

Trehaloosi muodostaa stabiileja dihydraatti kiteitä, jotka voivat kuivumisen yhteydessä muuttua useaksi anhydraatiksi ja osittain hydratoituneeksi kiderakenteeksi. (15)

Antioksidantit suojaavat proteiineja hapettumisreaktioilta hapettumalla itse. Trehaloosilla on havaittu olevan antioksidanttisia ominaisuuksia. Tämä estää solun sisäpuolella tapahtuvaa happiradikaalien aiheuttamaa vahinkoa. Tutkimuksessa on huomattu ulkoisen trehaloosin estävän myös solun ulkopuolella tapahtuvaa hapettumista sekä suojaavan solun solukalvoa (17). (5)

### 3.2 BSA

BSA on proteiini, jota käytetään biokemiallisissa sovelluksissa, koska tämä stabilisoi eikä häiritse biologisia reaktioita (18). Albumiineja esiintyy nisäkkäiden kehon nesteissä ja kudoksissa sekä joidenkin kasvien siemenissä. (19)

Albumiineilla on pieni molekyylipaino ja ne ovat vesiliukoisia. Lisäksi ne kiteytyvät helposti. Albumiinit sitovat muun muassa vettä ja natriumia. Albumiinien merkittävin biologinen tehtävä on säädellä veren osmoottista painetta. (19)

### 3.3 Kaseiini

Kaseiini on fosforipitoinen proteiini, jota saadaan maidosta. Maidon kokonaisproteiinipainosta 78 % on kaseiinia. Kaseiini on suuri pallomainen proteiini ja kaseiinit voidaan jakaa useampaan alaryhmään. (20)

Kaseiinimisellimuodostelman oletetaan parantavan stabiilisuutta sekä sitovan vettä rakenteeseensa. Kaseiini on yksi harvoista proteiineista, joka säilyy stabiilina yli 100 °C lämpötilassa. Kaseiinin koaguloituminen tapahtuu vasta lämpötilassa 160–200 °C. (20)

## 4 KUIVAKEMIAN TOTEUTUS

Tuotteessa tapahtuvat kemialliset sekä biokemialliset reaktiot vaikuttavat tuotteen laatuun. Usein nämä reaktiot johtavat myös fysikaalisten ominaisuuksien muutoksiin. Kuivumista tapahtuu, kun veden höyrynpaine tuotteessa on korkeampi, kuin ympäröivän ilman höyrynpaine. Kuivumisen nopeus ja määrä riippuvat höyrynpaineesta sekä veden aktiivisuudesta. (21)

Monet kemialliset reaktiot tarvitsevat vettä tapahtuakseen. Veden aktiivisuustasolla kuvataan veden vuorovaikutusta tuotteessa. Veden aktiivisuus  $a_w$  on tuotteen veden höyrynpaine suhteessa puhtaan veden höyrynpaineeseen samassa lämpötilassa. Sokerin läsnä ollessa tuotteen höyrynpaine on pienempi ja näin ollen myös  $a_w$  on pienempi. (21)

Koska höyrynpaine on riippuvainen suhteellisesta kosteudesta, tuotteen veden aktiivisuus voi olla riippuvainen ympäröivän ilman tasapainokosteudesta (*engl.* ERH, equilibrium relative humidity). Mikäli tuotetta säilytetään tilassa, jossa suhteellinen kosteus on vähemmän kuin ERH, siirtyy kosteutta tuotteesta ympäröivään ilmaan, kunnes tasapaino on saavutettu. Tuotteessa oleva vapaa vesi on huomattavasti helpompi poistaa sitoutuneeseen veteen verrattuna. (21)

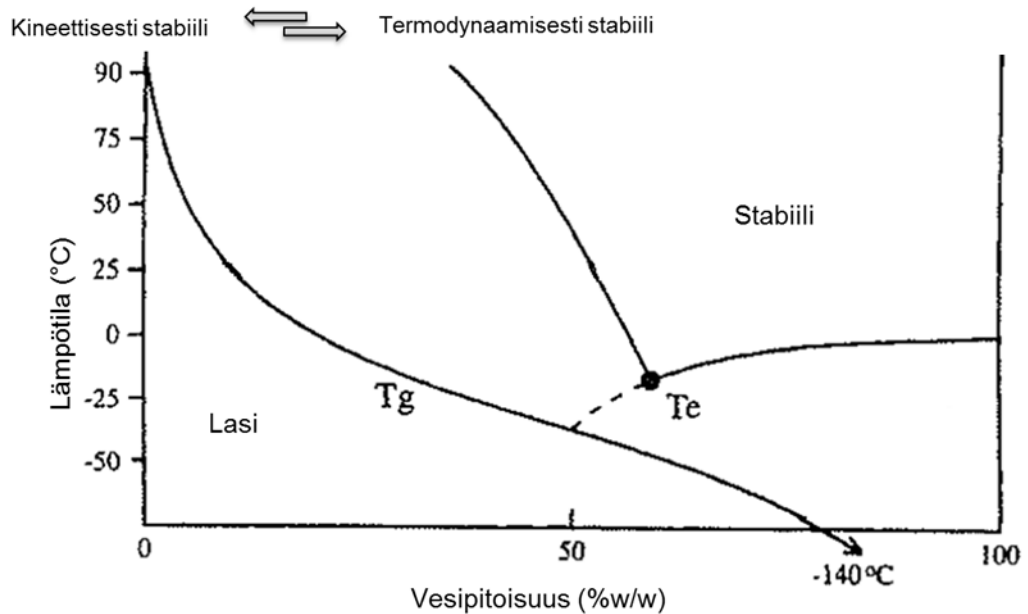
### 4.1 Amorfisuus ja kiteytyminen

Molekyylien järjestäytymisasteen perusteella kiinteä aine luokitellaan amorfiseksi tai kiteiseksi. Kiteiselle aineelle on ominaista tarkka ja laaja-alainen molekyyli­rakenteen järjestäytyminen, amorfisella aineella ei tämän kaltaista järjestäytymistä ole. (22)

Amorfinen aine voi olla rakenteeltaan lasimainen tai kumimainen. Tätä siirtymää kutsutaan lasisiirtymäksi (*engl.* glass transition). Amorfisuuden pysyvyys riippuu lämpötilasta, vesipitoisuudesta sekä veden aktiivisuudesta (23). Lasisiirtymälämpötilan  $T_g$  (*engl.* glass transition temperature) alapuolella amorfinen aine



pysyy lähes stabiilina lasimaisena. Lämpötilan kohotessa  $T_g$  yläpuolelle aine alkaa muuttua kumimaiseksi. Kosteus aiheuttaa kumimaisuutta laskemalla  $T_g$ :tä, tällöin amorfinen tila romahtaa ja aineen kiteytyminen alkaa. Kuva 6 havainnollistaa lasisiirtymälämpötilaa ja amorfista aluetta. (22)



Kuva 6. Lasisiirtymälämpötila (24).

Ympäröivän ilman kosteus vaikuttaa voimakkaasti sokereihin niiden hydrofiilisen luonteen vuoksi. Amorfisten sokerien fysikaaliskemialliset ominaisuudet muuttuvat suuresti, koska sokerit absorboivat vettä rakenteeseensa. Amorfiset sokerit ovat metastabiileja ja niille on ominaista herkästi palautua stabiilimpaan kiteiseen muotoon. Kiteytyminen estää sokerien ja epävakaiden molekyylien välisen vuorovaikutuksen, täten sokerien tarjoama suojele estyy (15). (22)

Saman aineen molekyyilleillä on erilaisia fysikaalisia sekä kemiallisia ominaisuuksia eri kiinteän aineen muodoissa. Kiteisen materiaalin eri muodot sekä amorfisen materiaalin eri tilat voivat muuttaa farmaseuttisen materiaalin tehokkuutta, stabiilisuutta sekä prosessoitavuutta. Epäjärjestysrakenteen ominai-

suuksien sekä käyttäytymisen ymmärrys ja kontrollointi mahdollistaa stabiilien amorfisten farmaseuttisten systeemien valmistamisen sekä takaa niiden laadun ja turvallisuuden. (25)

Amorfisella tilalla on suuri vaikutus farmaseuttisen tuotteen mahdollisiin aktiivisiin aineisiin tai apuaineisiin. Suoja-aineet estävät molekyylien liikettä ja täten edistävät amorfisen faasin muodostumista (15). (25)

Valittaessa apuainetta amorfisuuden luomiseksi on tärkeää, ettei apuaine reagoi aktiivisten proteiinien kanssa. Hyvän amorfisen apuaineen pitää pystyä muodostamaan supersaturoituneita liuoksia helposti kiteytymisen sijaan, kun liukoisuusraja on saavutettu. Useimmat apuaineet alentavat lopullisen tuotteen  $T_g$  arvoa. (8)

Sokerit, jotka muodostavat hydraattikiteitä biosuojeluaineesta kuivatuissa systeemeissä, tarvitsevat paljon vettä kiteiden muodostamiseen. Tämä efekti on ainoastaan hetkellinen ja oletettavasti lyhempi, kuin oletettu farmaseuttisen aineen säilyvyysaika. Kiteytyminen tapahtuu nopeasti, jos tähän on tarpeeksi vettä läsnä. (15)

Veden vapautuminen kiteytyneestä faasista aiheuttaa jäljellejäävän amorfisen osan  $T_g$  arvon laskun. On tutkittu, että sokerin kiteytyminen hydraattimuotoon poistaa vettä amorfisesta faasista ja täten voi tarjota osittaista kuivumista jäljellejäävään amorfiseen osaan. Kuivuminen nostaa  $T_g$ :tä ja parantaa jäljelle jäävän amorfisen osan stabiilisuutta. (15)

Amorfisten hiilihydraattiyhdisteiden kiinnostus kuivatuissa systeemeissä on kasvanut niiden stabilointi- ja prosessoitavuusominaisuuksien ansiosta. Sokerien yleinen piirre on niiden haluttomuus kiteytyä kuivattaessa niitä haihduttamalla. Käytettäessä hiilihydraatteja stabilointiaineena niiden kiteytyminen  $T_g$  lämpötilan yläpuolella johtaa yleensä nopeaan biomolekyylien inaktivoitumiseen. (24)

## 4.2 Aktiivisuus ja stabiilisuus

Kuivauksen aikana proteiineihin kohdistuu paljon rasituksia, jolloin proteiinit helposti denaturoituvat. Lämpötila ja kosteus vaikuttavat eniten vasta-aineiden hajoamiseen ja kuivakaivojen stabiilisuuteen (3). Lasimaisen olomuodon on havaittu estävän proteiinien liikkeitä ja näin edistävän proteiinien aktiivisuutta sekä stabiilisuutta. (5)

Sokerit toimivat suojaajina vuorovaikuttamalla biologisen materiaalin kanssa ja stabiloimalla näitä kuivauksen aikana (15). Kuivauksen aikana sokerit voivat muodostaa proteiinin pinnalla oleviin polaarisiin ryhmiin vety-sidoksia. Toimimalla tällä tavalla vedensijaisena, sokerit voivat parantaa proteiinin stabiilisuutta kuivauksen ja säilytyksen aikana. Tätä tapahtumaa kutsutaan vedenkorvausmekanismiksi. Kineettiset reaktiot ovat usein syynä varastoinnin aikana tapahtuvaan rakenteelliseen huononemiseen (15). (5)

Trehaloosin ei-pelkistävä ominaisuus on tärkeässä asemassa biomolekyylien stabiloinnissa, koska tämä estää Maillardin reaktiota (15). Maillardin reaktiossa proteiinit yleensä denaturoituvat, koska sokerin aldehydiryhmä reagoi proteiinin aminohapporyhmien kanssa. Ei-pelkistävillä sokereilla tätä reaktiota ei tapahdu ennen kuin ne ovat itse hydrolysoituneet. (5)

Proteiinien denaturoitumisen aiheuttaa useimmiten kuumuus, pH, suolat tai pinnalla tapahtuvat ilmiöt. Lasifaasilla on korkea viskositeetti, joka rajoittaa proteiinien liikkuvuutta ja täten estää proteiinien denaturoitumista (16). Denaturoituminen yleensä tarkoittaa biologisen aktiivisuuden menettämistä sekä huomattavia muutoksia fysikaalisissa tai toiminnallisissa ominaisuuksissa. Suurimmalla osalla proteiineista denaturoituminen ja koaguloituminen tapahtuvat lämpötila-alueella 55–75 °C. (20)

Farmaseuttinen aktiivinen materiaali tulee kuivata amorfiseen tilaan siten, että tuote on fysikaalisesti vakaa ja kemiallisesti stabiili. Farmaseuttinen aktiivaine heikentyy, jos säilytysolosuhteet ylittävät lämpötila-arvon  $T_g$ . Tällöin tuote fysikaalisesti romahtaa ja yksittäiset komponentit kiteytyvät. (8)

Aktiivisuuden laskua on huomattu tapahtuvan myös  $T_g$  lämpötilan alapuolella. On ehdotettu, että parempi raja stabiilisuudelle olisi  $T_0$  (*engl.* zero mobility temperature), joka sijaitsee  $T_g$  arvon alapuolella. Lämpötila  $T_g$  rajan yläpuolella kaikki kemialliset reaktiot voivat edetä. Lämpötilojen  $T_0$  ja  $T_g$  rajojen välissä muutamat kemialliset reaktiot tapahtuvat, kuten hapettuminen ja hydrolyysi. Lämpötilan  $T_0$  alapuolella kaikki reaktiot pysähtyvät. Materiaalin entropia saavuttaa nollan lämpötilassa  $T_0$ , tällöin molekyylien liike tosiasiaassa loppuu. Trehaloosin  $T_0$  lämpötila on mitattu olevan noin +44 °C. (8)

## 5 LOPPUKUIVAUS JA SIGNAALIN MÄÄRITYS

Karakterisoitavat kupit valmistetaan kuten normaalisti aina leima-annosteluun asti. Loppukuivaus korvataan olosuhteilla ja menetelmillä, joilla on ajateltu olevan mahdollisuuksia loppukuivaustavan korvaajaksi.

### 5.1 Kuivausolosuhteet

Loppukuivauksessa käytetään kahta eri menetelmää; suoraa puhalluskuivausta sekä kuivauskaappia. Eri yhdistelmillä luotuja olosuhteita valmistetaan yhteensä 19 kappaletta, joista kuusi on puhallusmenetelmällä valmistettuja ja kolmetoista kuivauskaappimenetelmällä valmistettuja.

#### 5.1.1 Puhallusolosuhteet

Puhalluslaite puhaltaa ilmaa jokaiseen kaivoon pillin avulla. Puhalluskuivaus suoritettiin tilassa, jossa suhteellinen kosteus on säädetty alueelle 0–20 %. Tarkkaa arvoa ei tallennettu. Taulukossa 1 on esitetty puhallusolosuhteissa käytetyt parametrit.

Taulukko 1. Puhallusolosuhteet.

Aika (min)	Lämpötila (°C)
30	+35
20	+45
30	+45
10	+60
20	+60
30	+60

### 5.1.2 Kaappiolosuhteet

Kuivauskaappien parametreja muutettiin lämpötilan, ajan sekä suhteellisen kosteuden osalta. Taulukossa 2 on esitetty kuivauskaappiolosuhteiden parametrit. Yhteensä viisi eri lämpötila–kosteus -suhdetta, joissa ajat vaihtelevat yhdestä vuorokaudesta viiteen vuorokauteen. Lämpötila RT (*engl.* room temperature) arvo on säädetty alueelle 20–24 °C. Alla esitettävät kuivauksessa käytetyt arvot ovat säätöarvoja. Toteutuneet arvot esitetään myöhemmin.

Taulukko 2. Kaappiolosuhteet.

Aika (d)	Lämpötila (°C)	Suhteellinen kosteus (%)
3	RT	-
5	RT	-
1	+22	0
3	+22	0
5	+22	0
1	+32	0
2	+32	0
3	+32	0
5	+32	0
1	+35	5
2	+35	5
3	+35	5
1	+40	5

Kuivauskaappeihin asetettiin tallentavat mittarit kuivauksen ajaksi, jotka keräävät lämpötila- sekä kosteusarvoja. Mittareista saadun datan avulla voidaan varmistaa, että olosuhteet kuivauskaapeissa ovat olleet koko kuivauksen ajan niille asetetuissa arvoissa.

Taulukko 3. Kuivauskaappien toteutuneet lämpötila- ja kosteusarvot.

Olosuhde	Lämpötila (°C)	Suhteellinen kosteus (%)
RT / - %RH	+22	13
+22 °C / 0 %RH	+22	2
+32 °C / 0 %RH	+32	1
+35 °C / 5 %RH	+35	6
+40 °C / 5 %RH	+39	6

Taulukossa 3 on tallentavista mittareista saadusta datasta lasketut keskiarvot lämpötiloille ja kosteuksille. Toteutuneet lämpötila- ja kosteusarvot ovat lähellä kuivaukselle asetettuja arvoja.

## 5.2 Rasitus

Karakterisoitavat kasetit rasitetaan olosuhdehuoneessa, jonka lämpötilaksi on asetettu +32 °C ja suhteelliseksi kosteudeksi 80 %. Jokaisesta yhdeksästätoista olosuhteesta valmistetaan neljä aikapistettä: 0, 7, 14 ja 21 vuorokautta rasituksessa olosuhdehuoneessa. Rasituksenkeston vuorokausimäärää on merkitty tuloksissa d-kirjaimella.

Olosuhdehuoneessa olleet kasetit syötetään AQT -laitteeseen ja ajetaan heti rasitusajan loputtua. Jokaisen olosuhteen aloituspäivän, eli aikapisteen 0 d kasetit varastoidaan valmistuksen ja ajon välisen ajan kylmätilassa, jonka lämpötilaksi on säädetty +6 °C. Kylmätilan kosteutta ei ollut tarvetta kontrolloida, koska kasetit on pakattu ilmatiiviisiin pusseihin.

### 5.3 Signaalin määrittäminen

Yhden olosuhteen kaikki aikapisteiden kasetit ajetaan samalla AQT -laitteella. Näytteenä kaikissa aikapisteissä käytetään samaa antigeenipohjaista näytettä, jonka laskennallinen pitoisuus tiedetään. Jokaisesta aikapisteestä ajetaan näyttettä kaksi kasettia, eli 32 rinnakkaista. Lisäksi ajetaan alussa 0 päivän pisteestä sekä lopussa 21 päivän pisteestä yksi kasetti eli, 16 rinnakkaista näytetaustaa. Näytetausta ajetaan AQT AS -puskurilla, joka on AQT -laitteen käyttämä oma puskur. Jokaisesta olosuhteesta ajetaan yhteensä 10 kasettia. Taulukossa 4 on kasetit, aikapisteet ja rinnakkaisten määrät eriteltynä.

Taulukko 4. Ajojärjestys.

Kasetti	Näyte	Rinnakkaiset
Pesu	NaOCl	-
Pesu	BSA-TSA	-
Blank	AQT AS	5
0 d	AQT AS	16
0 d	Antigeeninäyte	32
7 d	Antigeeninäyte	32
14 d	Antigeeninäyte	32
21 d	Antigeeninäyte	32
Pesu	NaOCl	-
21 d	AQT AS	16

Ennen ajojen aloitusta sekä ajojen lopussa ennen aikapisteiden 21 d taustaa pestään näytteen kanssa kosketuksissa olleet osat laitteen omalla pesuohjelmalla, jotta edellisten ajojen mahdolliset jäämät eivät häiritse signaalia. Pesut suoritetaan NaOCl -liuoksella (hypokloriitti) ja BSA-TSA -liuoksella (*engl.* Bovine Serum Albumin - Tris Saline Azide). Lisäksi viidellä rinnakkaisella laitetaustaa (*engl.* blank) varmistetaan, että signaali on tarpeeksi alhaalla eikä häiritse tulevia määrittämiä.



## 6 TULOKSET

Laskettuja keskiarvoja ei voi suoraan vertailla toisiinsa, koska tulokset on saatu käyttäen useampaa AQT -laitetta. Tässä karakterisoinnissa käytettiin laitteen raakasignaalia ja se vaihtelee laitekohtaisesti, eivätkä tulokset tämän takia laitteiden välillä ole vertailukelpoisia toisiinsa nähden. Laitteen antama raakasignaali on mitattu valon määrä sekunnissa (*engl.* CPS, counts per second). Jokaiselle olosuhteelle laskettiin prosentuaaliset muutokset nollapisteeseen verrattuna, jotta olosuhteiden välinen vertailu olisi mahdollista.

Tulosten käsittelyssä ja analysoinnissa on käytetty seuraavia tunnuslukuja:

- Keskiarvo: kuvaa aineiston keskikohtaa,  $KA = \frac{(x_1 + \dots + x_n)}{n}$
- Prosentti: ilmaisee suhteellisen osuuden, muutos  $\% = \frac{21 \text{ d} - 0 \text{ d}}{0 \text{ d}} * 100$
- Keskihajonta: aineiston vaihteluvälin mitta,  $s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x)^2}{n-1}}$
- Variaatiokerroin:  $C\% = \frac{s}{KA} * 100 \%$
- Kulmakerroin: ilmaisee kuvaajan kaltevuutta,  $= \frac{y}{x}$
- Selitysaste:  $R^2$ , kuvaa muuttujien välistä riippuvuutta.

### 6.1 Näytetaustatulokset

#### 6.1.1 Puhallusolosuhteet

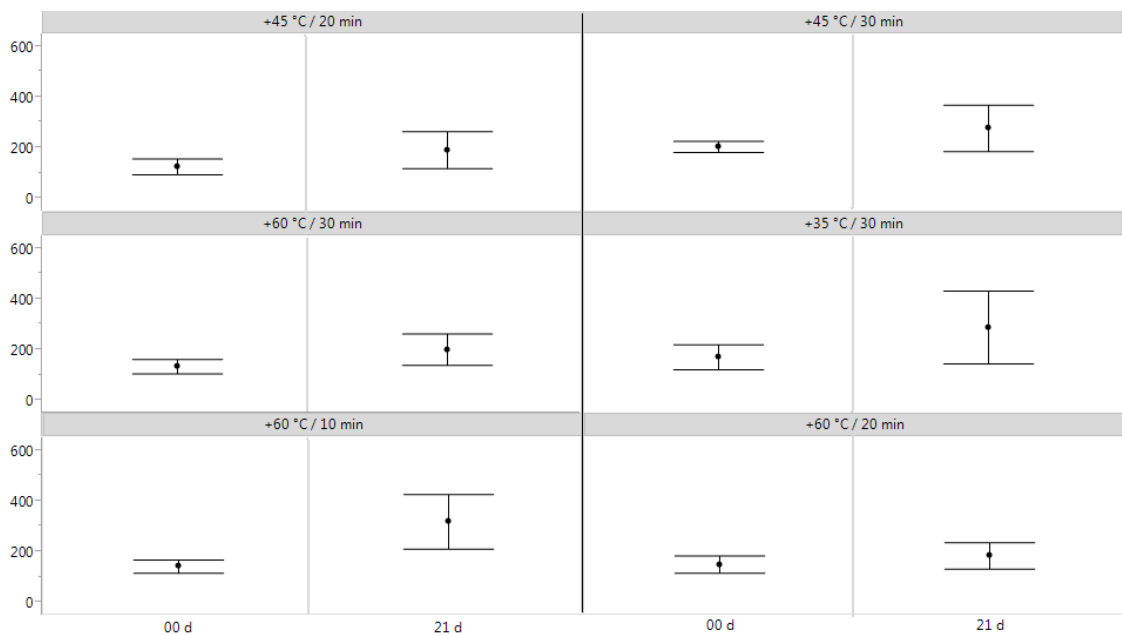
Taulukossa 5 on aikapisteiden 0 d ja 21 d puhallusolosuhteiden taustatulosten keskiarvot sekä muutos prosentuaalisesti lähtötilanteeseen nähden. Taulukosta havaitaan, että muutosta on tapahtunut huomattavasti: 24 prosentista 128 prosenttiin. Muutos ja sen suuruus on odotettua, koska muutos erottuu matalissa

arvoissa selkeämmin. Taulukon perusteella olosuhteen A, arvo on muuttunut selvästi muita olosuhteita enemmän.

Taulukko 5. Puhallusolosuhteiden taustatulosten keskiarvot sekä 21 d prosentuaalinen muutos.

Olosuhde	Keskiarvo 0 d	Keskiarvo 21 d	Muutos % 21 d
+35 °C / 30 min	172	289	68
+45 °C / 20 min <sup>B</sup>	126	191	52
+45 °C / 30 min	204	277	36
+60 °C / 10 min <sup>A</sup>	138	315	128
+60 °C / 20 min <sup>C</sup>	146	180	24
+60 °C / 30 min <sup>D</sup>	134	201	50

Kuva 7 havainnollistaa edellisen taulukon tuloksien suuruusluokkaa ja hajontaa sekä muutoksia aikapisteiden välillä. Kuvan perusteella kolmen olosuhteen B, C ja D 21 d muutos on pysynyt todella alhaisena ja tasaisena. Muilla olosuhteilla hajonta on aiheutunut useammasta hieman korkeammasta arvosta. Näiden muutaman korkeamman arvon syytä ei tiedetä.



Kuva 7. Puhallusolosuhteiden taustatulosten 0 d ja 21 d keskiarvot.

## 6.1.2 Kuivauskaappiolosuhteet

Taulukossa 6 on aikapisteiden 0 d ja 21 d kaappiolosuhteiden taustatulosten keskiarvot sekä muutos prosentuaalisesti lähtötilanteeseen nähden. Kaappiolosuhteissa prosentuaalinen muutos on huomattavasti pienempää kuin puhallusolosuhteissa.

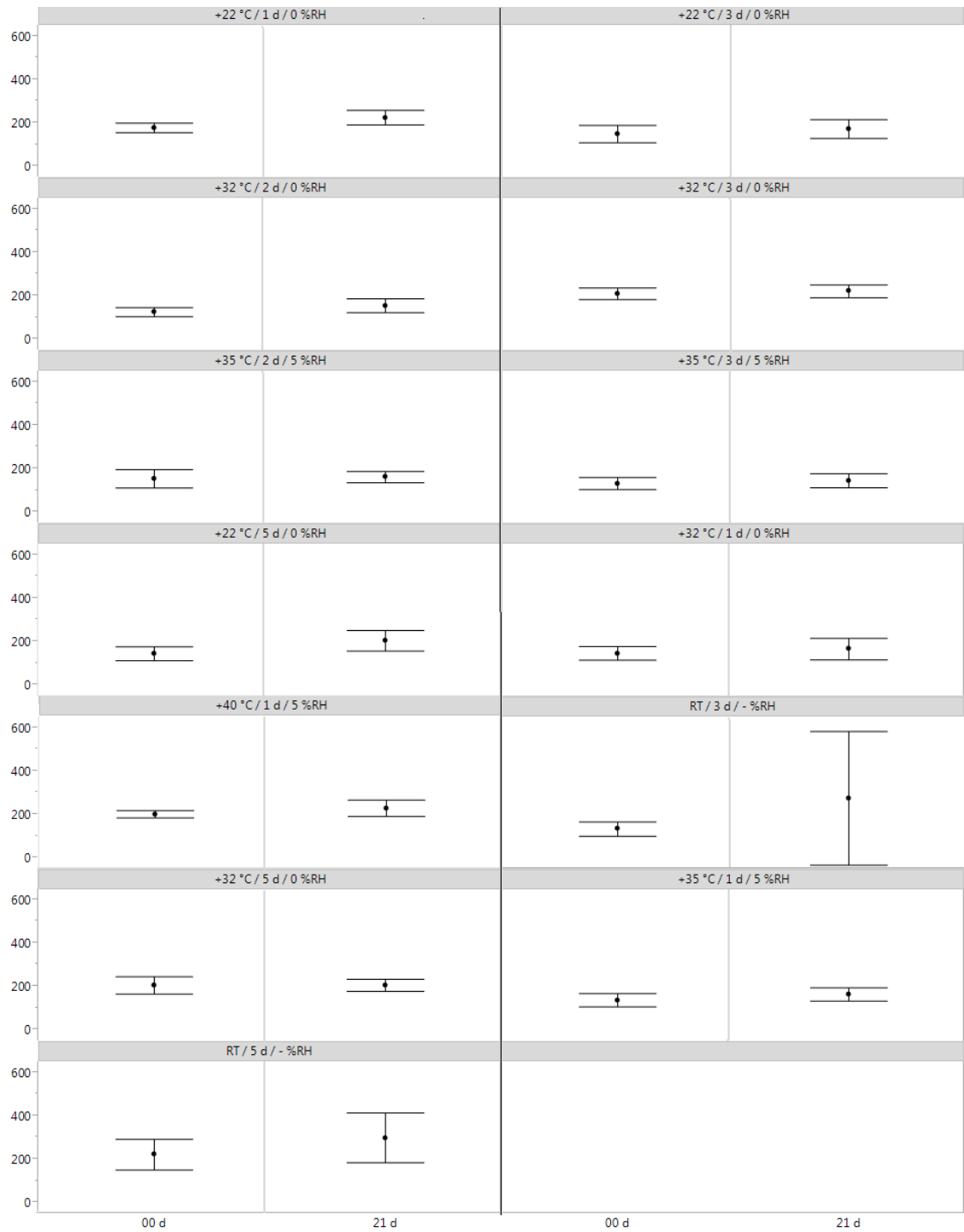
Taulukko 6. Kaappiolosuhteiden taustatulosten keskiarvot sekä 21 d prosentuaalinen muutos.

Olosuhde	Keskiarvo 0 d	Keskiarvo 21 d	Muutos % 21 d
RT / 3 d / - %RH <sup>E</sup>	133	275	107
RT / 5 d / - %RH <sup>F</sup>	222	299	35
+22 °C / 1 d / 0 %RH	178	225	26
+22 °C / 3 d / 0 %RH	150	172	15
+22 °C / 5 d / 0 %RH	145	204	41
+32 °C / 1 d / 0 %RH	146	166	13
+32 °C / 2 d / 0 %RH	126	155	23
+32 °C / 3 d / 0 %RH	210	221	5
+32 °C / 5 d / 0 %RH	210	211	1
+35 °C / 1 d / 5 %RH	141	168	19
+35 °C / 2 d / 5 %RH	154	162	5
+35 °C / 3 d / 5 %RH	132	145	10
+40 °C / 1 d / 5 %RH	197	225	14

Olosuhteen E prosentuaalinen muutos on suurempaa, se voi johtua kontaminaatiosta. Hajontaan on vaikuttanut kaksi tulosta, jotka ovat selvästi muita tuloksia korkeampia (1030 ja 1084). Tulokset ovat samasta prosessiekikkopaikasta, joten tämä on voinut olla kontaminoitunut. Jos nämä kaksi tulosta poistettaisiin, olisi 21 d keskiarvo 163 ja muutos % 21d olisi 23 %.

Kuva 8 havainnollistaa edellisen taulukon tuloksien suuruusluokkaa ja hajontaa sekä muutoksia aikapisteiden välillä. Olosuhteen F 21 d hajonta on selkeästi suurempi kuin muiden. Hajonta on aiheutunut useammasta yksittäisestä hieman

korkeammasta arvosta. Näiden muutaman tuloksen korkeamman arvon syytä ei tiedetä.



Kuva 8. Kaappiolosuhteiden taustatulosten 0 d ja 21 d keskiarvot.

## 6.2 Näytetulokset

### 6.2.1 Puhallusolosuhteet

Taulukossa 7 on puhallusolosuhteiden näytetulosten keskiarvot jokaisesta aikapisteestä. Taulukosta havaitaan olosuhteiden signaalitason lasku rasiituksen edetessä. Signaalin laskun määrä vaihtelee paljon: 18000–33000.

Taulukko 7. Puhallusolosuhteiden näytetulosten keskiarvot.

Olosuhde	Keskiarvo 0 d	Keskiarvo 07 d	Keskiarvo 14 d	Keskiarvo 21 d
+35 °C / 30 min	138341	127897	119639	111630
+45 °C / 20 min	111040	102957	93980	93223
+45 °C / 30 min	120507	112977	103782	100647
+60 °C / 10 min	139199	126477	115880	106350
+60 °C / 20 min	138661	128686	119341	111211
+60 °C / 30 min	111430	98688	92216	85194

Taulukossa 8 on puhallusolosuhteiden näytetulosten jokaisen aikapisteen keskiarvoista laskettu muutos alkupisteeseen nähden. Muutokset ovat hyvin tasaisia jokaisessa aikapisteessä, vaikka muutosta on tapahtunut paljon.

Taulukko 8. Puhallusolosuhteiden näytetulosten prosentuaaliset muutokset.

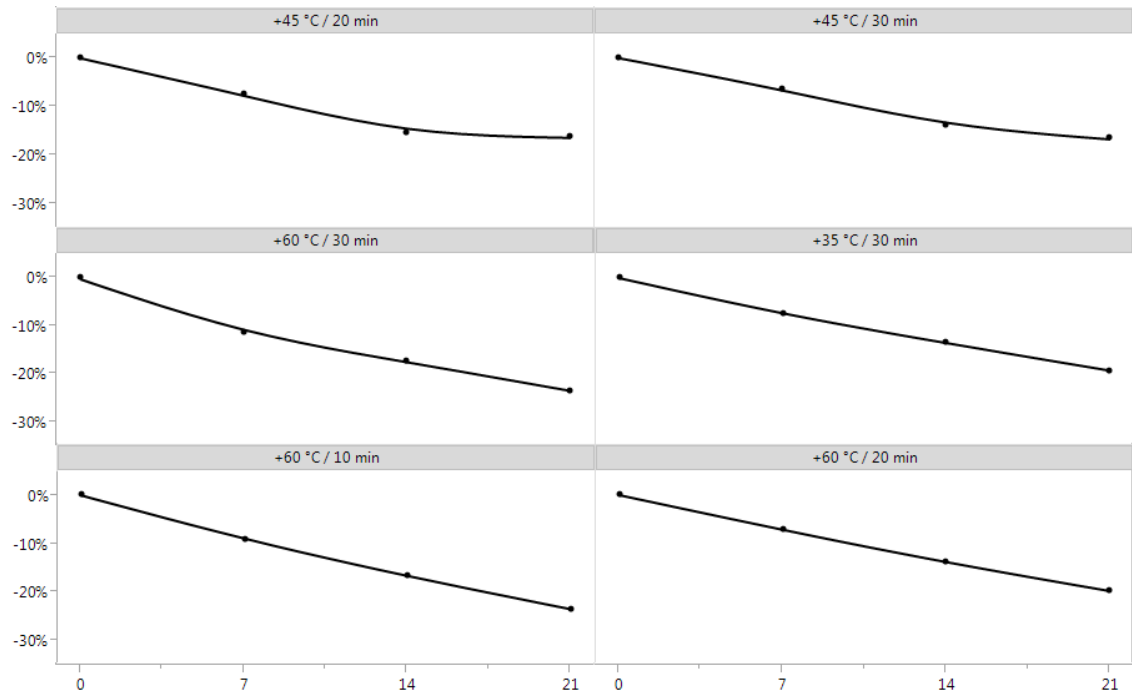
Olosuhde	Muutos % 7 d	Muutos % 14 d	Muutos % 21 d
+35 °C / 30 min	-8	-14	-19
+45 °C / 20 min <sup>G</sup>	-7	-15	-16
+45 °C / 30 min <sup>H</sup>	-6	-14	-16
+60 °C / 10 min	-9	-17	-24
+60 °C / 20 min	-7	-14	-20
+60 °C / 30 min	-11	-17	-24

Taulukossa 9 on nollapisteen keskiarvot ja 10 % maksimisignaalin laskuraja sekä kasetin käyttöikä. Keskimääräiseen 14 vuorokauden käyttöikään verrattuna mikään puhallusolosuhde ei saavuta riittävää käyttöikää.

Taulukko 9. Puhallusolosuhteiden maksimi muutos ja käyttöikä.

Olosuhde	Keskiarvo 0 d	Muutos raja	Käyttöikä
+35 °C / 30 min	138341	124507	9
+45 °C / 20 min <sup>G</sup>	111040	99936	9
+45 °C / 30 min <sup>H</sup>	120507	108456	10
+60 °C / 10 min	139199	125279	7
+60 °C / 20 min	138661	124795	9
+60 °C / 30 min	111430	100287	6

Kuvassa 9 on puhallusolosuhteiden näytetulosten keskiarvo jokaisesta aikapistestä sekä niiden kautta piirretyt kuvaajat. Olosuhteiden G ja H kuvaajista näkyy, että signaalilasku alkaa kaartua aikapisteen 14 d jälkeen, eikä se ole niin voimakasta kuin alussa. Muiden olosuhteiden osalta muutos on suoraviivaisempaa, mutta liian suurta.



Kuva 9. Puhallusolosuhteiden näytetulosten aikapisteiden kautta piirretyt kuvaajat.

Taulukossa 10 on puhallusolosuhteiden näytetulosten jokaisen aikapisteen keskiarvon ja keskihajonnan perusteella laskettu CV -prosentti. Tulokset ovat tasaiset jokaisella olosuhteella. CV:t kasvavat lievästi rasiuksen edetessä. Hajonta on kaikilla olosuhteilla kaikissa pisteissä alle 5 %, eli riittävän pientä.

Taulukko 10. Puhallusolosuhteiden näytetulosten CV:t.

Olosuhde	CV % 0 d	CV % 7 d	CV % 14 d	CV % 21 d
+35 °C / 30 min	1,6	2,2	2,3	2,1
+45 °C / 20 min	2,2	2,2	2,6	2,2
+45 °C / 30 min	1,4	1,8	2,6	2,3
+60 °C / 10 min	2,3	2,9	3,8	2,4
+60 °C / 20 min	1,8	2,0	1,8	2,2
+60 °C / 30 min	1,6	2,4	2,4	2,6

Taulukossa 11 puhallusolosuhteet on järjestetty parhaimman kulmakertoimen mukaan järjestykseen. Korrelaatiokertoimen neliö, selitysaste ( $R^2$ ), kuvaa muuttujien välistä riippuvuutta, eli kuinka hyvin sovitettu kuvaaja selittää havaittuja mittapisteitä.

Taulukko 11. Puhallusolosuhteiden näytetulosten kulmakertoimet sekä selitysasteet.

Olosuhde	Kulmakerroin	$R^2$
+45 °C / 20 min <sup>G</sup>	-892	0,836
+45 °C / 30 min <sup>H</sup>	-983	0,899
+60 °C / 30 min	-1217	0,927
+35 °C / 30 min	-1263	0,936
+60 °C / 20 min	-1310	0,948
+60 °C / 10 min	-1559	0,922

Parhaimmat kulmakertoimet ovat olosuhteilla G ja H, koska näillä signaalilaskua tapahtuu vähiten. Olosuhteilla G ja H on huonoimmat  $R^2$  -arvot, koska kuvaajat kaartuvat aikapisteen 14 d jälkeen.

### 6.2.2 Kaappiolosuhteet

Taulukossa 12 on kaappiolosuhteiden näytetulosten keskiarvot jokaisesta aikapistestä. Taulukosta havaitaan olosuhteiden signaalitason lasku rasituksen edetessä. Signaalilaskun määrä vaihtelee paljon, vaihteluväli on noin 13000–40000.



Taulukko 12. Kaappiolosuhteiden näytetulosten keskiarvot.

Olosuhde	Keskiarvo 0 d	Keskiarvo 07 d	Keskiarvo 14 d	Keskiarvo 21 d
RT / 3 d / - %RH	108781	95764	88234	83906
RT / 5 d / - %RH	117888	102613	90326	77611
+22 °C / 1 d / 0 %RH	121546	110018	103802	99227
+22 °C / 3 d / 0 %RH	141349	128716	124835	117052
+22 °C / 5 d / 0 %RH	138794	130015	123081	119437
+32 °C / 1 d / 0 %RH	111100	98566	95048	89638
+32 °C / 2 d / 0 %RH	111765	105675	98562	93098
+32 °C / 3 d / 0 %RH	122670	118053	113537	110132
+32 °C / 5 d / 0 %RH	122886	113101	111535	107230
+35 °C / 1 d / 5 %RH	138199	128973	118643	117634
+35 °C / 2 d / 5 %RH	139516	129749	125998	119706
+35 °C / 3 d / 5 %RH	109888	103482	100638	97301
+40 °C / 1 d / 5 %RH	123363	117281	110685	105609

Taulukossa 13 on kaappiolosuhteiden näytetulosten jokaisen aikapisteen keskiarvoista laskettu muutos nolllapisteeseen nähden.

Taulukko 13. Kaappiolosuhteiden näytetulosten prosentuaaliset muutokset.

Olosuhde	Muutos % 7 d	Muutos % 14 d	Muutos % 21 d
RT / 3 d / - %RH <sup>I</sup>	-12	-19	-23
RT / 5 d / - %RH <sup>J</sup>	-13	-23	-34
+22 °C / 1 d / 0 %RH	-9	-15	-18
+22 °C / 3 d / 0 %RH	-9	-12	-17
+22 °C / 5 d / 0 %RH <sup>Q</sup>	-6	-11	-14
+32 °C / 1 d / 0 %RH	-11	-14	-19
+32 °C / 2 d / 0 %RH	-5	-12	-17
+32 °C / 3 d / 0 %RH <sup>K</sup>	-4	-7	-10
+32 °C / 5 d / 0 %RH <sup>L</sup>	-8	-9	-13
+35 °C / 1 d / 5 %RH <sup>M</sup>	-7	-14	-15
+35 °C / 2 d / 5 %RH <sup>N</sup>	-7	-10	-14
+35 °C / 3 d / 5 %RH <sup>O</sup>	-6	-8	-11
+40 °C / 1 d / 5 %RH <sup>P</sup>	-5	-10	-14

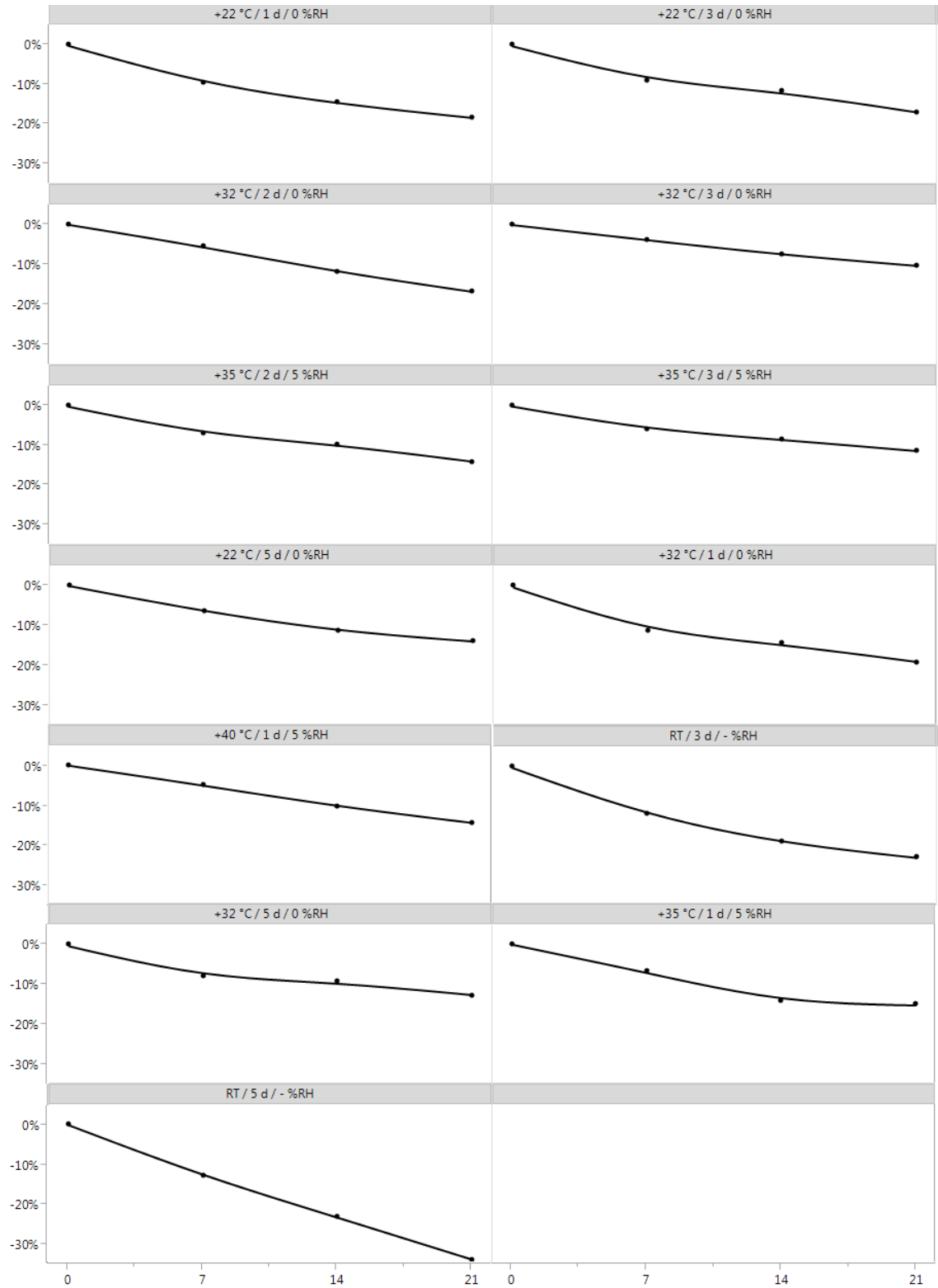
Olosuhteet I ja J ovat samalla tasolla puhallusolosuhteiden kanssa. Parhaimmat olosuhteet ovat K–Q, koska näillä signaalinlaskua on tapahtunut vähiten.

Taulukossa 14 on nollapisteen keskiarvot, 10 % maksimisignaali laskuraja sekä kasetin käyttöikä. Kolmella olosuhteella K, L, O käyttöikä on riittävällä 14 vuorokauden tasolla. Taulukosta 13 ja 14 havaitaan lisäksi se, kuinka lämpötiloilla +22, +32 ja +35 °C kuivauksen kesto parantaa tuloksia hidastamalla signaalinlaskua ja lisäämällä käyttöikää.

Taulukko 14. Kaappiolosuhteiden maksimi muutos sekä käyttöikä.

Olosuhde	Keskiarvo 0 d	Muutos 10 %	Käyttöikä
RT / 3 d / - %RH	108781	97903	6
RT / 5 d / - %RH	117888	106099	5
+22 °C / 1 d / 0 %RH	121546	109391	7
+22 °C / 3 d / 0 %RH	141349	127214	9
+22 °C / 5 d / 0 %RH	138794	124915	12
+32 °C / 1 d / 0 %RH	111100	99990	6
+32 °C / 2 d / 0 %RH	111765	100589	12
+32 °C / 3 d / 0 %RH <sup>K</sup>	122670	110403	19
+32 °C / 5 d / 0 %RH <sup>L</sup>	122886	110597	15
+35 °C / 1 d / 5 %RH	138199	124379	10
+35 °C / 2 d / 5 %RH	139516	125564	13
+35 °C / 3 d / 5 %RH <sup>O</sup>	109888	98899	17
+40 °C / 1 d / 5 %RH	123363	111027	13

Kuvassa 10 on kaappiolosuhteiden näytetulosten keskiarvo jokaisesta aikapistestä sekä niiden kautta piirretyt kuvaajat. Kuvaajista havaitaan, että mitä suurempi kuvaaja sitä enemmän signaalinlaskua tapahtuu.



Kuva 10. Kaappiolosuhteiden näytetulosten aikapisteiden kautta piirretyt kuvaajat.

Taulukossa 15 on kaappiolosuhteiden näytetulosten jokaisen aikapisteen keskiarvon ja keskihajonnan perusteella laskettu CV -prosentti. Kuivauskaappiolosuhteiden tulokset ovat tasaiset jokaisella olosuhteella. CV:t kasvavat lievästi rasiuksen edetessä. Hajonta on kaikilla olosuhteilla kaikissa aikapisteissä alle 5 %, eli riittävän pientä.

Taulukko 15. Kaappiolosuhteiden näytetulosten CV:t.

Olosuhde	CV % 0 d	CV % 7 d	CV % 14 d	CV % 21 d
RT / 3 d / - %RH	2,0	2,2	2,5	3,9
RT / 5 d / - %RH	1,9	2,4	1,8	2,8
+22 °C / 1 d / 0 %RH	1,6	2,2	1,6	2,4
+22 °C / 3 d / 0 %RH	2,0	2,5	1,7	2,1
+22 °C / 5 d / 0 %RH	1,7	2,2	2,6	2,8
+32 °C / 1 d / 0 %RH	1,8	3,2	2,7	2,4
+32 °C / 2 d / 0 %RH	2,2	2,0	2,6	2,1
+32 °C / 3 d / 0 %RH	1,5	1,8	1,4	2,0
+32 °C / 5 d / 0 %RH	1,3	1,8	1,9	1,9
+35 °C / 1 d / 5 %RH	1,6	2,2	1,9	2,9
+35 °C / 2 d / 5 %RH	1,7	3,1	3,0	3,0
+35 °C / 3 d / 5 %RH	1,8	2,0	3,1	2,1
+40 °C / 1 d / 5 %RH	1,4	1,4	1,6	2,7

Taulukossa 16 kaappiolosuhteet on järjestetty parhaimman kulmakertoimen mukaan järjestykseen. Korrelaatiokertoimen neliö, selitysaste ( $R^2$ ), kuvaa muuttujien välistä riippuvuutta, eli kuinka hyvin sovitettu kuvaaja selittää havaittuja mittapisteitä.

Taulukko 16. Kaappiolosuhteiden näytetulosten kulmakertoimet sekä selitysas-  
teet.

Olosuhde	Kulmakerroin	R <sup>2</sup>
+35 °C / 3 d / 5 %RH <sup>O</sup>	-580	0,773
+32 °C / 3 d / 0 %RH <sup>K</sup>	-603	0,853
+32 °C / 5 d / 0 %RH <sup>L</sup>	-693	0,807
+40 °C / 1 d / 5 %RH	-855	0,912
+32 °C / 2 d / 0 %RH	-902	0,906
+35 °C / 2 d / 5 %RH	-903	0,789
+22 °C / 5 d / 0 %RH	-929	0,839
+32 °C / 1 d / 0 %RH	-970	0,843
+35 °C / 1 d / 5 %RH	-1029	0,835
+22 °C / 1 d / 0 %RH	-1045	0,898
+22 °C / 3 d / 0 %RH	-1097	0,874
RT / 3 d / - %RH	-1174	0,887
RT / 5 d / - %RH	-1902	0,978

Kulmakertoimen perusteella parhaimmat kolme olosuhdetta ovat O, K ja L. Kaappiolosuhteilla samoin kuin puhallusolosuhteilla yhteys signaalinlaskulla ja kuvaajan kaarevuudella: mitä parempi kulmakerroin sitä huonompi korrelaatio-  
kertoimen neliönarvo. Kuvasta 10 havaitaan, että suurimmalla osalla olosuh-  
teista kuvaajassa on kaarevuutta.

## 7 POHDINTA JA PÄÄTELMÄT

Työn tarkoituksena oli selvittää yrityksen valmistamalle immunodiagnostiselle tuotteelle mahdollisia korvaavia loppukuivausolosuhteita. Lyhemmän loppukuivauksen keston ansiosta prosessin läpivientiaika saataisiin lyhenemään. Lisäksi se vaikuttaisi positiivisesti tuotannonsuunnittelun joustavuuteen, kuivaus-tilojen tarpeeseen sekä muihin kuivausresursseihin ja -kustannuksiin.

Tulosten avulla saatiin pääteltyä kuivauksessa vaadittavien parametrien ylä- ja alarajat. Tuloksista voidaan karkeasti todeta, mitkä testatuista parametreista toimivat, mitkä ovat stabiilisuuden ja säilyvyyden kannalta liikaa tai liian vähän. Tuloksia analysoimalla voidaan todeta, mitkä olosuhteet eivät poista tuotteesta kosteutta riittävästi sekä mitkä lämpötilat ja kuivausajat ovat kupin sisältämille biomolekyyleille vahingollisia.

Puhallusolosuhteet eivät testatuilla parametreilla onnistuneet stabiloimaan tuotetta. Lämpötila + 60 °C vaikuttaisi olevan testatulle analytyille liikaa, biomolekyylit mahdollisesti vaurioituvat tässä lämpötilassa. Puhallusolosuhteista lupaavimmat olivat lämpötilassa + 45 °C valmistetut kupit. Pidempi puhallusaika tai matalampi ympäröivän tilan kosteus käsittelyn aikana luultavasti parantaisivat tuloksia huomattavasti.

Kuivauskaappiolosuhteista selvisi, että kontrolloimaton suhteellinen kosteus ei toimi, koska kupista ei poistu riittävästi kosteutta. Lämpötila + 22 °C vaatii pitkän käsittelyajan, jotta kupin sisältö kuivuu riittävästi. Lämpötiloista +22, +32 ja +35 °C havaitaan, että rasituksenkesto paranee kuivausajan pidentyessä.

Kuivauskaappituloksista havaitaan, että korkeampi lämpötila mahdollistaa lyhyemmän käsittelyajan. Lisäksi korkea lämpötila ei vaadi ympäröivään tilaan 0 % suhteellista kosteutta. Kosteuden vaikutus 0–5 % alueella näyttäsi olevan lähes merkityksetön.

Rasittamalla kasetteja saatiin selville erilaisten valmistuksen aikaisten parametrien, kuten lämpötilan, kosteuden ja käsittelyajan vaikutus. Samalla määritettiin jokaisen olosuhteen käyttöikä, aika vuorokausina jolloin maksimi 10 % signaalilasku tulee täyteen. Puhallusolosuhteiden käyttöiät olivat liian lyhyitä, 6–10 vuorokautta. Kaappiolosuhteissa käyttöiät vaihtelivat paljon, 5–19 vuorokautta.

Tutkituista olosuhteista kolme kuivauskaappimenetelmällä valmistettua olosuhdetta ylettyi ennalta vaadittuihin rajoihin. Karakterisoinnissa onnistuttiin kartoittamaan vaihtoehdot, jotka eivät missään tapauksessa sovi sekä vaihtoehdot, jotka vaikuttavat lupaavilta, ja vaativat pientä muokkausta ja lisätestausta.

Tulosten avulla voisi sanoa, että loppukäsittelyaikaa on mahdollista saada lyhemään vähintään 40 %. Lisätestauksia kuitenkin vaadittaisiin ennen mahdollista päätöstä siirtää korvaava loppukäsittelyvaihe tuotantoon.

Lisätestauksessa kannattaisi kokeilla kaappikuivausolosuhteita:

- +32 °C / 3–5 d / 5 %RH
- +35 °C / 1–3 d / 0 %RH
- +40 °C / 1–2 d / 0 %RH
- +40 °C / 2 d / 5 %RH

Puhalluskuivauksesta olisi hyvä tutkia olosuhdeyhdistelmät +45 °C / 20–40 min / 0–5 %RH, jos kosteuden tarkka säätö on mahdollista. Puhalluskuivaus mahdollistaisi erittäin lyhyen loppukäsittelyajan.

## LÄHTEET

1. Lehtonen, J. 2009. Leima-annostelun ja kuivauksen vaikutus kuivakaivomäärityksen taustaan. Opinnäytetyö. Laboratorioala. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.
2. Suojanen, J. 2013. Laadunvalvontamenetelmän kehittäminen: BNP –kontrollituotteille AQT90 FLEX järjestelmään. Opinnäytetyö. Laboratoriotekniikka. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu
3. Vahomäki, K. 2008. AQT 90 FLEX –immunoanalysointilaitteen testikasettien stabiilisuus. Opinnäytetyö. Laboratorioala. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.
4. Radiometer. 2015. AQT90 FLEX immunoassay analyzer. Denmark: Radiometer. Viitattu 17.3.2015. Saatavissa <http://www.radiometer.com/en/products/immunoassay/aqt90-flex-analyzer>
5. Ruonamo, R-M. 2008. Kuivakemiareagenssien optimointi erotusvapaaseen immuno-määritystekniikkaan. Opinnäytetyö. Biotekniikan ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.
6. Wiklund, D. 2014. Testikasetin toimintaikkunan määrittäminen. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.
7. Janne Suojanen. DHR Finland Oy Innotrac Diagnostics. 11.3.2015. Henk.koht. tiedonanto.
8. Hatley, R. & Blair, J. 1999. Stabilisation and delivery of labile materials by amorphous carbohydrates and their derivatives. Quadrant Healthcare plc: Cambridge.
9. Yap Sook Fan. Dry chemistry. University of Malaya.
10. Burman, J. 2013. Biosensorien hyödyntäminen biologisissa vuorovaikutustutkimuksissa. Pro Gradu –tutkielma. Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta. Helsinki: Helsingin yliopisto.
11. Innotrac Diagnostics, koulutusmateriaali, Product presentation.
12. Radiometer. 2012. AQT90 FLEX Reference Manual.
13. Testikitti insertti, tuotenumerot: 942-906, 942-936, 942-915, 942-909, 942-930, 942-964, 942-918, 942-903, 942-940. Radiometer.
14. Lindquist, S. & Singer, M. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. Elsevier.
15. Schebor, C.; Mazzobre, M. & del Pilar Buera, M. 2009. Glass transition and time-dependent crystallization behavior of dehydration bioprotectant sugars. Elsevier.
16. Patist, A. & Zoerb, H. 2004. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Elsevier, Minneapolis: Cargill Inc. Research Center.
17. de Jesus Pereira, E.; Panek, A. & Araujo Eleutherio, E. 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Viitattu 10.3.2015. Saatavissa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC514863/>
18. Sigma-Aldrich. 2015. Bovine Serum Albumins. Sigma-Aldrich. Viitattu 10.3.2015. Saatavissa <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=103994915>



19. Sigma-Aldrich. Product information: Albumin from bovine serum. Saint Louis: Sigma-Aldrich. Viitattu 10.3.2015. Saatavissa [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/b8667pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b8667pis.pdf)
20. deMan, J. 1990. Principles of food chemistry. 2. New York: Chapman & Hall. 99, 118-121.
21. Heldman, D. & Hartel, R. 1997. Principles of food processing. New York: Chapman & Hall. 177-184.
22. Korhonen, P. 2008. Amorfisten sokerien ja sokeriseosten stabiilisuus. Seminaaritiivistelmä. Farmasian tiedekunta. Helsinki: Helsingin yliopisto. Viitattu 20.3.2015. Saatavissa [http://www.pharmtech.helsinki.fi/seminaarit/seminaarit/pasi\\_korhonen.pdf](http://www.pharmtech.helsinki.fi/seminaarit/seminaarit/pasi_korhonen.pdf)
23. Suomen Sokeri. Sokeri: Auringon energiasta elintarvikkeiden valmistusaineiksi. Suomen Sokeri Oy.
24. Franks, F. 1999. Thermomechanical properties of amorphous saccharides: Their role in enhancing pharmaceutical product stability. Taylor & Francis: London.
25. Telle, J. & Pearlstine, N. 2009. Amorphous materials: research, technology and applications. New York: Nova Science Publishers. 185-210. Viitattu 22.1.2015. Saatavissa <https://login.ezproxy.turkuamk.fi/login?url=http://site.ebrary.com/lib/turkuamk/Doc?id=10660376>