

Tuulia Tamminen

Kapillaariseen isoelektriseen fokusointiin perustuvan analyysimenetelmän kehittäminen ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

20.1.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Tuulia Tamminen Kapillaariseen isoelektriseen fokusointiin perustuvan analyysimenetelmän kehittäminen ja validointi 43 sivua + 6 liitettä 20.1.2016
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	Syventävät biotieteet
Ohjaaja(t)	Laboratoriopäällikkö Tuula Hauta-aho Laboratorioinsinööri Miika Kuivikko
<p>Monoklonaaliset vasta-aineet ovat nousseet viime vuosina merkittäviksi terapeuttisina proteiineina sekä diagnostiikassa. Monoklonaalisia vasta-aineita käytetään erityisesti syöpien ja autoimmuunitautien hoidossa. Kasvamassa oleva terapeuttisten vasta-aineiden määrä lisää tarvetta myös tehokkaille analyysimenetelmille vasta-aineiden karakterisoimiseksi. Pienetkin muutokset vasta-aineen monimutkaisessa rakenteessa voivat vaikuttaa olennaisesti valmisteen tehoon ja turvallisuuteen.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Yliopiston Apteekin analyttisessä laboratoriossa. Työn tarkoituksena oli kehittää kapillaariseen isoelektriseen fokusointiin (cIEF) perustuva analyysimenetelmä monoklonaalisten vasta-aineiden varausten heterogeenisyyden tutkimiseen. Menetelmällä oli tarkoitus korvata perinteinen geelillä ajettava isoelektrinen fokusointi (IEF) monoklonaalisten vasta-aineiden rutiinianalytiikassa. Lisäksi tässä opinnäytetyössä haluttiin vertailla cIEF:n ja kapillaarivyöhyke-elektroforeesin (CZE) soveltuvuutta monoklonaalisten vasta-aineiden varausprofiilien tutkimiseen. Menetelmien pystyttämisen jälkeen validoitiin molemmat menetelmät ja tulosten perusteella arvioitiin menetelmien vahvuuksia ja heikkouksia.</p> <p>CZE:n etuna oli yksinkertaisempi näytteenkäsittely ja pienemmät analyysikustannukset kuin cIEF:ssä. cIEF:llä saadaan kuitenkin vasta-aineen varausprofiiliin lisäksi selville myös isoformien pI-arvot, mikä ei ole mahdollista CZE:llä. Migraatioaikojen toistettavuudessa oli ongelmia molemmilla menetelmillä, mutta CZE:llä migraatioaikojen toistettavuus oli hieman parempi. cIEF-menetelmällä saatiin kuitenkin toistettavia pI-arvoja, kun käytettiin sisäisenä standardina pI-markkereita.</p> <p>Validoinnin tulosten perusteella molemmat menetelmät soveltuvat aiottuun käyttötarkoitukseen. cIEF:llä ja CZE:llä saatuja tuloksia ei voi verrata suoraan toisiinsa, koska menetelmät antavat erilaista tietoa vasta-aineen ominaisuuksista. Yhdessä muiden analyysimenetelmien kanssa cIEF ja CZE ovat tehokkaita työkaluja monoklonaalisten vasta-aineiden karakterisointiin.</p>	
Avainsanat	monoklonaaliset vasta-aineet, varausten heterogeenisyys, cIEF, CZE, validointi

Author(s) Title Number of Pages Date	Tuulia Tamminen Development and validation of a capillary isoelectric focusing method 43 pages + 6 appendices 20 January 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	Advanced Biosciences
Instructor(s)	Tuula Hauta-aho, Laboratory Manager Miika Kuivikko, Laboratory Engineer
<p>Monoclonal antibodies have become increasingly significant as therapeutic proteins and diagnostic tools over the last few years. Monoclonal antibodies are used in particular to treat cancers and autoimmune diseases. The growing number of therapeutic monoclonal antibodies also increases the need for powerful analytical methods to characterize monoclonal antibodies. Even very small changes in the structure of a monoclonal antibody could compromise the effectiveness and safety of a therapeutic product.</p> <p>The thesis was done in the analytical laboratory of University Pharmacy. The aim of this thesis was to develop a capillary isoelectric focusing method (cIEF) for the analysis of monoclonal antibody charge variants. The purpose of the cIEF method was to replace the traditional gel isoelectric focusing (IEF) as a routine analytical method for monoclonal antibodies. Additionally, the cIEF method and a capillary zone electrophoresis (CZE) method were compared with each other with respect to their suitability for the analysis of monoclonal antibody charge variants. After method set ups both methods were validated. The validation results were used to evaluate benefits and flaws of both methods.</p> <p>The most significant benefits of CZE compared to cIEF were simpler sample preparation and lower cost of analysis. However, with cIEF it is possible to obtain information about the pI values of different isoforms, which is not possible with CZE. The repeatability of the migration times was problematic in both methods, but repeatability was a little better in CZE. On the other hand, good repeatability of the pI values was achieved with cIEF when pI markers were used as internal standards.</p> <p>The validation results indicate that both methods are suitable for intended use. Results obtained from cIEF and CZE are not fully comparable because the methods give information about different properties of the monoclonal antibody. Together with other analytical methods, cIEF and CZE are powerful tools for the characterization of monoclonal antibodies.</p>	
Keywords	monoclonal antibodies, charge variants, cIEF, CZE, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	1
2.1	Monoklonaaliset vasta-aineet	1
2.1.1	Rakenne	2
2.1.2	Immunoglobuliini G (IgG)	4
2.1.3	Immunoglobuliini M (IgM)	4
2.1.4	Anti-human IgM -vasta-aine	5
2.1.5	Hybridomasolut	5
2.1.6	Vasta-aineiden varausprofiili	5
2.2	Kapillaarielektroforeesi (CE)	6
2.2.1	Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi (CZE)	9
2.2.2	Kapillaari-iselektrinen fokusointi (cIEF)	10
2.2.3	Kapillaarielektroforeesilaitte	13
3	Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit	15
4	Työn suoritus	17
4.1	Validointi	17
4.2	Ajo-olosuhteet	17
4.3	Näytteiden käsittely	18
4.4	Vasta-aineen isoformien määrittäminen	19
4.5	Spesifisyys	19
4.6	Menetelmän toistettavuus	20
4.7	Laboratorion sisäinen uusittavuus	20
4.8	Lineaarisuus	20
4.9	Toteamis- ja määritysraja	21
4.10	Haavoittuvuus	22
4.11	Kapillaarin stabiilius	23
4.12	Näyteliuosten säilyvyys	23
4.13	Puskuri- ja huuhteluliuosten stabiilius	23
5	Tulokset ja tulosten tarkastelu	24
5.1	Spesifisyys	24

5.2	Menetelmän toistettavuus	26
5.3	Laboratorion sisäinen uusittavuus	28
5.4	Lineaarisuus	31
5.5	Toteamis- ja määritysraja	32
5.6	Haavoittuvuus	33
5.7	Kapillaarin stabiilius	35
5.8	Näyteliuosten säilyvyys	36
5.9	Puskuri- ja huuhteluliuosten stabiilius	38
6	Analyysien hinnat	38
7	Yhteenveto	39
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1. cIEF-menetelmän uusittavuus	
	Liite 2. CZE-menetelmän uusittavuus	
	Liite 3. cIEF-menetelmän lineaarisuus	
	Liite 4. CZE-menetelmän lineaarisuus	
	Liite 5. cIEF-menetelmän näyteliuoksen säilyvyys	
	Liite 6. CZE-menetelmän näyteliuoksen säilyvyys	

Lyhenteet

ANOVA	<i>Analysis of variance.</i> Tilastollinen menetelmä, jolla voidaan tarkastella tulosten vaihtelua ryhmien sisällä ja välillä.
CE	<i>Capillary electrophoresis.</i> Kapillaarimigraatiotekniikka, joka perustuu varautuneiden yhdisteiden liikkumiseen sähkökentässä.
cIEF	<i>Capillary isoelectric focusing.</i> Isoelektriseen fokusointiin perustuva menetelmä kapillaarielektroforeesilla.
CZE	<i>Capillary zone electrophoresis.</i> Varauksellisten yhdisteiden erottaminen sähkökentän avulla kapillaarielektroforeesilla.
EOF	<i>Electro-osmotic flow.</i> Kapillaarin sisäseinämään muodostuvan kaksoiskerroksen ja sähkökentän aiheuttama elektrolyyttiliuoksen virtaaminen kohti katodia.
icIEF	<i>Imaging capillary isoelectric focusing.</i> cIEF-menetelmä, jossa detektointi tapahtuu koko läpinäkyvän kapillaarin matkalta.
IEF	<i>Isoelectric focusing.</i> Yhdisteiden erottaminen sähkökentän avulla niiden isoelektriseen pisteeseen perusteella.
Ig	<i>Immunoglobulin.</i> Immuunijärjestelmään kuuluva glykoproteiini, joka tunnistaa elimistölle vieraita rakenteita eli vasta-aine.
kDa	<i>Kilodalton.</i> Molekyylipainon yksikkö, joka vastaa 1000 daltonia.
mAb	<i>Monoclonal antibody.</i> Vasta-aine, joka tunnistaa vain yhden antigeenisen epitoopin.
pI	<i>Isoelectric point.</i> Molekyylille ominainen pH, jossa sen kokonaisvaraus on nolla.

1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää kapillaariseen isoelektriseen fokusointiin (cIEF) perustuva analyysimenetelmä monoklonaalisten vasta-aineiden (mAb) varauksen heterogeenisyyden tutkimiseen. Menetelmällä haluttiin korvata perinteinen geelillä ajettava isoelektrinen fokusointi (IEF) monoklonaalisten vasta-aineiden rutiinianalytikassa. Lisäksi tässä opinnäytetyössä haluttiin vertailla cIEF-menetelmän ja kapillaarivyöhyke-elektroforeesin (CZE) soveltuvuutta monoklonaalisten vasta-aineiden varauksen heterogeenisyyden tutkimiseen. Menetelmien pystyttämisen jälkeen validoitiin sekä cIEF- että CZE-menetelmät. Validoinnin tulosten perusteella arvioitiin menetelmien vahvuuksia ja heikkouksia.

Opinnäytetyö tehtiin Yliopiston Apteekin analyttisessä laboratoriossa. Analyttinen laboratorio vastaa Yliopiston Apteekin omien varasto- ja raaka-aineiden analysoinnista sekä tarjoaa sopimusanalytiikkaa muiden tahojen tarpeisiin. Laboratoriolle on Fimean lupa kemiallisten analyysipalvelujen tuottamiseen lääketeollisuudelle. Laboratoriolle on käytössä monipuolinen laitevalikoima ja nykyaikaiset analyysimenetelmät GMP-ympäristössä (Good Manufacturing Practice). [1.]

Aluksi kerrotaan lyhyesti monoklonaalista vasta-ainesta ja tässä työssä käytetystä immunoglobuliini M:n (IgM) vasta-ainesta. Tämän jälkeen käsitellään kapillaarielektroforeesin (CE) yleistä teoriaa ja tarkemmin cIEF- ja CZE-menetelmät.

2 Teoria

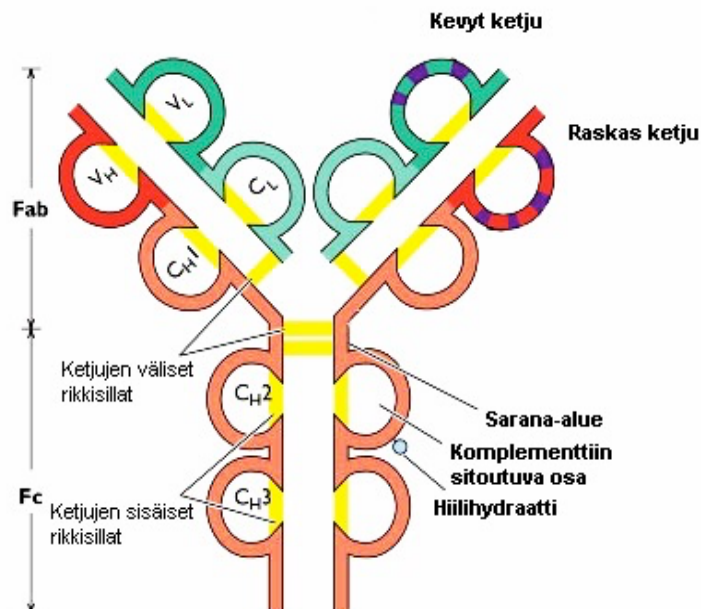
2.1 Monoklonaaliset vasta-aineet

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) ovat glykoproteiineja, jotka tunnistavat spesifisen rakenteen eli epitoopin ja pystyvät sitoutumaan siihen. Yhtä antigeenia vastaan voi syntyä useita vasta-aineita, jotka tunnistavat erilaisia epitooppeja. Tällaista vasta-aineiden seosta kutsutaan polyklonaaliseksi vasta-aineksi. [2, s. 624.] Monoklonaaliset vasta-aineet ovat identtisiä vasta-aineita, jotka tunnistavat vain yhden epitoopin [3, s. 508].

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat viime vuosina nousseet merkittäviksi sekä terapeuttisina proteiineina että kliinisessä diagnostiikassa [4; 5]. Monoklonaalisia vasta-aineita käytetään erityisesti syöpien ja autoimmuunitautien hoidossa. Kasvamassa oleva terapeuttisten monoklonaalisten vasta-aineiden määrä lisää tarvetta myös tehokkaille analyysimenetelmille. Pienetkin muutokset vasta-aineen monimutkaisessa rakenteessa voivat vaikuttaa olennaisesti valmisteen tehoon ja turvallisuuteen. [6.]

2.1.1 Rakenne

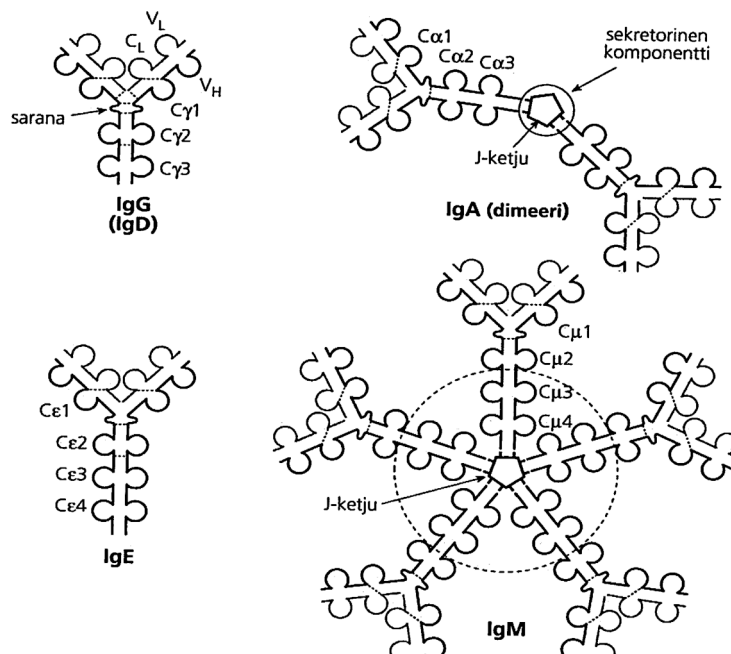
Vasta-aineet rakentuvat perusyksiköistä, joita kutsutaan domeeneiksi. Vasta-aineen proteiinirunko koostuu kahdesta identtisestä raskaasta ketjusta (H-ketju) ja kahdesta identtisestä kevyestä ketjusta (L-ketju). [2, s. 626; 5; 6.] Molemmista ketjuista on yksi variaabeli (V) domeeni ja yksi tai useampi vakiodomeeni (C). Lisäksi proteiinirunkoon on liittynyt hiilihydraattiosa. Vasta-aineen perusrakenne eli monomeeri on Y-kirjaimen muotoinen (Kuva 1.). Vasta-aineen molemmat variaabelit HL-parit pystyvät sitoutumaan antigeeniin, eli yksi monomeeri voi tarttua yhtä aikaa kahteen samanlaiseen epi-tooppiin. [2, s. 626.]



Kuva 1. Vasta-aineen perusrakenne. V_H ja V_L ovat variaabeleita domeeneja, C_H ja C_L ovat vakiodomeeneja. [7, muokattu.]

Elimistössä B-lymfosyytit ja niistä erilaistuneet plasmaklorit ovat erikoistuneet tuottamaan vasta-aineita [2, s. 626]. H- ja L-ketjut syntetisoidaan soluissa erikseen ja kootaan sitten yhteen. H-ketjut liittyvät toisiinsa kahdella tai useammalla kovalenttisella rikkisillalla. Rikkisillat muodostavat H-ketjujen välille sarana-alueen. L-ketju kiinnittyy H-ketjuun yleensä yhdellä rikkisillalla ja ei-kovalenttisilla sidoksilla. Vasta-aineen monomeerin molekyylipaino on tyypillisesti n. 150 kilodaltonia (kDa). [2, s. 626; 5.]

Immunoglobuliinit jaetaan viiteen luokkaan: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Luokat eroavat toisistaan H-ketjun vakiodomeeneja koodaavien geenien (α , δ , ϵ , γ ja μ) osalta (Kuva 2.). H-ketjun vakiodomeenit muodostavat vasta-aineen Fc-osan (fragment crystallizable), joka huolehtii efektorifunktioista eli vuorovaikutuksesta immuunijärjestelmän solujen kanssa. [2, s. 630–633; 6.] Eri efektorifunktioihin tarvitaan erilaiset Fc-rakenteet ja Fc-osa vaikuttaa olennaisesti vasta-aineen aktiivisuuteen ja tehoon [6]. Myös L-ketjua koodaavia geenejä on kaksi erilaista (κ ja λ). L-ketjun rakenteella ei tiedetä olevan vaikutusta vasta-aineen efektorifunktioihin. H- ja L-ketjujen variaabelit domeenit muodostavat vasta-aineen Fab-osan (fragment antigen-binding), joka sitoutuu antigeeniin. [2, s. 630–633; 6.]



Kuva 2. Eri Ig-luokkien rakenteet [2, s. 630, muokattu].

2.1.2 Immunoglobuliini G (IgG)

IgG:n tehtävänä elimistössä on neutraloida toksiineja, saostaa antigeeneja, aktivoida immuunipuolustuksen komplementtijärjestelmä sekä opsonoida bakteereita. IgG:n puoliintumisaika on poikkeuksellisen pitkä, koska se sitoutuu punasolujen ja endoteelisolujen pinnalla olevaan erityiseen Fc-reseptoriin. Tämän takia IgG on yleisin verestä löytyvistä immunoglobuliineista. [2, s. 632.]

Toistaiseksi suurin osa terapeuttisista monoklonaalisista vasta-aineista kuuluu rakenteeltaan IgG-luokkaan [6; 8]. IgG:n rakennetta käytetään usein kuvaamaan vasta-aineiden perusrakennetta. IgG esiintyy monomeerinä. [2, s. 632.] IgG:n H-ketjussa on kolme vakiodomeenia ja yksi variaabeli domeeni, ja L-ketjussa on yksi kumpaakin domeenia. IgG:t jaetaan H-ketjun vakiodomeenien rakenteellisten erojen perusteella vielä alaluokkiin IgG1–4. Eri alaluokkien rakenteet eroavat toisistaan H-ketjuja yhdistävien rikkisiltojen määrän ja sijainnin, sekä sarana-alueiden kokojen osalta. [5.] Proteiiniantigeenien vasta-aineista suurin osa kuuluu IgG1-luokkaan, ja hiilihydraattiantigeenien vasta-aineet kuuluvat yleensä IgG2-luokkaan. IgG3- ja IgG4-luokkien vasta-aineita esiintyy hyvin vähän. [2, s. 632.]

2.1.3 Immunoglobuliini M (IgM)

IgM:n tehtävänä elimistössä on neutraloida toksiineja ja aktivoida immuunipuolustuksen komplementtijärjestelmä. Solukalvoon kiinnittyneenä monomeerinä IgM voi myös toimia B-lymfosyyttien antigeenireseptorina. IgM:ää esiintyy veressä runsaasti immunisaation alussa. IgM:n tunnistavaa vasta-ainetta voidaan hyödyntää diagnostiikassa infektion vaiheen selvittämiseen. Jos verestä löytyy huomattavasti IgM:ää, voidaan päätellä infektion olevan juuri meneillään tai äskettäin sairastettu. [2, s. 632–633.]

IgM:n H-ketjussa on neljä vakiodomeenia ja yksi variaabeli domeeni, ja L-ketjussa on yksi kumpaakin domeenia. IgM-molekyylin hiilihydraattiosa on suurempi kuin IgG:ssä, mistä johtuu monomeerin suurempi molekyylipaino n. 190 kDa. Veressä kiertävä IgM esiintyy pentameerinä. Monomeerien Fc-osat muodostavat yhtenäisen levyn, joka sisältää kaksi domeenia jokaisesta H-ketjusta. Domeenit liittyvät yhteen rikkisiltojen ja pienen kiinnitysmolekyylin, J-ketjun, avulla. IgM:n H-ketjun (μ) rakenteen erikoispiirteet johtavat molekyylin polymerisoitumiseen. [2, s. 632–633.]

2.1.4 Anti-human IgM -vasta-aine

Tässä työssä käytetty monoklonaalinen vasta-aine oli anti-human IgM -vasta-aine, joka tunnistaa ihmisen IgM:n. Rakenteeltaan vasta-aine kuuluu IgG1-alaluokkaan. Vasta-aine oli tuotettu *in vitro* kasvatetuissa hiiren hybridoomasoluissa, ja sen puhdistamisessa oli käytetty proteiini A -affiniteettikromatografiaa. Valmistajan mukaan vasta-aineen isoformien pI-arvojen tulisi olla välillä 6,4–5,5. Vasta-aine oli valmisteessa monomeerinä ja sen puhtausaste oli > 95 %. [9.]

2.1.5 Hybridoomasolut

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan usein hybridoomasoluissa. Teknologia kehitettiin vuonna 1975 ja sitä hyödynnetään mm. diagnostisissa ja terapeuttisissa sovelluksissa. Hybridoomasolut ovat soluklooneja, jotka tuottavat identtisiä vasta-aineita ja voivat jakautua loputtomasti. Klooneista valitaan haluttuja vasta-aineita muodostavat solut ja niitä käytetään vasta-aineiden tuottamisessa. [3, s. 508–509.]

Hybridoomasolut valmistetaan immunisoimalla esim. hiiri halutulla antigeenilla. Hiiren pernasta eristetään vasta-aineita tuottavia B-lymfosyyttejä, jotka fuusioidaan hiiren myeloomasolujen kanssa. Syntyvissä hybridoomasoluissa on molempien solujen perintöaines sekä myeloomasolun kyky jakautua loputtomasti. Soluja kasvatetaan spesifisessä mediumissa, jossa vain hybridoomasolut pystyvät jakautuman. Hybridoomasolujen tuottamat vasta-aineet testataan ja sopivat kloonit valitaan jatkokasvatukseen. [3, s. 509.]

2.1.6 Vasta-aineiden varausprofiili

Fysikaaliset ja kemialliset muutokset vasta-aineen rakenteessa voivat vaikuttaa sen varausprofiiliin. Proteiinit ovat luonnostaan epästabiileja molekyylejä, mikä asettaa haasteita niiden fysikaaliselle ja kemialliselle säilyvyydelle. [10.] Vasta-aineiden yleisimpiä fysikaalisia hajoamismekanismejä ovat denaturoituminen eli molekyylin sekundaari- tai tertiäärirakenteen rikkoutuminen ja aggregoituminen eli molekyylien polymerisoituminen [5]. Merkittäviä kemiallisia muutoksia ovat mm. deaminaatio eli aminoryhmien poisto molekyylistä ja glykosylaatio eli sokerirakenteiden entsyymaattinen kiinnittäminen molekyyliin [8; 10]. Suurimmassa osassa terapeuttisia proteiineja on jokin

post-translationalinen eli proteiinisynteesin jälkeinen muutos verrattuna natiiviin proteiiniin [8].

Proteiinissa esiintyviin post-translationalisiin muutoksiin vaikuttavat sen tuottamisessa käytetty solulinja, tuotanto-olosuhteet sekä proteiinin puhdistamisessa käytetyt menetelmät. Glykosylaatio on usein olennainen lopullisen proteiinin toiminnan kannalta eli post-translationaliset muutokset voivat olla myös tarkoituksenmukaisia. [5; 8.] Glykoproteiinien tuottamiseen käytetäänkin yleensä eukaryoottisoluja, koska ne kykenevät tekemään proteiineihin post-translationalisia muutoksia. Eukaryoottisolujen vaatimassa tuotantoympäristössä proteiinit joutuvat kuitenkin tekemisiin solulinjan tuottamien yhdisteiden ja käytetyn ravintoliuoksen (medium) kanssa, mikä voi johtaa ei-toivottujen muutosten syntymiseen. [8.]

Proteiinin varausprofiilin muutoksia voidaan tutkia mm. elektroforeettisilla analyysimenetelmillä. Poikkeavien varausten havaitseminen ei kuitenkaan ole ongelmaton, koska muutokset ovat usein monimutkaisia ja muuttunutta proteiinia saattaa olla hyvin vähän verrattuna haluttuun proteiiniin. Varausprofiilin muutos voi olla hyvin pieni, mikä asettaa korkeat vaatimukset analyysimenetelmän erotuskyvyille. Myös käytetty analyysimenetelmä voi aiheuttaa muutoksia proteiinin varausprofiiliin, jos menetelmä vaatii esim. näytteen laimentamista tai puskurinvaihtoa. [10.]

Muutokset vasta-aineiden rakenteessa voivat vaikuttaa niiden aktiivisuuteen ja terapeuttisten valmisteiden turvallisuuteen [5; 10]. Tämän takia tarvitaan tehokkaita ja nopeita analyysimenetelmiä mahdollisten muutosten havaitsemiseen. Seuraavissa luvuissa on käsitelty tarkemmin CZE- ja cIEF-tekniikoita sekä niiden soveltamista monoklonaalisten vasta-aineiden varausprofiilien tutkimiseen.

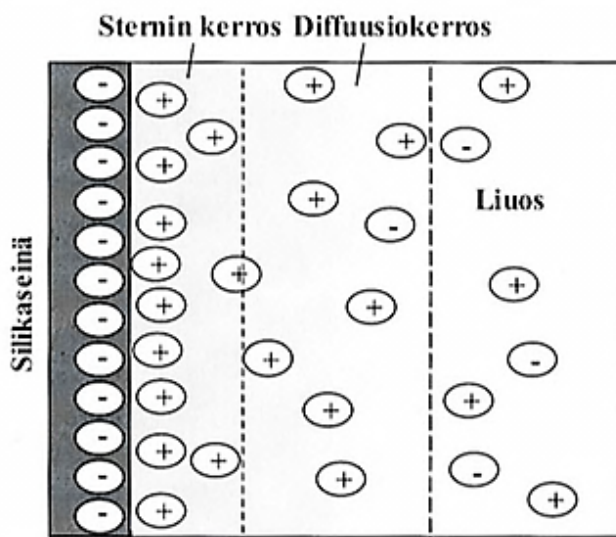
2.2 Kapillaarielektroforeesi (CE)

Yhdisteiden erottuminen CE:ssä perustuu ionien erilaisiin elektroforeettisiin liikkuvuuksiin sähkökentässä. Erottuminen tapahtuu ohuen kapillaarin sisällä. [11, s. 1; 12, s. 220.] CE:llä voidaan erottaa nopeasti ja tehokkaasti varattuja yhdisteitä pienistäkin näytemääristä [11, s. 1]. Yhdisteiden erottumiseen vaikuttavat niiden liikkuvuus, diffuusio, vuorovaikutukset kapillaarin seinämän kanssa, elektro-osmoosi ja sähkövirran aiheuttama Joule-lämpö. Erotukseen vaikuttavia olosuhteita ovat mm. pH, lämpötila,

sähkökentän voimakkuus, viskositeetti, ionivahvuus sekä kapillaarin pituus ja halkaisija. [12, s. 222–228.]

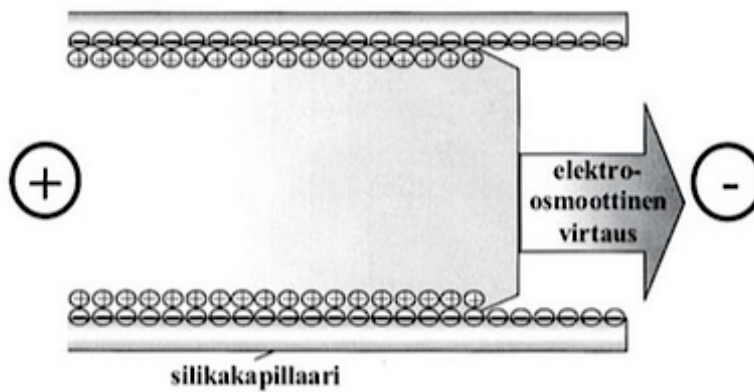
CE:ssä taustaelektrolyytinä on yleensä sähköä johtava puskuriliuos. CZE ja cIEF ovat molemmat jatkuvia elektrolyyttisysteemejä, eli taustaelektrolyytti pysyy samana koko erottumisen ajan. CZE:ssä taustaelektrolyytin koostumus pysyy samana koko kapillaarin pituudelta (kineettinen prosessi) ja erottuvat yhdisteet liikkuvat tasaisella nopeudella sähkökentässä. cIEF:ssä taustaelektrolyytin koostumus muuttuu lineaarisesti tai asteittain kapillaarin pituuden funktiona (tasapainoprosessi), jolloin myös sähkökenttä ja yhdisteiden liikkuvuus muuttuvat migraatiomatalla. [11, s. 5–6; 12, s. 220–222.]

Päällystämättömien synteettisistä piidioksidista valmistettujen silikakapillaarien sisäseinämässä on vapaita silanoliryhmiä (Si-O-H), jotka ionisoituvat pH:n ollessa yli 2–3. Elektrolyyttiliuoksen positiivisten ionien kulkeutuessa sähköisen vetovoiman vaikutuksesta seinämän lähelle muodostuu sähköinen kaksoiskerros (Kuva 3.). Osa positiivisesti varautuneista ioneista jää pysyvästi kiinni seinämään, ja ne muodostavat Sternin kerroksen. Sternin kerroksen viereen muodostuu diffuusiokerros ja näiden kerrosten välillä vallitsee tasapainotila. Diffuusiokerros on varauksellinen, ja se liikkuu sähkökentässä kohti katodia. Diffuusiokerroksen liikkuminen aiheuttaa liuotinmolekyylien liikkeen samaan suuntaan, ja tätä liikettä kutsutaan elektro-osmoottiseksi virtaukseksi (EOF). [11, s. 6 ja 14; 12, s. 222–225.]



Kuva 3. Sähköinen kaksoiskerros silikakapillaarin seinämässä [12, s. 223].

Elektro-osmoosi on tärkeä ilmiö CE:n kannalta. CZE:ssä EOF on olennainen resoluution kannalta, mutta esim. cIEF:ssä EOF halutaan minimoida, koska se vaikuttaa näytesyöhykkeiden mobilisointiin [11, s. 17; 12, s. 250–251]. EOF:iin voidaan vaikuttaa mm. muuttamalla elektrolyyttiliuoksen pH:ta ja ionivahvuutta, sähkökentän voimakkuutta ja lämpötilaa [11, s. 17]. Elektrolyyttiliuoksen valmistaminen vaatii huolellisuutta, sillä pienetkin erot ionivahvuuksissa ja pH:ssa voivat vaikuttaa erotukseen. Sähköinen kaksoiskerros on hyvin ohut verrattuna kapillaarin sisähalkaisijaan, mistä johtuu CE:lle tyypillinen tylppä virtausprofiili (Kuva 4.) ja elektroferogrammien terävät piikit. [12, s. 222–232.]



Kuva 4. Elektro-osmoottinen virtaus kapillaarissa [12, s. 224].

CE-menetelmät ovat laajassa käytössä terapeuttisten proteiinien analysoinnissa muiden menetelmien rinnalla. CE-menetelmiä käytetään mm. monoklonaalisten vasta-aineiden identifioimiseen ja puhtauden määrittämiseen. Proteiinien monimutkaisten rakenteiden takia yksittäiset analyysimenetelmät eivät riitä täydelliseen karakterisointiin, vaan proteiinien ominaisuuksia joudutaan tutkimaan useilla erilaisilla menetelmillä. [13.]

IEF ja ioninvaihtokromatografia ovat olleet pitkään rutiinianalytiikkaa monoklonaalisten vasta-aineiden varausten heterogeenisyyden tutkimisessa, mutta cIEF- ja CZE-menetelmien käyttö on lisääntynyt viime vuosina [14]. CE-menetelmien etuina ovat mm. nopea erotus, korkea resoluutio, analyysien automatisointi, pieni reagenssien kulutus ja pienet näytilavuudet [11, s. 1; 12, s. 220–222; 15, s. 237–239]. CZE:llä ja

cIEF:llä on myös mahdollista analysoida samoissa olosuhteissa useita erilaisia näytteitä [16; 17]. Massaspektrometria on yleistymässä proteiinien analytiikassa ja mahdollisuus liittää massaspektrometri detektoriksi lisää CE-menetelmien käyttömahdollisuuksia [13].

Yksi suurimmista rajoituksista CE-menetelmissä on makromolekyylien, kuten proteiinien, adsorboituminen kapillaarin sisäseinämään. Proteiinien reversiibeli adsorptio pidentää migraatioaikoja ja huonontaa erottumista. Irreversiibeli adsorptio johtaa näytteen häviämiseen ja EOF:n muutoksiin. [13.] Adsorboitumista ei pystytä estämään kokonaan, mutta sitä voidaan vähentää kapillaarin huuhtelulla (NaOH, HCl), käyttämällä päällystettyjä kapillaareja ja lisäämällä taustaelektrolyyttiin esim. pinta-aktiivisia aineita tai neutraaleja polymeerejä [12, s. 227; 13].

2.2.1 Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi (CZE)

CZE on yksinkertaisin kapillaarimigraatiotekniikka, josta käytetään kirjallisuudessa usein myös termiä CE. CZE:ssä yhdisteiden erottuminen perustuu niiden erilaisiin elektroforeettisiin liikkuvuuksiin elektrolyyttiliuoksessa. Molekyylin elektroforeettiseen liikkuvuuteen vaikuttavat sen varaus ja hydrodynaaminen säde käytetyissä olosuhteissa. [11, s. 6; 12, s. 248; 16.] CZE soveltuu vain varauksellisten yhdisteiden erottamiseen [12, s. 248].

CZE:ssä EOF kuljettaa varautuneet yhdisteet detektorille. Migraationopeuteen vaikuttavat mm. sähkökentän voimakkuus, pH, ionivahvuus, elektrolyyttiliuoksen konsentraatio, viskositeetti, lämpötila, lisäaineet sekä kapillaarin pituus ja halkaisija. [11, s. 8; 12, s. 248.] Monoklonaalisten vasta-aineiden tutkimisessa CZE:tä käytetään vasta-aineiden identifiointiin sekä isoformien, varausprofiilien ja erien puhtauden määrittämiseen [13].

CZE:llä on hyvä erotuskyky, kun eliminoidaan proteiinin ja kapillaarin seinämän välinen vuorovaikutus. Korkealla tai matalalla pH:lla voidaan vähentää adsorptiota kapillaarin seinämään, mutta liian suuri ero taustaelektrolyytin pH:ssa ja proteiinin isoelektrisessä pisteessä voi muuttaa proteiinin rakennetta. [18.] He tutkimusryhmineen [16] analysoi monoklonaalisten vasta-aineiden varausten heterogeenisyyttä käyttämällä päällystämätöntä silikakapillaaria. Tutkimuksessa todettiin, että konsentroitua 6-

aminokapronihappo (EACA)-puskuri ja kapillaarin huuhteleminen hapolla (0,1 N HCl) vähensivät tehokkaasti adsorptiota.

Toinen tutkimusryhmä käytti taustaelektrolyytin lisäaineina EACA:n lisäksi trietyleenitetramiinia (TETA) ja hydroksiopropyylimetyyliselluloosaa (HPMC) [18]. EACA toimii kahaisionina, joka muodostaa vuorovaikutuksia kapillaarin seinämän vapaiden silanoliryhmien kanssa. HPMC on lineaarinen polymeeri, joka adsorboituu neutraaleihin pintoihin. HPMC:n adsorboituminen kapillaarin seinämään vähentää vuorovaikutusta proteiinin ja seinämän välillä. TETA puolestaan kilpailee proteiinien kanssa silanoliryhmiin sitoutumisesta. Adsorboitunutta proteiinia voidaan poistaa huuhtelemalla kapillaaria hapolla, jolloin silanoliryhmät protonoituvat ja proteiinia irtoaa seinämästä. [16; 18.]

Monoklonaalisten vasta-aineiden varausprofiilien määrittämisestä CZE:llä on tehty useita tutkimuksia, joissa on myös arvioitu menetelmän soveltuvuutta tähän tarkoitukseen [14; 16; 18; 19]. CZE-menetelmien arvioinneissa kiinnostuksen kohteena on ollut erityisesti toistettavuus, koska olosuhteiden muutokset johtavat helposti varausprofiilin muuttumiseen. Sekä migraatioaikojen että isoformien suhteellisten osuuksien on osoitettu olevan toistettavia CZE-menetelmillä. [14; 16; 19.]

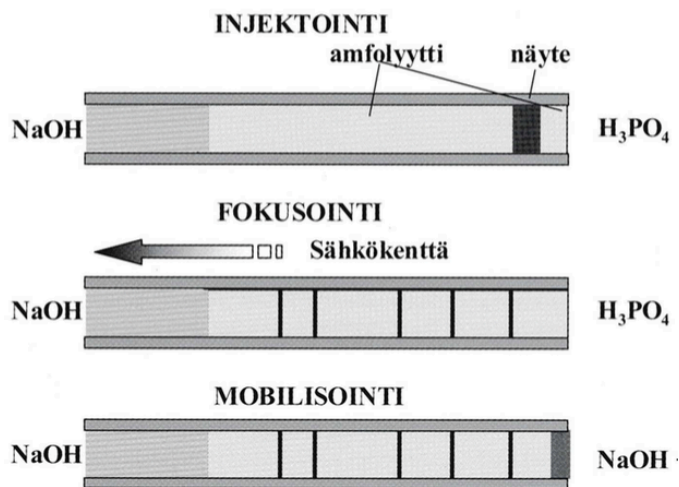
2.2.2 Kapillaari-isoelektrinen fokusointi (cIEF)

cIEF:ssä yhdisteiden erottuminen perustuu niiden isoelektriseen pisteeseen (pI). Isoelektrinen piste on pH-arvo, jossa molekyylin kokonaisvaraus ja elektroforeettinen liikkuvuus ovat nolla. [11, s. 11; 12, s. 250–251.] cIEF:llä voidaan erottaa kahaisioniyhdisteitä, joiden pI-arvot eroavat toisistaan. Proteiinit ovat positiivisesti varautuneita pI-arvoaan matalammassa pH:ssa ja negatiivisesti varautuneita pI-arvoaan korkeammassa pH:ssa. cIEF:ssä varautuneet proteiinit liikkuvat sähkökentässä kohti vastakkaisesti varautunutta elektrodia. Migraation suunta on aina kohti pienempää varaus- ja elektroforeettista liikkuvuutta. [15, s. 263–266.] Monoklonaalisten vasta-aineiden analytiikassa cIEF:ä käytetään isoformien, varausprofiilien ja erien puhtauden määrittämiseen [13].

cIEF:n vaatiman pH-gradientin muodostamisessa käytetään kantaja-amfolyyttejä. Kantaja-amfolyytit ovat yleensä rakenteeltaan alifaattisia aminokarboksyylihappoja, jotka muistuttavat peptideitä kokonsa ja kemiallisten ominaisuuksiensa puolesta. [20.] Kan-

taja-amfolyyttien kattama pH-alue valitaan käyttötarkoituksen mukaan [12, s. 250–251]. Saatavana on useita eri pH-alueen kattavia kaupallisia amfolyyttejä, joita voidaan myös yhdistellä tarpeen mukaan. pH-gradientti muodostetaan asettamalla kapillaarin päät elektrolyyttiliuoksiin, joilla on eri pH:t. Yleensä kapillaarin katodin puoleinen pää on emäksisessä liuoksessa (katolyytti) ja anodin puoleinen happamassa liuoksessa (anolyytti). [11, s. 11; 12, s. 250–251; 20.] Kantaja-amfolyytit järjestyvät sähkökenttään pI-arvoaan vastaavaan pH:hon ja muodostavat näin pH-gradientin [12, s. 250–251].

Perinteisessä cIEF-analysissä EOF pyritään minimoimaan ja analyysissä on kaksi vaihetta: fokusointi ja mobilisointi (Kuva 5.) [12, s. 250]. cIEF voidaan tehdä myös yksivaiheisena, jolloin fokusointi ja mobilisointi tapahtuvat yhtä aikaa ja yhdisteet kulkeutuvat detektorille EOF:n vaikutuksesta. Kolmantena vaihtoehtona on käyttää läpinäkyvää kapillaaria, jossa detektointi tapahtuu koko kapillaarin matkalta (imaging cIEF, icIEF) ja erillistä mobilisointivaihetta ei tarvita. [6.]



Kuva 5. cIEF:n erotusmekanismi. Näytteen mobilisointiin voidaan käyttää useita erilaisia tekniikoita. [12, s. 250, muokattu.]

Fokusoinnissa varautuneet yhdisteet liikkuvat sähkökentässä isoelektristä pistettään vastaavaan kohtaan pH-gradientissa, jolloin näytevyöhyke konsentroituu hyvin kapeaksi vyöhykkeeksi. Fokusoinnin jälkeen näytevyöhykkeet mobilisoidaan eli siirretään detektorille. [11, s. 11; 12, s. 250–251.] Mobilisointi voidaan tehdä painovoimalla, paineel-

la, vakuumilla tai kemiallisesti esim. vaihtamalla toisen elektrolyyttiliuoksen koostumusta [12, s. 250–251; 15, s. 291]. Kemiallisessa mobilisoinnissa taustaelektrolyytin muuttuminen siirtää pH-gradienttia haluttuun suuntaan [15, s. 291]. Kemiallinen mobilisointi on usein parempi vaihtoehto kuin paineen käyttäminen, koska paine aiheuttaa piikkien levenemistä [21].

Suurimpia ongelmia cIEF-menetelmissä ovat pH-gradientin epästabiilius ja proteiinien vuorovaikutus kapillaarin seinämän kanssa. cIEF-analyysille on ominaista pH-gradientin valuminen kohti toista elektroodia fokuoiminnin aikana [20]. Tämä voi johtaa pH-gradientin ääripäihin fokuoituvien proteiinien siirtymiseen katolyttiin tai anolyttiin. Ilmiötä voidaan vähentää optimoimalla katolyytin ja anolyytin konsentraatioita ja koostumusta sekä lisäämällä näytteeseen katodista ja anodista stabilaattoria. Stabilaattorit edustavat pH-alueen ääripäitä käytetyllä pI-välillä, jolloin pH-gradientin valuminen johtaa ensisijaisesti vain stabilaattoreiden häviämiseen. Esimerkiksi iminodiasetaattihapon (IDA; pI n. 2,2) ja arginiinin (pI n. 10,7) on osoitettu parantavan pH-gradientin stabiiliutta pI-välillä 3–10. [21.]

Myös EOF vaikuttaa pH-gradientin stabiiliuteen [20]. Tämän takia cIEF-analyyseissä käytetään usein neutraalia kapillaaria, jolla saadaan pienennettyä EOF:ia [20; 22]. Neutraali kapillaari vähentää myös proteiinien ja kapillaarin seinämän välisiä vuorovaikutuksia [22]. cIEF:n toistettavuus varsinkin migraatioaikojen osalta ei ole yhtä hyvä kuin muilla CE-menetelmillä, minkä takia näytteissä käytetään sisäisenä standardina pI-markkereita [20; 23].

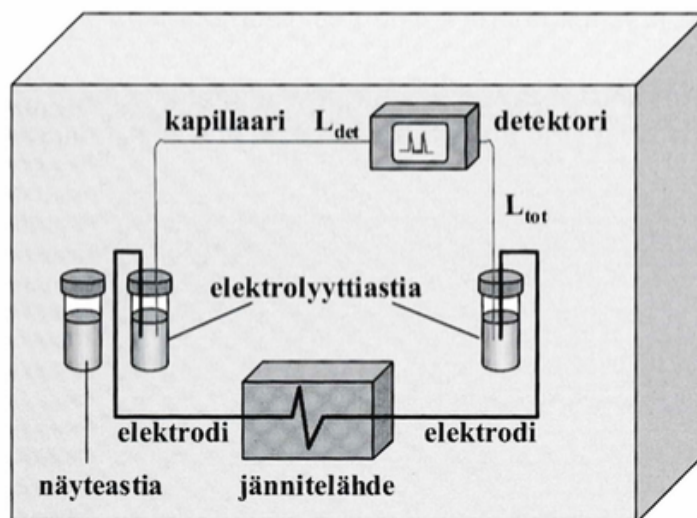
Fokuoiminnissa proteiinit konsentroituvat hyvin kapeiksi vyöhykkeiksi, mikä voi johtaa niiden aggregoitumiseen. Lisäksi proteiineilla on taipumus aggregoitua pH:ssa, joka on lähellä proteiinin pI-arvoa. Proteiinien pysymistä liukoisessa muodossa voidaan parantaa lisäämällä näytteeseen ureaa. [21.] Myös näytteen konsentraation pienentäminen, kapillaarin lämpötilan laskeminen, jännitteen pienentäminen sekä fokuointi- ja mobilisointiaikojen lyhentäminen vähentävät proteiinien aggregoitumista [24].

Myös cIEF-menetelmien soveltumista monoklonaalisten vasta-aineiden varausprofiilien määrittämiseen on arvioitu useiden tutkimusryhmien toimesta [17; 21; 24; 25]. cIEF:llä määritettyjen pI-arvojen ja varausprofiilien on osoitettu olevan toistettavia sekä laboratorion sisällä että laboratorioden välillä [17; 21]. Tang ym. [24] kehittivät yleispätevän

cIEF-menetelmän, jolla voidaan analysoida useita erilaisia monoklonaalisia vastaaineita samoissa olosuhteissa. Samassa tutkimuksessa vertailtiin cIEF- ja IEF-menetelmiä ja osoitettiin, että eri menetelmillä saadut isoformien suhteelliset osuudet ja pI-arvot vastasivat toisiaan [24]. Tämän perusteella IEF:n korvaamista cIEF:llä voidaan pitää varteenotettavana vaihtoehtona.

2.2.3 Kapillaarielektroforeesilaitte

CE-laitteisto on suhteellisen yksinkertainen. Laitteisto koostuu jännitelähteestä, puskuri- ja näytepöydistä, kapillaarista ja detektorista (Kuva 6.). Lisälaitteina voi olla mm. automaattinen näytteensyöttäjä, erilaisia detektoreita ja termostointiyksikkö kapillaarille sekä puskuri- ja näytepöydille. Sama peruslaitteisto soveltuu useille erilaisille kapillaarimigraatiotekniikoille. [11, s. 4–5; 12, s. 227–228.]



Kuva 6. Kaaviokuva CE-laitteistosta [12, s. 227].

CE-analyseissä käytettyjen kapillaarien sisähalkaisija on yleensä 25–100 μm . Ohut kapillaari mahdollistaa korkean jännitteen aiheuttaman lämmön tehokkaan johtumisen pois kapillaarista. Kapillaarit ovat yleensä ulkopinnaltaan polyimidillä päällystettyjä sili-kapillaareja. Analyysimenetelmästä riippuen kapillaarin sisäseinämä voi olla päällystämätön, päällystetty tai stationäärifaasilla pakattu. Kapillaarin päällystäminen parantaa

EOF:n kontrollointia ja vähentää yhdisteiden adsorptiota kapillaarin sisäseinämään. [12, s. 238–239.]

Lämpötilan kontrollointi analyysin suorituksen aikana on tärkeää, koska lämpötila vaikuttaa virran toistettavuuteen, puskurin viskositeettiin, yhdisteiden pK_a -arvoihin ja EOF:iin. Tämän takia kapillaari, sekä usein myös puskuri- ja näytepöydät, termostoidaan vakiolämpötilaan ilma- tai nestekierron avulla. [12, s. 229–232.]

Näytteen injektointi tapahtuu yleensä automaattisella näytteensyöttäjällä. Näytteen injektiossa voidaan käyttää elektrokineettistä tai hydrodynaamista injektiota [11, s. 24–25]. Elektrokineettisessä injektiossa taustaelektrolyytti korvataan näyteliuoksella ja jännitteen aiheuttama elektromigraatio siirtää näytteen kapillaariin. Hydrodynaamisessa injektiossa voidaan käyttää vetovoimavirtausta, painetta tai vakuumi-imua. [11, s. 34–37.] Elektrokineettisessä injektiossa kapillaariin siirtyvä näytemäärä riippuu jännitteestä ja jännitteen vaikutusajasta. Hydrodynaamisessa injektiossa näytemäärään vaikuttavat paine-ero kapillaarissa ja injektioaika. [11, s. 24–25.] CE-analyyseissä käytettävä injektio-tilavuus on yleensä 2–20 nl [12, s. 232].

Analyysit suoritetaan useimmiten siten, että EOF on kohti katodia. Detektori on sijoitettu kapillaarin katodin puoleiseen päähän ja näytteiden injektiot tehdään anodin puoleisesta päästä. [11, s. 13.] Tavallisin CE:ssä käytetty detektointimenetelmä on suoraan kapillaarista mitattava absorptio tai fluoresenssi. Suoraan kapillaarissa tapahtuva detektointi vaatii detektioikkunan tekemisen kapillaariin eli polyimidikerroksen poistamisen pieneltä alueelta. Detektioikkuna voidaan tehdä usealla eri tavalla, joista yksinkertaisin on detektioikkunan polttaminen. [11, s. 55; 12, s. 240.] Detektointi tapahtuu erotettavien yhdisteiden ohittaessa detektioikkunan [15, s. 291].

3 Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit

Työssä käytettiin seuraavia laitteita:

- CE: ProteomeLab PA 800, Beckman Coulter
- 32 Karat -ohjelmisto, versio 8.0
- Detektori: UV Detector Module, Beckman Coulter
- cIEF kapillaari: Neutral Capillary 30,2 cm, 50 µm (I.D.), Beckman Coulter, USA, Lot: M506642, S502212, M506701
- CZE kapillaari: Bare Fused Silica 30,2 cm, 50 µm (I.D.), Polymicro Technologies, Lot: ANMK08A
- Analyysivaaka: Mettler Toledo XP 205, Mettler Toledo XP 504
- Eppendorf Centrifuge 5415D
- pH-mittari: Mettler Toledo SevenMulti
- Labdancer, IKA
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Amicon Ultra-0,5 Ultracel 10K, Millipore, Irlanti, Lot: R0KA72706
- Finnpiipettejä.

Lisäksi käytettiin muita laboratorion yleisiä välineitä.

Työssä käytetyt reagenssit olivat

- Arginiinihydrokloridi, Ajinomoto, Japani, Lot: 65192
- Iminodiasetaattihappo (IDA), Sigma-Aldrich, Kiina, Lot: BCBD7749V
- Urea, Merck, Saksa, Lot: 65447
- cIEF Gel, Beckman Coulter, USA, Lot: M504541
- Ortofosforihappo 85 %, Merck, Saksa, Lot: K42745373
- Natriumhydroksidi (NaOH) 1 M, Merck, Saksa, Lot: HC41445437
- Väkevä etikkahappo 100 %, Merck, Saksa, Lot: K45886263 432
- pI-markkerit (pI 10,0; 9,5; 7,0; 5,5; 4,1), AB Sciex, USA, Lot: M503687
- Pharmalyte 3–10 for IEF, GE Healthcare, Ruotsi, Lot: 10040852
- eCAP 50 mM Tris Buffer pH 8, Beckman Coulter, USA, Lot: M410194
- Hydroksipropyylimetyyliselluloosa (HPMC), Sigma-Aldrich, Kiina, Lot: MKBV9071V
- Trietyleenitetramiini (TETA), Merck, Saksa, Lot: S6205092 503
- 6-aminokapronihappo (EACA), Sigma-Aldrich, Kiina, Lot: BCBQ1658V
- Suolahappo (HCl) 0,1 N, Merck, Saksa, Lot: HC303140
- Natriumkloridi (NaCl), Merck, Tanska, Lot: K44269504
- Natriumdivetyfosfaattimonohydraatti, Merck, Saksa, Lot: A0537846 507
- Natriumsitraatti, Merck, Saksa, Lot: 65589
- Natriumatsidi (NaN_3), Sigma-Aldrich, Saksa, Lot: BCBC9930V
- Ultrapuhdas vesi tyyppi 1, Milli-Q, Millipore.

Kaikki työssä käytetyt reagenssit olivat analyysilaatua tai lääkelaatua.

4 Työn suoritus

4.1 Validointi

Analyysimenetelmän validoinnilla voidaan osoittaa, että kyseinen menetelmä soveltuu aiottuun käyttötarkoitukseen sekä arvioida menetelmän suorituskykyä [26, s. 25]. Validoinnissa tehtävät tutkimukset perustuivat ICH:n (International Conference on Harmonisation) ohjeistukseen [27]. Validoinnissa tutkittavia parametreja olivat spesifisyys, menetelmän toistettavuus, laboratorion sisäinen uusittavuus, lineaarisuus, toteamis- ja määrittäysraja sekä menetelmän haavoittuvuus. Lisäksi tutkittiin molemmilla menetelmillä kapillaarin stabiiliutta ja näyteliuoksen säilyvyyttä sekä testattiin, kuinka moneen peräkkäiseen injektioon voidaan käyttää samoja puskuri- ja huuhteluliuospulloja CZE-menetelmässä.

Seuraavissa luvuissa on esitetty lyhyesti validoitavien parametrien teoriaa ja kuvattu validoinnin suoritus molempien menetelmien osalta. Validoinnissa käytetty monoklonaalinen vasta-aine oli Anti-h IgM 7408 SPRN-5 5,1 mg/ml (Lot: 0033195, kv. 2.2.2018, #10084, Medix Biochemica, Espoo, Suomi).

4.2 Ajo-olosuhteet

Validoinnissa käytetyt ajo-olosuhteet valittiin menetelmien ohjeiden mukaisesti [28; 29]. Yleiset ajo-olosuhteet on kerätty Taulukkoon 1. Kapillaarin kunnostus työpäivän alussa ja huuhtelu säilytystä varten tehtiin menetelmien ohjeiden mukaisesti [28; 29].

Taulukko 1. Validoinnissa käytetyt yleiset ajo-olosuhteet cIEF- ja CZE-menetelmille.

Parametri	cIEF	CZE
Lämpötila		
kapillaari	20 °C	25 °C
näytepöytä	10 °C	20 °C
Maksimivirta	20 µA	300 µA
Detektointi	UV	UV
aallonpituus	280 nm	214 nm
data rate	2 Hz	4 Hz
Apertuuri	200 µm	800 µm

Ajoissa käytettävät puskuri- ja huuhteluliuokset valmistettiin menetelmien ohjeiden mukaisesti. cIEF-menetelmässä puskuri- ja huuhteluliuospullot vaihdettiin uusiin kuuden injektion tai 24 tunnin jälkeen [28]. CZE-menetelmälle ei ollut vastaavaa ohjeistusta, joten puskuri- ja huuhteluliuosten stabiiliutta tutkittiin validoinnin yhteydessä.

cIEF-menetelmässä näytteen injektoinnin kesto oli 99,9 s ja paine 25 psi. Fokusoinnissa käytettiin 25 kV:n jännitettä ja fokusoinnin kesto oli 15 minuuttia. Kemiallisessa mobilisoinnissa käytettiin 30 kV:n jännitettä ja mobilisoinnin kesto oli 30 minuuttia. [28.] CZE-menetelmässä näytteen injektoinnin kesto oli 10,0 s ja paine 0,5 psi. Erotuksessa käytetty jännite oli 30 kV ja erotuksen kesto oli 20 minuuttia. [29.]

4.3 Näytteiden käsittely

cIEF-analyysiä varten vasta-aineelle tehtiin suolanpoisto Ultracel 10K -filtteriputkilla. Suolanpoistossa käytettiin 20 mM Tris-puskuria, jonka pH oli 8. Liuos valmistettiin pipetoimalla 4 ml 50 mM Tris-puskuria ja 6 ml vettä 15 ml:n Falcon-putkeen. Suolanpoisto tehtiin menetelmässä olevan ohjeen mukaisesti [28]. Näytettä kuitenkin sentrifugoitiin vähintään 30 minuuttia, koska näyte ei konsentroitunut ohjeessa annetussa 5 minuutissa. Vasta-aine laimennettiin lopuksi alkuperäiseen pitoisuuteen 5,1 mg/ml 20 mM Tris-puskurilla.

Suolanpoiston jälkeen vasta-aine jaettiin mikrosentrifugiputkiin 10 µl/putki ja näytteet säilytettiin -20 °C:ssa analysointiin asti. Analysoitavat cIEF-näytteet valmistettiin menetelmässä olevan ohjeen mukaisesti ja vasta-ainepitoisuus näyteliuoksessa oli 0,2 mg/ml [28]. Näytteet pipetoitiin Taulukon 2. mukaisesti.

Taulukko 2. Näytteen valmistus cIEF-analyysiin [28].

Reagenssi	Pipetoitava määrä (µl)
3 M urea-cIEF Gel	200
Pharmalyte 3–10	12
Katodinen stabilaattori	20
Anodinen stabilaattori	2
Jokaista pI-markkeria (3 kpl)	2
Näyte	10
Lopputilavuus	250

CZE-analyysiä varten vasta-aine laimennettiin vedellä pitoisuuteen 1 mg/ml. Laimennokset tehtiin analyysipäivänä.

4.4 Vasta-aineen isoformien määrittäminen

Vasta-aineen merkittävät isoformit (piikit) määritettiin elektroferogrammista. cIEF-menetelmässä isoformien pI-arvot laskettiin sisäisinä standardeina käytettyjen kaupallisten pI-markkereiden migraatioaikojen perusteella. cIEF-menetelmän validoinnissa tarkasteltiin isoformien migraatioaikoja ja pI-arvoja, kun taas CZE-menetelmässä tarkasteltiin vain migraatioaikoja.

Validointisuunnitelman mukaan tarkoitus oli tutkia myös piikkien pinta-aloja, mutta tämä jätettiin tekemättä. Eri ajojen piikkien integroiminen samoilla parametreilla osoittautui hankalaksi, ja aina ei ollut mahdollista integroida kaikkia piikkejä optimaalisesti. Piikkien integroinneista johtuen pinta-alojen hajonnat olivat suuria ja pinta-alojen tarkastelu ei antanut lisäinformaatiota validoitaviin parametreihin.

4.5 Spesifisyys

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä mitata vain tarkoitettua analyyyttiä [26, s. 27]. Menetelmän spesifisyyttä voidaan tutkia kartoittamalla määritystä häiritsevät tekijät, kuten taustamatriisin vaikutus [27, s. 4].

cIEF-menetelmän spesifisyydessä testattiin, että suolanpoistossa käytettävä puskuriliuos (20 mM Tris-puskuri pH 8) ei häiritse vasta-aineen piikkien määritystä. Näytteen tavoin käsitellystä puskuriliuoksesta ajettiin elektroferogrammi, josta tarkistettiin, että taustasta ei tule häiritseviä piikkejä samalle kohdalle kuin vasta-aineen isoformien piikit.

CZE-menetelmän spesifisyydessä testattiin, että vasta-aineen oma puskuriliuos ei häiritse piikkien määritystä. Määritystä varten tehtiin valmistajan antaman koostumuksen mukainen puskuriliuos (37 mM sitraatti; 125 mM fosfaatti; 0,9 % NaCl; 0,095 % NaN_3 , pH 6,0) [9]. Näytteen tavoin laimennetusta puskuriliuoksesta ajettiin elektroferogrammi,

josta tarkistettiin, että taustasta ei tule häiritseviä piikkejä samalle kohdalle kuin vasta-aineen isoformien piikit.

4.6 Menetelmän toistettavuus

Menetelmän toistettavuudessa tutkitaan peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaukset suoritetaan samoissa olosuhteissa samasta homogeenisesta näytteestä [27, s. 5].

Kummankin menetelmän toistettavuutta tutkittiin analysoimalla vasta-aineesta kuusi rinnakkaista näytettä, joista jokainen injektoidiin kerran. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta (SD), suhteellinen keskihajonta (RSD) ja 95 %:n luottamusväli.

4.7 Laboratorion sisäinen uusittavuus

Laboratorion sisäisellä uusittavuudella osoitetaan menetelmän olevan toistettava muuttuneissa olosuhteissa, esim. eri analyysipäivinä, kun analysoidaan samaa homogeenista näytettä [27, s. 5].

Kummankin menetelmän uusittavuutta tutkittiin kolmena eri päivänä. Jokaisena päivänä analysoitiin vasta-aineesta yksi näyte, joka injektoidiin 10 kertaa. Tuloksista laskettiin keskiarvo, SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli. Eri päivien tuloksia vertailtiin keskenään varianssianalyysin (ANOVA) ja t-testin avulla.

4.8 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuudella tarkoitetaan sen kykyä antaa lineaarinen korrelaatio vasteelle ja analyytin pitoisuudelle tietyllä pitoisuusalueella [26, s. 28].

cIEF-menetelmän lineaarisuutta tutkittiin valmistamalla vasta-aineesta Taulukon 3. mukaiset laimennokset veteen. Jokaisesta pitoisuudesta valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä ja jokainen näyte injektoidiin kerran. Pitoisuudet vaihtelivat välillä 20–98 % menetelmässä käytetystä pitoisuudesta.

Taulukko 3. cIEF-menetelmän lineaarisuuden tutkimiseen valmistetut laimennokset. Pitoisuus 5 mg/ml laimennettiin näytteestä (5,1 mg/ml) ja loput laimennokset tehtiin pitoisuudesta 5 mg/ml. Laimennosten valmistamisessa käytettiin vettä.

Pitoisuus	Kantaliuos	Vesi	Pitoisuus näyteliuoksessa	Taso
1 mg/ml	8 µl	32 µl	0,04 mg/ml	20 %
2 mg/ml	12 µl	18 µl	0,08 mg/ml	40 %
3 mg/ml	18 µl	12 µl	0,12 mg/ml	60 %
4 mg/ml	24 µl	6 µl	0,16 mg/ml	80 %
5 mg/ml	93 µl	2 µl	0,2 mg/ml	98 %

CZE-menetelmän lineaarisuutta tutkittiin valmistamalla vasta-aineesta Taulukon 4. mukaiset laimennokset veteen. Jokaisesta pitoisuudesta valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä ja jokainen näyte injektoidiin kerran. Pitoisuudet vaihtelivat välillä 30–200 % menetelmässä käytetystä pitoisuudesta.

Taulukko 4. CZE-menetelmän lineaarisuuden tutkimiseen valmistetut laimennokset. Pitoisuus 2 mg/ml laimennettiin näytteestä (5,1 mg/ml) ja loput laimennokset tehtiin pitoisuudesta 2 mg/ml. Laimennosten valmistamisessa käytettiin vettä.

Pitoisuus	Kantaliuos	Vesi	Taso
0,3 mg/ml	15,8 µl	89,2 µl	30 %
0,5 mg/ml	22,5 µl	67,5 µl	50 %
0,8 mg/ml	36 µl	54 µl	80 %
1 mg/ml	45 µl	45 µl	100 %
2 mg/ml	84,3 µl	130,7 µl	200 %

Tuloksista piirrettiin vasta-aineen jokaiselle merkittävälle isoformille lineaarisuuskuvaa ja pitoisuuden suhteena piikin pinta-alaan sekä määritettiin korrelaatiokertoimet.

4.9 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisraja on analyysin pienin pitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti. Määrittäysraja on kvantitatiivisen mittauksen pienin pitoisuus, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. Määrittäysraja tutkitaan aina analyysin taustamatriisissa. [26, s. 29–30.]

Tässä työssä menetelmän toteamis- ja määrittäysrajalla pyrittiin selvittämään pienin vasta-ainepitoisuus, jolla voidaan luotettavasti tutkia varausten heterogeenisyyttä. Kummankin menetelmän toteamisrajaa tutkittiin tekemällä vasta-aineesta kolme laimennosta, jotka olivat lineaarisuuden tutkimiseen käytettyjä liuoksia laimeampia (Taulukko 5.).

Laimennosten valmistamiseen käytettiin lineaarisuuden liuoksia 1 mg/ml (cIEF) ja 0,3 mg/ml (CZE). Kaikki laimennokset tehtiin veteen.

Taulukko 5. cIEF- ja CZE-menetelmien toteamisrajojen tutkimiseen valmistetut laimennokset. Kantaliuokset 1 mg/ml ja 0,3 mg/ml valmistettiin lineaarisuuden tutkimisen yhteydessä.

cIEF			CZE		
Pitoisuus	Kantaliuos	Vesi	Pitoisuus	Kantaliuos	Vesi
0,5 mg/ml	1 mg/ml 7,5 µl	7,5 µl	0,1 mg/ml	0,3 mg/ml 10 µl	20 µl
0,1 mg/ml	0,5 mg/ml 3 µl	12 µl	0,01 mg/ml	0,3 mg/ml 1,2 µl	33,8 µl
0,01 mg/ml	0,1 mg/ml 1 µl	9 µl	0,001 mg/ml	0,01 mg/ml 3 µl	27 µl

Tuloksista tarkasteltiin piikkien erottumista taustasta ja arvioitiin pitoisuutta, jolla kaikkien merkittävien isoformien piikit ovat luotettavasti todettavissa. Määritysrajan tutkimiseen käytettiin lineaarisuuden tuloksia.

4.10 Haavoittuvuus

Menetelmän haavoittuvuutta tutkimalla pyritään selvittämään, miten analyysin suorituksessa tapahtuvat pienet muutokset vaikuttavat menetelmän antamiin tuloksiin [26, s. 33]. Haavoittuvuuden tutkimisella saadaan tietoa menetelmän luotettavuudesta normaalissa käytössä [27, s. 5].

cIEF-menetelmän haavoittuvuudessa tutkittiin suolanpoiston vaikutusta tuloksiin. Suolanpoiston vaikutuksen tutkimiseksi vasta-aineelle tehtiin suolanpoisto käyttämällä eri sentrifugointiaikoja.

CZE-menetelmän haavoittuvuudessa tutkittiin ajopuskurin valmistamisen vaikutusta tuloksiin. Ajopuskurin vaikutuksen selvittämiseksi valmistettiin kaksi erillistä EA-CA/TETA-liuosta menetelmän ohjeen mukaisella koostumuksella ja näistä liuoksista valmistettiin kaksi sarjaa ajossa käytettäviä puskureita [29]. Kummankin ajopuskurin valmistamisessa käytettiin samaa 1 %:sta HPMC-liuosta.

4.11 Kapillaarin stabiilius

Kapillaarin stabiiliutta tutkimalla pyrittiin selvittämään, kuinka monta peräkkäistä injektiota samalla kapillaarilla voidaan tehdä, niin että piikkien resoluutiot ja migraatioajat pysyvät hyväksyttävänä.

Validointisuunnitelmasta poiketen kapillaarin stabiiliuden selvittämistä varten ei tehty erillisiä määrittäyksiä. Kapillaarin stabiiliutta arvioitiin samalla kapillaarilla tehtyjen peräkkäisten injektioiden elektroferogrammien perusteella.

4.12 Näyteliuosten säilyvyys

Tässä työssä haluttiin myös selvittää, kuinka hyvin valmistetut näyteliuokset säilyvät CE-laitteen näytepöydällä ja jääkaapissa. Vuorokauden säilyvyys laitteessa takaisi turvallisen analysoinnin yön yli ja jääkaappisäilytys mahdollisuuden valmistaa näytteet jo analyysiä edeltävänä päivänä.

Näyteliuoksen säilyvyyttä CE-laitteen näytepöydällä tutkittiin kummallakin menetelmällä. Säilyvyyttä tutkittiin tekemällä kolme injektiota samasta näytteestä kahtena peräkkäisenä päivänä. Näytettä ei poistettu laitteesta määrittysten välissä, ja määrittyskertojen väli oli vähintään 24 tuntia.

Näyteliuoksen säilyvyyttä jääkaapissa tutkittiin vain CZE-menetelmällä. Säilyvyyttä tutkittiin tekemällä kolme injektiota samasta näytteestä kahtena peräkkäisenä päivänä. Näytettä säilytettiin määrittyskertojen välissä jääkaapissa (+2...+8 °C), ja määrittyskertojen väli oli vähintään 24 tuntia.

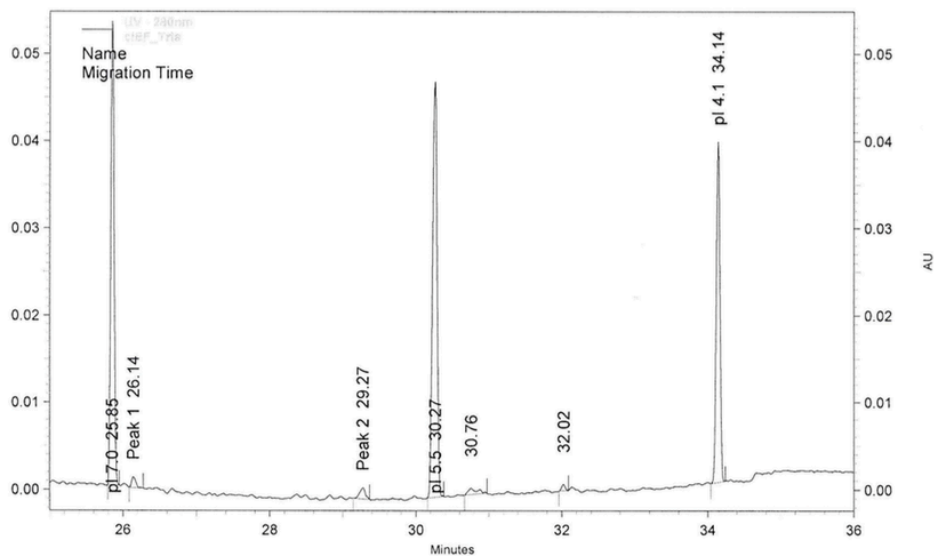
4.13 Puskuri- ja huuhteluliuosten stabiilius

CZE-analysissä käytettävien puskuri- ja huuhteluliuosten stabiiliutta arvioitiin kapillaarin stabiiliuden yhteydessä. Tarkoituksena oli selvittää liuosten erotuskapasiteettia ja säilyvyyttä laitteessa. Tulosten perusteella arvioitiin, kuinka moneen peräkkäiseen injektioon voidaan käyttää samoja puskuri- ja huuhteluliuospulloja.

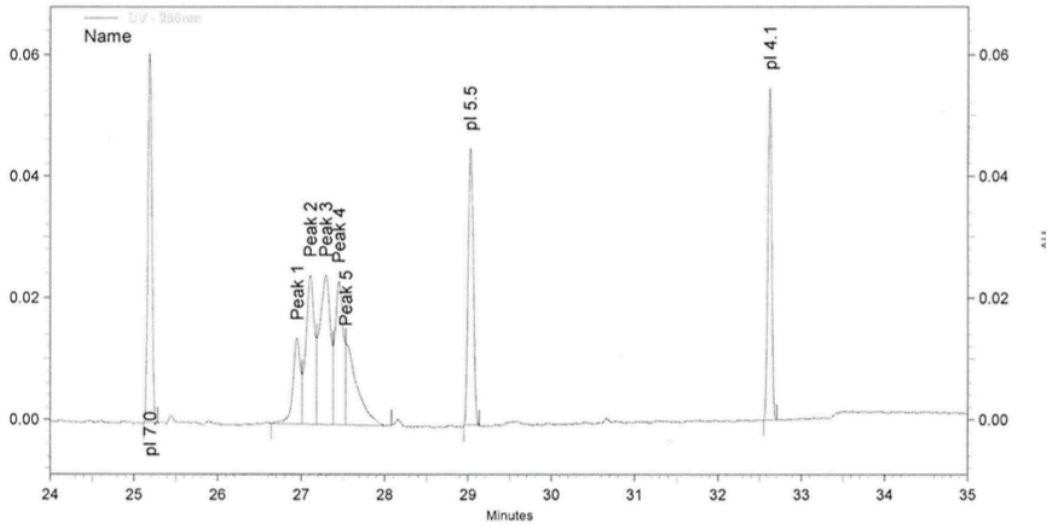
5 Tulokset ja tulosten tarkastelu

5.1 Spesifisyys

Menetelmien spesifisyyttä tutkittiin ajamalla elektroferogrammit vasta-aineen taustamatriisista. cIEF-menetelmässä taustamatriisina oli suolanpoistossa käytetty 20 mM Tris-puskuri. Tris-puskurin elektroferogrammissa havaittiin kaksi pientä piikkiä, joiden migraatioajat erosivat selkeästi vasta-aineen piikkien migraatioajoista (Kuva 7. ja Kuva 8.).

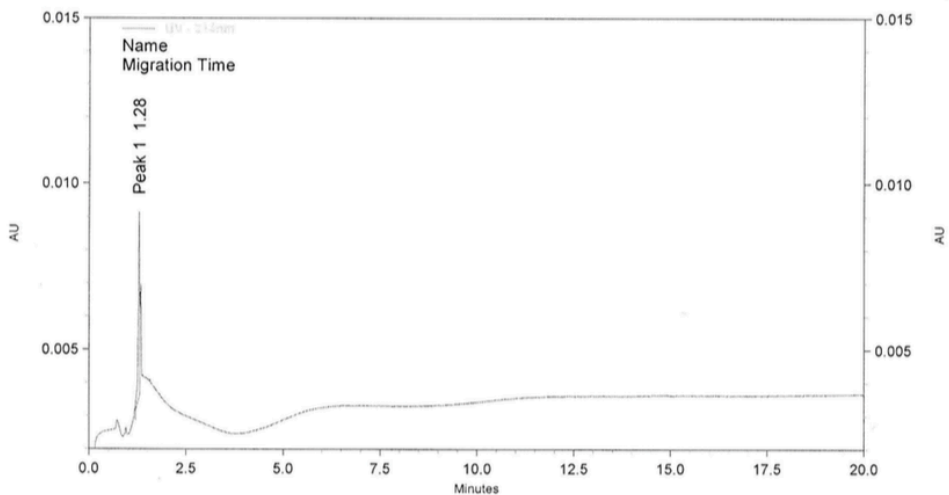


Kuva 7. Suolanpoistossa käytetyn 20 mM Tris-puskurin cIEF-määrityksen elektroferogrammi. Piikit 1 ja 2 ovat puskurin aiheuttamia ja isommat piikit ovat pI-markkereita (pI 7,0; 5,5 ja 4,1).

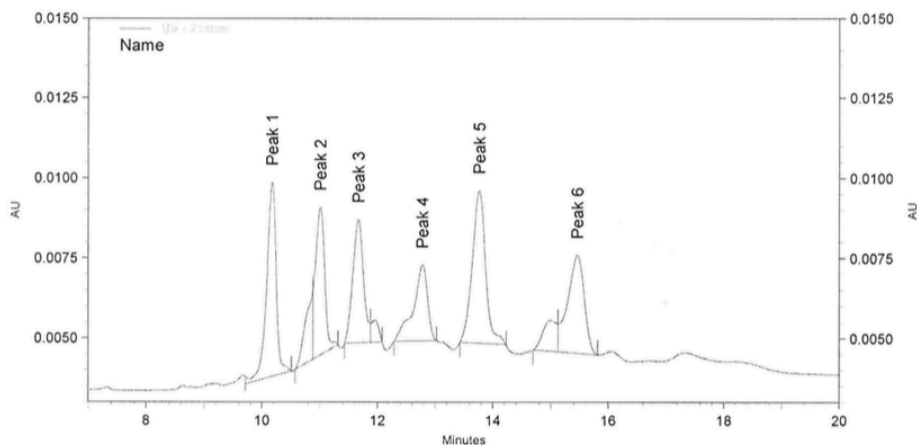


Kuva 8. Vasta-aineen (0,2 mg/ml) cIEF-määrityksen elektroferogrammi.

CZE-menetelmässä taustamatriisina oli vasta-aineen oma puskuriliuos. Puskuriliuoksen ei todettu aiheuttavan elektroferogrammiin määrittystä häiritseviä piikkejä (Kuva 9. ja Kuva 10.).



Kuva 9. Vasta-aineen oman puskurin (37 mM sitraatti; 125 mM fosfaatti; 0,9 % NaCl; 0,095 % NaN_3 , pH 6,0) CZE-määrityksen elektroferogrammi. Piikki 1 on puskurin aiheuttama.



Kuva 10. Vasta-aineen (1 mg/ml) CZE-määrityksen elektroferogrammi.

Menetelmien todettiin olevan spesifisiä tutkittavalle vasta-aineelle, koska taustamatriisi ei häirinnyt isoformien määrittystä.

5.2 Menetelmän toistettavuus

Menetelmien toistettavuutta tutkittiin kuudesta rinnakkaisesta näytteestä. Määrityksistä laskettiin keskiarvo, SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli jokaiselle isoformille (Taulukko 6. ja Taulukko 7.). Luottamusväli laskettiin kaavalla

$$\text{Luottamusväli} = x \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}, \quad (1)$$

jossa x on mittausten keskiarvo, t on t -arvo, s on keskihajonta ja n on mittausten lukumäärä ($n = 6$; $t = 2,571$).

Taulukko 6. cIEF-määrityksen toistettavuuden tulokset: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD (%) ja 95 %:n luottamusväli.

Migraatioaika (min)	Keskiarvo (n = 6)	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	27,23	0,16	0,57	27,23 ± 0,17
Piikki 2	27,44	0,08	0,30	27,44 ± 0,09
Piikki 3	27,68	0,08	0,28	27,68 ± 0,09
Piikki 4	27,86	0,08	0,27	27,86 ± 0,09
Piikki 5	27,93	0,09	0,31	27,93 ± 0,10
pl-arvo	Keskiarvo (n = 6)	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	6,33	0,04	0,64	6,33 ± 0,05
Piikki 2	6,26	0,02	0,27	6,26 ± 0,02
Piikki 3	6,17	0,02	0,22	6,17 ± 0,02
Piikki 4	6,11	0,02	0,23	6,11 ± 0,02
Piikki 5	6,08	0,02	0,27	6,08 ± 0,02

cIEF-menetelmässä isoformien migraatioaikojen RSD:t olivat $\leq 0,57$ % ja pl-arvojen RSD:t olivat $\leq 0,64$ %. Piikin 1 resoluutio ei ollut optimaalinen kaikissa erotuksissa, mikä vaikeutti piikin integroimista. Integroinnit saattoivat vaikuttaa saatuihin migraatioaikoihin, ja tämän takia RSD:t olivat suurempia kuin muilla piikeillä. Tarkasteltaessa yksittäisten tulosten osumista 95 %:n luottamusvälille huomattiin, että vain yhdessä näytteessä ei ollut yhtään poikkeavaa tulosta. Tulosten hajonnat varsinkin pl-arvoissa olivat pieniä, minkä takia myös luottamusvälit olivat hyvin kapeita. Tämä saattaa selittää tulosten poikkeamisen luottamusväliltä. Kaikkien isoformien pl-arvot osuivat valmistajan ilmoittamalle välille 6,4–5,5 [9].

Taulukko 7. CZE-määrityksen toistettavuuden tulokset: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD (%) ja 95 %:n luottamusväli.

Migraatioaika (min)	Keskiarvo (n = 6)	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	10,31	0,01	0,10	10,31 ± 0,02
Piikki 2	11,14	0,02	0,15	11,14 ± 0,02
Piikki 3	11,82	0,02	0,16	11,82 ± 0,03
Piikki 4	12,94	0,04	0,28	12,94 ± 0,04
Piikki 5	13,97	0,04	0,29	13,97 ± 0,05
Piikki 6	15,87	0,04	0,25	15,87 ± 0,05

CZE-menetelmässä piikkien migraatioaikojen RSD:t olivat $\leq 0,29$ %. Tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että kolmen ensimmäisen piikin RSD:t olivat pienempiä kuin myöhemmin tulevien kolmen piikin. Tämä saattoi johtua myöhemmin detektorille tulevien isoformien vuorovaikutuksista kapillaarin seinämän kanssa. Elektroferogrammeista voitiin todeta, että kolme viimeistä piikkiä olivat myös hieman leveämpiä ensimmäisiin piikkeihin verrattuna. Tämä saattoi johtua proteiinien adsorboitumisesta kapillaarin seinämään. Luottamusvälitarkastelussa todettiin, että vain ensimmäisenä analysoidussa näytteessä oli 95 %:n luottamusväliä poikkeavia tuloksia.

Molemmilla menetelmillä rinnakkaisten näytteiden RSD:t olivat pieniä, minkä perusteella menetelmät ovat toistettavia. CZE:llä migraatioaikojen toistettavuus oli kuitenkin parempi kuin cIEF:llä.

5.3 Laboratorion sisäinen uusittavuus

Menetelmien laboratorion sisäistä uusittavuutta tutkittiin analysoimalla vasta-aineesta yksi näyte kolmena eri päivänä. Jokaisesta näytteestä tehtiin 10 injektiota. Tuloksista laskettiin keskiarvo, SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli jokaiselle isoformille. Tulokset laskettiin sekä yksittäisten päivien määrityksille (Liite 1. ja Liite 2.) että kaikille kolmelle määrityskerralle (Taulukko 8. ja Taulukko 9.). Luottamusväli laskettiin kaavalla 1 ($n = 3$; $t = 4,303$).

Taulukko 8. cIEF-määrityksen laboratorion sisäisen uusittavuuden tulokset kolmelta analyysipäivältä. Eri analyysipäivien tulokset on ilmoitettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

Migraatio- aika (min)	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
Päivä 1.	27,55	27,73	27,92	28,09	28,18
Päivä 2.	28,13	28,32	28,52	28,69	28,76
Päivä 3.	27,79	28,02	28,27	28,46	28,53
Keskiarvo	27,83	28,02	28,23	28,42	28,49
SD	0,29	0,29	0,30	0,30	0,29
RSD (%)	1,05	1,05	1,07	1,07	1,03
95 %:n luot- tamusväli	27,83 ± 0,73	28,02 ± 0,73	28,23 ± 0,75	28,42 ± 0,76	28,49 ± 0,74
pl-arvo	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
Päivä 1.	6,32	6,25	6,18	6,11	6,08
Päivä 2.	6,32	6,25	6,18	6,11	6,09
Päivä 3.	6,34	6,27	6,19	6,12	6,10
Keskiarvo	6,33	6,25	6,18	6,11	6,09
SD	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
RSD (%)	0,19	0,14	0,07	0,08	0,15
95 %:n luot- tamusväli	6,33 ± 0,04	6,25 ± 0,03	6,18 ± 0,02	6,11 ± 0,02	6,09 ± 0,03

cIEF-määrityksessä isoformien migraatioaikojen RSD:t vaihtelivat jonkin verran eri päivinä tehdyissä analyyseissä, kuitenkin jokaisena päivänä RSD:t olivat $\leq 1,12$ %. pl-arvojen RSD:t olivat kaikkina analyysipäivinä $\leq 0,04$ % ja kaikki pl-arvot osuivat valmistajan ilmoittamalle välille 6,4–5,5 [9].

cIEF:n migraatioaikojen luottamusvälitarkastelussa havaittiin, että yksittäisten päivien kaikki tulokset eivät osuneet 95 %:n luottamusvälille. Tulosten hajonnat olivat pieniä, jolloin myös luottamusvälit olivat kapeita. Kolmen päivän määrityksistä laskettu luottamusväli oli laajempi ja neljää mittaustulosta lukuun ottamatta tulokset osuivat 95 %:n luottamusvälille. Poikkeavat mittaustulokset olivat kaikki samasta injektioista. pl-arvojen luottamusvälitarkastelussakaan yksittäisten päivien kaikki tulokset eivät osuneet 95 %:n luottamusvälille. pl-arvojen hajonnat olivat pienempiä kuin migraatioaikojen ja luottamusvälit olivat erittäin kapeita. Myös kolmen päivän määrityksistä lasketut luottamusvälit olivat erittäin kapeita ja seitsemän mittaustulosta ei osunut 95 %:n luottamusvälille.

cIEF:n kolmen määrittyskerran tuloksia vertailtiin keskenään ANOVA:lla (yksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso) ja t-testillä (kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso). Käytettävä t-testi valittiin tutkimalla ensin F-testillä, erosivatko eri ryhmien varianssit tilastollisesti merkitsevästi. Migraatioaikojen vertailussa ANOVA:lla kaikkien määrittyskertojen tulokset erosivat tilastollisesti erittäin merkitsevästi ($P < 0,001$). Määrittyskertoja vertailtiin vielä pareittain t-testin avulla, ja kaikki tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi ($P < 0,05$). pl-arvojen vertailussa ANOVA:lla piikkien 1, 2 ja 5 tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi ($P < 0,01$; $P < 0,001$ ja $P < 0,01$). Määrittyskertojen vertailu pareittain t-testillä osoitti, että ensimmäisen ja toisen määrittyskerran pl-arvot eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi millään isoformilla.

Taulukko 9. CZE-määrittymisen laboratorion sisäisen uusittavuuden tulokset kolmelta analyysipäivältä. Eri analyysipäivien tulokset on ilmoitettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

Migraatioaika (min)	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Päivä 1.	10,18	11,00	11,66	12,76	13,75	15,46
Päivä 2.	10,21	11,04	11,71	12,83	13,85	15,67
Päivä 3.	10,36	11,21	11,89	13,02	14,06	15,96
Keskiarvo	10,25	11,08	11,75	12,87	13,89	15,69
SD	0,10	0,11	0,12	0,14	0,16	0,25
RSD (%)	0,94	0,99	1,01	1,05	1,15	1,62
95 %:n luottamusväli	10,25 ± 0,25	11,08 ± 0,28	11,75 ± 0,30	12,87 ± 0,34	13,89 ± 0,40	15,69 ± 0,64

Myös CZE-määrittymässä isoformien migraatioaikojen RSD:t vaihtelivat jonkin verran päiväkohtaisesti. Kaikkina määrittyskertoina RSD:t olivat $\leq 1,43$ %. Migraatioaikojen luottamusvälitarkastelussa havaittiin, että yksittäisten päivien määrittymässä suurin osa tuloksista ei osunut 95 %:n luottamusvälille. Tulosten hajonnat olivat pieniä, jolloin myös luottamusvälit olivat kapeita. Kaikki tulokset osuivat kuitenkin kolmen päivän määrittymästä lasketulle 95 %:n luottamusvälille.

CZE:n kolmen määrittyskerran tuloksia vertailtiin keskenään ANOVA:lla (yksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso) ja t-testillä (kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso). Käytettävä t-testi valittiin tutkimalla ensin F-testillä, erosivatko eri ryhmien varianssit tilastollisesti merkitsevästi. Migraatioaikojen vertailussa ANOVA:lla kaikkien määrittyskertojen tulokset erosivat tilastollisesti erittäin merkitsevästi ($P < 0,001$). Määrittyskertojen vertai-

lu pareittain t-testillä osoitti, että ensimmäisen ja toisen määrittäykerran tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi vain piikillä 6 ($P < 0,05$).

Molemmissa menetelmissä analyysit tehtiin samalla kapillaarilla eli piikkien migraatioajoissa esiintyy myös kapillaarista riippumatonta vaihtelua. Migraatioaikojen RSD:t eivät muuttuneet systemaattisesti, eli kapillaarin käyttöillä ei todennäköisesti ollut vaikutusta tuloksiin. Jos käytettävissä olisi ollut useampia kapillaareja, olisi voitu testata vaikuttaako eri kapillaarin käyttäminen tuloksiin.

cIEF-menetelmän todettiin olevan uusittava, kun käytetään pl-markkereita. Vaikka migraatioajat erosivat tilastollisesti merkitsevästi, isoformeille lasketut pl-arvot olivat toistettavia. CZE-menetelmässä migraatioajoissa oli merkittävää vaihtelua, mutta RSD:t olivat pieniä. CZE-menetelmän toistettavuuden arvioiminen oli hankalaa, koska migraatioaikojen vaihtelulle asetettuja vaatimuksia ei ollut tiedossa.

5.4 Lineaarisuus

Vasta-aineen antaman vasteen lineaarisuutta tutkittiin molemmilla menetelmillä analysoimalla viisi eri pitoisuutta. Tuloksista piirrettiin lineaarisuuskuvaajat vasta-aineen kaikille isoformeille (Liite 3. ja Liite 4.). Korrelaatiokertoimet laskettiin lineaarisuuskuvaajien suorien selitysteiden perusteella kaavalla

$$r = \sqrt{R^2} , \quad (2)$$

jossa r on korrelaatiokerroin ja R^2 on suoran selityste. Kaikkien lineaarisuuskuvaajien korrelaatiokertoimet olivat $> 0,99$ (Taulukko 10. ja Taulukko 11.).

Taulukko 10. cIEF-menetelmälle lasketut korrelaatiokertoimet.

Piikki	R^2	r
1	0,98414	0,99204
2	0,99606	0,99803
3	0,99649	0,99824
4	0,98735	0,99365
5	0,98050	0,99020

Taulukko 11. CZE-menetelmälle lasketut korrelaatiokertoimet.

Piikki	R ²	r
1	0,99733	0,99866
2	0,99877	0,99938
3	0,99714	0,99857
4	0,99878	0,99939
5	0,99658	0,99829
6	0,98753	0,99375

Koska kyseessä oli kvalitatiivinen analyysi, suorien lineaarisuutta ei tutkittu tarkemmin. Korrelaatiokertoimien perusteella voitiin todeta, että vasta-aine käyttäytyi lineaarisesti tutkituilla pitoisuusalueilla.

5.5 Toteamis- ja määrittäysraja

Validointisuunnitelman mukaan menetelmän toteamisrajaa oli tarkoitus arvioida silmä-määräisesti hyvin laimeista vasta-aineliuoksista. Valmistetut liuokset olivat kuitenkin liian laimeita ja piikkien integroiminen ei onnistunut. Tämän takia sekä toteamis- että määrittäysrajan tutkimiseen käytettiin lineaarisuuden tuloksia.

Toteamis- ja määrittäysrajat laskettiin erikseen vasta-aineen jokaiselle isoformille lineaarisuuskuvaajien suorien y-akselin leikkauspisteen keskihajonnan avulla kaavoilla

$$Toteamisraja = \frac{3,3 \times \sigma}{g_A} \quad \text{ja} \quad (3)$$

$$Määrittäysraja = \frac{10 \times \sigma}{g_A}, \quad (4)$$

jossa σ on suoran kulmakerroin ja g_A on y-akselin leikkauspisteen keskihajonta [27, s. 12]. Y-akselin leikkauspisteiden keskihajonnat laskettiin Microsoft Excelin LINEST-toiminnon avulla. Kummankin menetelmän lasketut toteamis- ja määrittäysrajat on esitetty Taulukossa 12.

Taulukko 12. Y-akselin leikkauspisteen keskihajonnan avulla lasketut toteamis- ja määritysrajat. * cIEF-menetelmällä saadaan erotettua vasta-aineelle vain viisi isoformia.

Piikki	Toteamisraja (mg/ml)		Määritysraja (mg/ml)	
	cIEF	CZE	cIEF	CZE
1	0,80	0,11	2,43	0,33
2	0,40	0,07	1,20	0,22
3	0,38	0,11	1,14	0,34
4	0,30	0,07	0,91	0,22
5	0,89	0,12	2,70	0,37
6	*	0,23	*	0,71

Eri isoformeille lasketuista toteamis- ja määritysrajoista valittiin koko menetelmän rajaksi suurin pitoisuusarvo. Tulosten perusteella toteamisrajoiksi saatiin cIEF-menetelmälle 0,9 mg/ml ja CZE-menetelmälle 0,2 mg/ml. Määritysrajoiksi saatiin cIEF-menetelmälle 2,7 mg/ml ja CZE-menetelmälle 0,7 mg/ml.

5.6 Haavoittuvuus

cIEF-menetelmän haavoittuvuutta tutkittiin tekemällä näytteelle suolanpoistot käyttämällä eri sentrifugointiaikoja. Kummastakin näytteestä oli tarkoitus tehdä kolme injektioita, mutta kapillaarin katkeamisen takia molemmista suolanpoistoista saatiin vain yhden injektion tulokset ja suolanpoiston vaikutusta ei saatu validoitua. Lisäksi 1. suolanpoiston näytteessä yhden pl-markkerin piikki hävisi ja pl-arvot jouduttiin laskemaan kahden pisteen standardisuoralla. Eri suolanpoistojen migraatioajat ja pl-arvot erosivat toisistaan n. 2 %, mutta eron merkitsevyyden selvittämiseksi olisi tarvittu lisää määriytyksiä (Taulukko 13.).

Taulukko 13. cIEF-menetelmän haavoittuvuuden tulokset: migraatioaika (min) ja tulosten ero (%).

Migraatioaika (min)					
Suolanpoisto	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
1	30,375	30,567	30,775	31,000	31,108
2	29,750	29,933	30,133	30,333	30,450
Ero (%)	2,06	2,07	2,09	2,15	2,12
pI-arvo					
Suolanpoisto	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
1	6,184	6,120	6,051	5,976	5,940
2	6,312	6,247	6,177	6,106	6,065
Ero (%)	2,03	2,04	2,04	2,13	2,06

CZE-menetelmän haavoittuvuutta tutkittiin tekemällä yhdestä näytteestä kolme injektioita kahdella eri puskurisarjalla. Määritysten tuloksia vertailtiin t-testillä (kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso) sekä laskemalla keskiarvojen ero (%) (Taulukko 14.). Kaikkien isoformien tulokset erosivat tilastollisesti erittäin merkitsevästi 95 %:n luottamustasolla ($P < 0,001$). Elektroferogrammeja tarkasteltaessa todettiin, että eri puskureilla ei kuitenkaan ollut huomattavaa vaikutusta piikkien muotoihin.

Taulukko 14. CZE-menetelmän haavoittuvuuden tulokset. Eri puskureiden tulokset on ilmoitettu kolmen injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD, keskiarvojen ero (%) ja P-arvo (95 %:n luottamustaso).

Migraatioaika (min)						
Puskuri 1	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Keskiarvo	10,92	11,82	12,54	13,74	14,85	16,78
SD	0,02	0,04	0,04	0,06	0,07	0,11
RSD (%)	0,18	0,30	0,32	0,44	0,44	0,66
Puskuri 2	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Keskiarvo	10,58	11,41	12,10	13,22	14,26	16,07
SD	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,08
RSD (%)	0,14	0,18	0,21	0,27	0,28	0,52
Keskiarvojen ero (%)	3,08	3,44	3,51	3,83	3,93	4,27
P-arvo	0,00002	0,00006	0,00009	0,00020	0,00019	0,00086

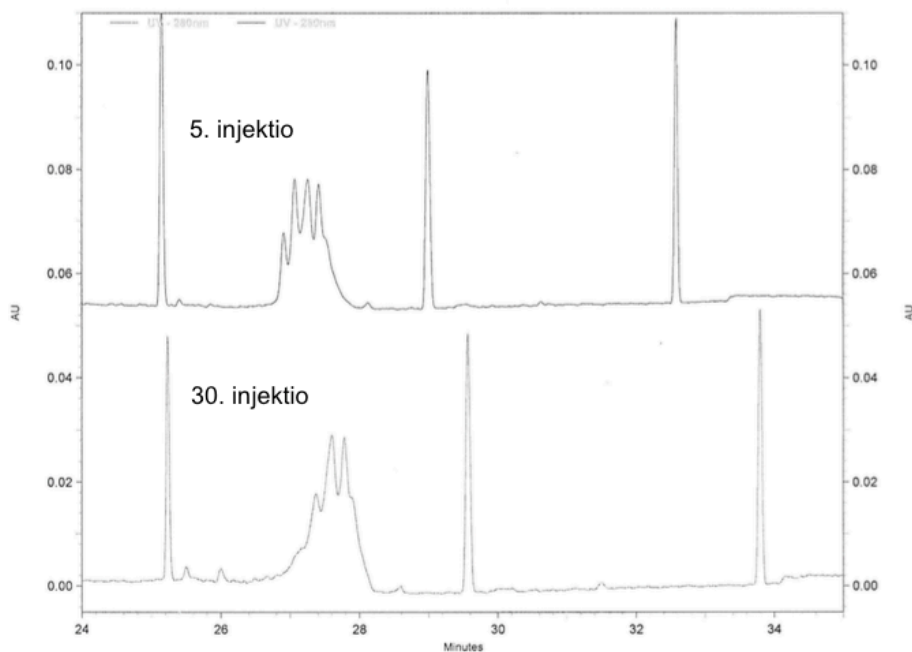
CZE-menetelmän todettiin olevan herkkä muutoksille ajopuskurin koostumuksessa, joten puskureiden valmistamiseen tulee kiinnittää erityistä huomiota. Tässä työssä ei ehditty tutkia menetelmien haavoittuvuutta muiden parametrien osalta. Molemmilla me-

netelmillä voisi tutkia vielä esim. kapillaarin ja näytepöydän lämpötilojen ja erotuksessa käytettävän jännitteen muutosten vaikutusta tuloksiin.

5.7 Kapillaarin stabiilius

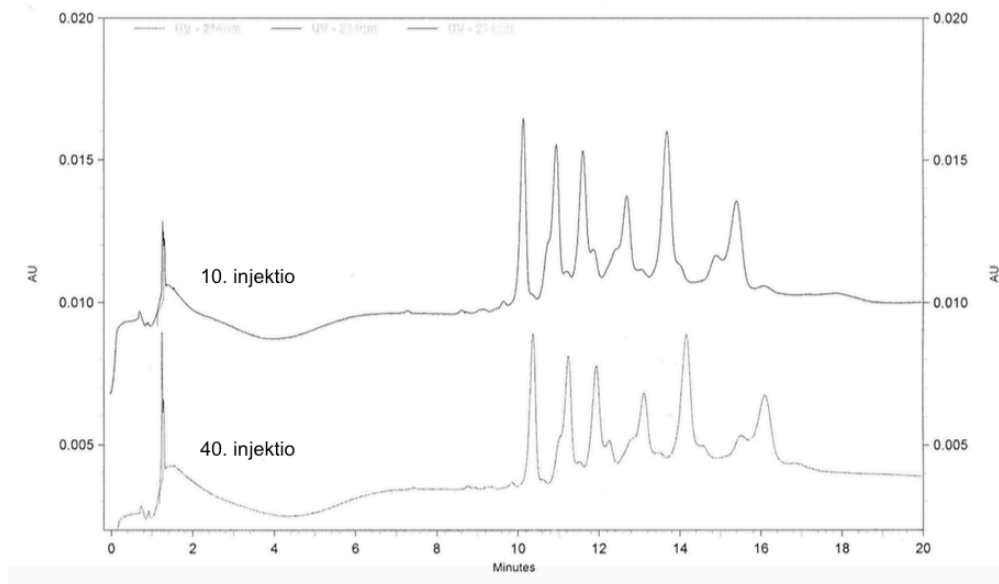
Kapillaarin stabiiliutta kummassakin menetelmässä arvioitiin samalla kapillaarilla tehtyjen peräkkäisten injektioiden elektroferogrammien perusteella.

Kapillaarin erotuskyvyn todettiin huononevan melko nopeasti cIEF-analyysissä (Kuva 11.). Jo 30 injektion jälkeen vasta-aineen piikkien muodot olivat muuttuneet huomattavasti verrattuna ensimmäisiin injektioihin. Tämä vaikeutti erityisesti ensimmäisen ja viimeisen piikin integroimista, mikä saattoi vaikuttaa saatuihin migraatioaikoihin. Kapillaarin erotuskyvyn nopea huononeminen saattoi johtua näytteen suolanpoistosta. Tässä työssä käytettyjen 10K-filtteriputkien läpäisevyys oli liian pieni tutkittavalle molekyylille ja näytteen konsentroiminen vaati pitkiä sentrifugointeja. Samalla näytteeseen saattoi myös jäädä liikaa suoloja. Käyttämällä vastaavia 100K-filtteriputkia olisi voitu saada parempia tuloksia.



Kuva 11. Vasta-aineen (0,2 mg/ml) elektroferogrammit 5. injektioista ja 30. injektioista samalla kapillaarilla.

CZE-analyysissä kapillaarin erotuskyvyssä ei havaittu merkittävää muutosta tehtyjen injektioiden määrän kasvaessa (Kuva 12.). Kapillaarin todettiin kuitenkin katkeavan herkästi pidemmissä ajoissa.



Kuva 12. Vasta-aineen (1 mg/ml) elektroferogrammit 10. injektioista ja 40. injektioista samalla kapillaarilla.

Näiden tulosten perusteella cIEF-analyysissä kapillaarin käytettävyyttä rajoittavana tekijänä on kapillaarin erotuskyky ja CZE-analyysissä kapillaarin kestävyys. CZE-analyysissä kapillaarin katkeaminen oli todennäköisesti sattumaa ja kapillaarin todellisen kestävyuden arvioimiseksi tarvittaisiin lisää määrittämiä. cIEF-analyysissä näytteenkäsittelyn optimoiminen saattaisi parantaa kapillaarin käyttöikä.

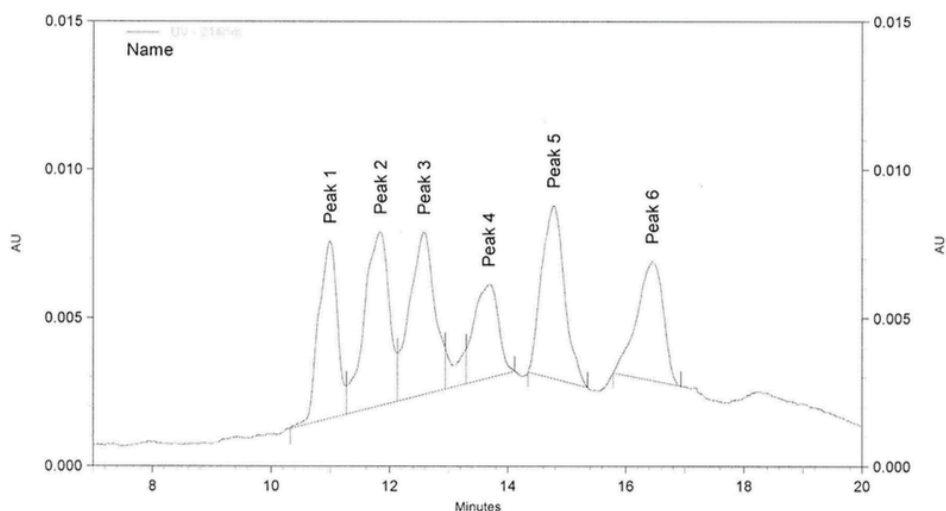
5.8 Näyteliuosten säilyvyys

Tässä työssä haluttiin selvittää, kuinka hyvin valmistetut näyteliuokset säilyvät CE-laitteen näytepöydällä (huoneenlämpö) tai jääkaapissa (+2...+8 °C).

cIEF-menetelmän näyteliuoksen säilyvyyttä CE-laitteen näytepöydällä tutkittiin tekemällä kolme injektioita samasta näytteestä kahtena peräkkäisenä päivänä. Näytettä ei poistettu CE-laitteesta määrittysten välissä. Määrittysten tulokset on koottu Liitteeseen 5. Määrittyskertojen tuloksia verrattiin t-testin avulla (kaksisuuntainen, 95 %:n luottamus-

taso). Migraatioajoista piikin 3 tulokset ja pI-arvoista piikin 1 tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi 95 %:n luottamustasolla ($P < 0,05$).

CZE-menetelmän näyteliuoksen säilyvyyttä tutkittiin tekemällä kahdesta näytteestä kolme injeksiota kahtena peräkkäisenä päivänä. Toista näytettä säilytettiin analyysien välissä CE-laitteessa ja toista jääkaapissa. Määritysten tulokset on koottu Liitteeseen 6. Määrittyskertojen tuloksia verrattiin t-testin avulla (kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso). Huoneenlämpösäilytyksessä piikkien 1 ja 6 tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi 95 %:n luottamustasolla ($P < 0,05$ ja $P < 0,001$). Elektroferogrammeja tarkasteltaessa huomattiin, että piikkien muodot olivat muuttuneet huomattavasti ensimmäiseen määrittymiseen verrattuna (Kuva 13.). Jääkaappisäilytyksessä kaikkien piikkien tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi 95 %:n luottamustasolla ($P < 0,05$). Elektroferogrammeja tarkasteltaessa ei kuitenkaan todettu huomattavaa muutosta piikkien muodoissa.



Kuva 13. Vasta-aineen (1 mg/ml) elektroferogrammi vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen.

Näiden tulosten perusteella cIEF:n näyteliuosta voidaan säilyttää vuorokauden ajan CE-laitteessa ilman, että isoformien pI-arvot muuttuisivat merkittävästi. CZE:n näyteliuos tulisi kuitenkin valmistaa mahdollisimman lähellä analysointia ja ajot suunnitella niin, että viimeisenä analysoitavat näytteet eivät olisi liian pitkään laitteessa.

5.9 Puskuri- ja huuhteluliuosten stabiilius

CZE-analyysissä käytettävien puskuri- ja huuhteluliuosten stabiiliutta tutkittiin kapillaarin stabiiliuden yhteydessä. Tarkoituksena oli selvittää liuosten erotuskapasiteettia ja säilyvyyttä laitteessa. Elektroferogrammien tarkastelun perusteella päätettiin, että samoja puskuri- ja huuhteluliuospulloja voi käyttää 15 peräkkäiseen injektioon tai 24 tuntia laitteeseen siirtämisestä.

6 Analyysien hinnat

Tässä työssä haluttiin myös selvittää yksittäisen analyysin kustannuksia kummallakin menetelmällä. Taulukkoon 15. ja Taulukkoon 16. on koottu analyyseissä tarvittavien tarvikkeiden ja reagenssien hinnat sekä laskettu kustannusarvio yhtä analyysiä kohti. Yleisiä laboratorioissa käytettäviä tarvikkeita ei huomioitu kustannuksissa.

Taulukko 15. cIEF-analyysin tarvikkeiden ja reagenssien hinnat.

Tarvike/Reagenssi	Määrä	Hinta (€)	Hinta/analyysi (€)
eCAP Neutral Capillary 50 µm	1 kpl	303	10,1
eCAP cIEF Gel	100 ml	243	4,13
pI Marker Kit PA800 (5 x 200 µl)	1 kpl	632	3,79
Pharmalyte 3–10	25 ml	425	0,2
Amicon Ultra-0,5 10K	24 kpl	111	4,63
eCAP 50 mM Tris Buffer pH 8	100 ml	52	0,26
Arginiinihydrokloridi	1 kg	339	0
Iminodiacetic acid	25 g	23,7	0
Urea	1 kg	144,5	0,11
Phosphoric acid 85 %	1 kg	44	0
0,1 M NaOH	500 ml	83,3	0,07
Acetic acid glacial	2,5 l	90,9	0
Yhteensä		2491,4	23,29

Taulukko 16. CZE-analyysin tarvikkeiden ja reagenssien hinnat.

Tarvike/Reagenssi	Määrä	Hinta (€)	Hinta/analyysi (€)
Fused Silica Capillary 50 µm	10 m	33	0,03
Triethylenetetramine	50 ml	363	0,02
6-Aminocaproic acid	25 g	39	0,82
Hydroxypropylmethylcellulose	25 g	52,7	0,01
Acetic acid glacial	2,5 l	90,9	0
0,1 N HCl	500 ml	59,6	0,36
	Yhteensä	638,2	1,24

cIEF-menetelmän kustannusten todettiin olevan huomattavasti suurempia kuin CZE-menetelmän. Myös cIEF-analyysiin tarvittavien reagenssien ja kapillaarien hankkiminen vaatii suurempia rahallisia investointeja. Tässä työssä käytetty CE-laitteisto soveltuu molemmille analyysimenetelmille, mikä vähentää olennaisesti laitteiden hankkimiseen liittyviä kustannuksia.

7 Yhteenveto

Opinnäytetyössä kehitettiin ja validoitiin cIEF-menetelmä monoklonaalisten vasta-aineiden varausten heterogeenisyyden tutkimiseen. Lisäksi työssä vertailtiin cIEF:n ja CZE:n soveltuvuutta kyseiseen käyttötarkoitukseen validoimalla molemmat menetelmät.

Validoinnilla osoitettiin molempien menetelmien soveltuvan monoklonaalisten vasta-aineiden varausprofiilien tutkimiseen. CZE:n merkittävimpinä etuina cIEF:iin verrattuna olivat yksinkertaisempi näytteenkäsittely ja pienemmät analyysikustannukset. cIEF:llä saadaan kuitenkin vasta-aineen varausprofiilin lisäksi selville myös isoformien pI-arvot, mikä ei ole mahdollista CZE:llä. Laadunvarmistusta ajatellen cIEF-menetelmä voisi olla käytettävämpi, koska se antaa enemmän tietoa vasta-aineen ominaisuuksista kuin CZE.

Monoklonaalisisista vasta-aineista tutkittavat ominaisuudet ja niille asetetut vaatimukset riippuvat valmistajien asettamista laatuvaatimuksista. Yleisesti ottaen vasta-aineen tulisi vastata valmistajan referenssiä, eikä varausprofiilissa saisi näkyä uusia tai tavallista intensiivisempiä piikkejä. Tässä työssä käytetylle vasta-aineelle ei ollut olemassa CZE:llä määritettyä referenssiä, joten tulosten oikeellisuudesta ei voitu varmistua. cIEF-

menetelmällä määritettyjen isoformien pI-arvot olivat kaikissa analyyseissä valmistajan ilmoittamalla välillä.

Migraatioaikojen toistettavuudessa oli ongelmia molemmilla menetelmillä. CZE:llä migraatioaikojen toistettavuus oli hieman parempi kuin cIEF:llä. cIEF-menetelmällä saatiin kuitenkin toistettavia pI-arvoja, kun käytettiin sisäisenä standardina pI-markkereita. cIEF-menetelmän migraatioaikojen huonon toistettavuuden epäiltiin johtuvan näytteen suolanpoistosta. Työssä käytettyjen filttteriputkien pidätyskyky oli liian suuri käytetylle vasta-aineelle. Tämän takia näytteeseen saattoi jäädä liikaa suolaa, mikä voi huonontaa pH-gradientin stabiiliutta. Lisäksi näytteen konsentroimisen vaatimat pitkät sentrifugointiajat saattoivat vaikuttaa vasta-aineen rakenteeseen.

CZE:ssä yleensä proteiinin adsorptio kapillaarin sisäseinämään huonontaa erottumista ja migraatioaikojen toistettavuutta. Työssä käytetyn vasta-aineen isoformien pI-arvot olivat melko lähellä CZE:ssä käytetyn taustaelektrolyytin pH:ta, mikä saattoi lisätä adsorptiota. Leveämmät piikit kolmella viimeisellä isoformilla voisivat johtua juuri proteiinin adsorptiosta. Vasta-aineen pI-arvoa korkeampi pH voisi vähentää sähköisiä vuorovaikutuksia, mutta tämä vaikuttaisi todennäköisesti myös muilla tavoilla erottumiseen.

Migraatioaikojen huono toistettavuus aiheuttaa epätarkkuutta myös piikkien pinta-aloihin. Menetelmien optimoinnilla voitaisiin parantaa migraatioaikojen toistettavuutta, jolloin olisi mahdollista asettaa raja-arvoja myös piikkien pinta-aloille tai isoformien suhteellisille osuuksille. Yksi mahdollisuus parantaa molempien menetelmien toistettavuutta olisi käyttää isoformien määrittämisessä mobiliteettia migraatioajan sijasta.

Validoinnin tulosten perusteella molemmat menetelmät soveltuvat aiottuun käyttötarkoitukseen. cIEF:llä ja CZE:llä saatuja tuloksia ei voi verrata suoraan toisiinsa, koska menetelmät antavat erilaista tietoa vasta-aineen ominaisuuksista. Yhdessä muiden analyysimenetelmien kanssa cIEF ja CZE ovat tehokkaita työkaluja monoklonaalisten vasta-aineiden karakterisointiin.

Lähteet

- 1 Analyysipalvelut yrityksille. Verkkosivu. Yliopiston Apteekki. <https://www.yliopistonapteekki.fi/terveydenhuolto/analyysipalvelut_yrityksille>. Luettu 1.12.2015.
- 2 Huovinen, Pentti, Meri, Seppo & Peltola, Heikki (toim.). 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim.
- 3 Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith & Walter, Peter (toim.). 2008. Molecular Biology of the Cell. 5. painos. USA: Garland Science.
- 4 Petersen, John, Okorodudu, Anthony, Mohammad, Amin & Payne, Deboraf. 2003. Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. Clinica Chimica Acta. Vol. 330, s. 1–30.
- 5 Wang, Wei, Singh, Satish, Zeng, David, King, Kevin & Nema, Sandeep. 2007. Antibody Structure, Instability, and Formulation. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 96, s. 1–26.
- 6 Fekete, Szabolcs, Gassner, Anne-Laure, Rudaz, Serge, Schappler, Julie & Guilleme, Davy. 2013. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. Trends in Analytical chemistry. Vol. 42, s. 74–83.
- 7 Antibody Structure. Verkkodokumentti. Sino Biological Inc. <<http://www.elisa-antibody.com/elisa-antibody/elisa-antibody-structure>>. Luettu 9.12.2015.
- 8 Walsh, Gary & Jefferis, Roy. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. Nature Biotechnology. Vol. 24, s. 1241–1252.
- 9 Specification Sheet Anti-h IgM 7408 SPRN-5. Verkkodokumentti. Medix Biochemica. <https://www.medixbiochemica.com/Medixmab/MedixMAB_Products/Serology/IgM/en_GB/IgM/>. Päivitetty 12.8.2011. Luettu 19.11.2015.
- 10 Filipe, Vasco, Hawe, Andrea, Carpenter, John & Jiskoot, Wim. 2013. Analytical approaches to assess the degradation of therapeutic proteins. Trends in Analytical chemistry. Vol. 49, s. 118–125.
- 11 Li, Sam. 1992. Capillary Electrophoresis: Principle, Practice and Applications. Journal of Chromatography Library volume 52. Netherlands: Elsevier.
- 12 Riekkola, Marja-Liisa & Hyötyläinen, Tuulia. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. painos. Helsinki: Yliopistopaino.

- 13 Staub, Aline, Guillarme, Davy, Schappler, Julie, Veuthey, Jean-Luc & Rudaz, Serge. 2011. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 55, s. 810–822.
- 14 Moritz, Bernd, Schnaible, Volker, Kiessig, Steffen, Heyne, Andrea, Wild, Markus, Finkler, Christof, Christians, Stefan, Mueller, Kerstin, Zhang, Li, Furuya, Kenji, Hassel, Marc, Hamm, Melissa, Rustandi, Richard, He, Yan, Salas Solano, Oscar, Whitmore, Colin, Park, Sung Ae, Hansen, Dietmar, Santos, Marcia & Lies, Mark. 2015. Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B*. Vol. 983–984, s. 101–110.
- 15 Ahuja, Satinder (toim.). 2000. *Handbook of bioseparations*. USA: Academic Press.
- 16 He, Yan, Lacher, Nathan, Hou, Weiyang, Wang, Qian, Isele, Colleen, Starkey, Jason & Ruesch, Margaret. 2010. Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column. *Analytical Chemistry*. Vol. 82, s. 3222–3230.
- 17 Salas-Solano, Oscar, Babu, Kunnel, Park, SungAe, Zhang, Xinfeng, Susic, Zoran, Boumajny, Boris, Zeng, Ming, Cheng, Kuang-Chuan, Reed-Bogan, Angelia, Cummins-Bitz, Stacey, Michels, David, Parker, Monica, Bonasia, Paulina, Hong, Mingfang, Cook, Steven, Ruesch, Margaret, Lamb, David, Bolyan, Dora, Kiessig, Steffen, Allender, Darren & Nunnally, Brian. 2011. Intercompany Study to Evaluate the Robustness of Capillary Isoelectric Focusing Technology for the Analysis of Monoclonal Antibodies. *Chromatographia*. Vol. 73, s. 1137–1144.
- 18 Andrasi, M., Gyemant, G. & Gaspar, A. 2014. Analysis of Rituximab, A Therapeutic Monoclonal Antibody by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*. Vol. 6, s. 1–8.
- 19 Shi, Ying, Li, Zhen, Qiao, Yuanbiao & Lin, Jun. 2012. Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb. *Journal of Chromatography B*. Vol. 906, s. 63–68.
- 20 Millionsi, Renato, Franchin, Cinzia, Tessari, Paolo, Polati, Rita, Cecconi, Daniela & Arrigoni, Giorgio. 2013. Pros and cons of peptide isoelectric focusing in shotgun proteomics. *Journal of Chromatography A*. Vol. 129, s. 1–9.
- 21 Mack, Scott, Cruzado-Park, Ingrid, Chapman, Jeff, Ratnayake, Chitra & Vigh, Gyula. 2009. A systematic study in CIEF: Defining and optimizing experimental parameters critical to method reproducibility and robustness. *Electrophoresis*. Vol. 30, s. 4049–4058.
- 22 Silvertand, L., Sastre Toraño, J., van Bennekom, W. & de Jong, G. 2008. Recent developments in capillary isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1204, s. 157–170.

- 23 Jin, Ya, Luo, Guoan, Oka, Tomoko & Manabe, Takashi. 2002. Estimation of isoelectric points of human plasma proteins employing capillary isoelectric focusing and peptide isoelectric point markers. *Electrophoresis*. Vol. 23, s. 3385–3391.
- 24 Tang, Sheng, Nesta, Douglas, Maneri, Leonard & Anumula, Kalyan. 1999. A method for routine analysis of recombinant immunoglobulins (rIgGs) by capillary isoelectric focusing (cIEF). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 19, s. 569–583.
- 25 Hunt, G., Hotaling, T. & Chen, A. 1998. Validation of a capillary isoelectric focusing method for the recombinant monoclonal antibody C2B8. *Journal of Chromatography A*. Vol. 800, s. 355–367.
- 26 Ehder, Tapio (toim.). 2005. Kemian metrologian opas J6/2005. Verkkodokumentti. Metrologian neuvottelukunta.
<http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6_05_b5_nettiin.pdf>. Luettu 3.11.2015.
- 27 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005. Verkkodokumentti. ICH Expert Working Group.
<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Päivitetty 11/2005. Luettu 3.11.2015.
- 28 Application Guide PA 800 plus Pharmaceutical Analysis System, Capillary Isoelectric Focusing (cIEF) Analysis. 2014. Verkkodokumentti. Beckman Coulter.
<<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=A78788.pdf>>. Päivitetty 01/2014. Luettu 8.9.2015.
- 29 Santos, Marcia. 2012. Analysis of Monoclonal Antibody Charge Variants by Capillary Zone Electrophoresis. Verkkodokumentti. Beckman Coulter.
<<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=IB-17031.pdf>>. Luettu 8.9.2015.

cIEF-menetelmän uusittavuus

Taulukko 1. Laboratorion sisäisen uusittavuuden ensimmäisen määrittäykerran tulokset. Tulokset on laskettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

Päivä 1.				
Migraatio-aika (min)	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	27,55	0,29	1,05	27,55 ± 0,21
Piikki 2	27,73	0,31	1,11	27,73 ± 0,23
Piikki 3	27,92	0,31	1,10	27,92 ± 0,23
Piikki 4	28,09	0,32	1,12	28,09 ± 0,23
Piikki 5	28,18	0,31	1,09	28,18 ± 0,22
pl-arvo	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	6,32	0,01	0,18	6,32 ± 0,01
Piikki 2	6,25	0,01	0,16	6,25 ± 0,01
Piikki 3	6,18	0,01	0,17	6,18 ± 0,01
Piikki 4	6,11	0,01	0,17	6,11 ± 0,01
Piikki 5	6,08	0,01	0,18	6,08 ± 0,01

Taulukko 2. Laboratorion sisäisen uusittavuuden toisen määrittäykerran tulokset. Tulokset on laskettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

Päivä 2.				
Migraatio-aika (min)	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	28,13	0,05	0,19	28,13 ± 0,04
Piikki 2	28,32	0,06	0,20	28,32 ± 0,05
Piikki 3	28,52	0,05	0,18	28,52 ± 0,04
Piikki 4	28,69	0,05	0,19	28,69 ± 0,04
Piikki 5	28,76	0,05	0,19	28,76 ± 0,04
pl-arvo	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	6,32	0,01	0,16	6,32 ± 0,01
Piikki 2	6,25	0,01	0,12	6,25 ± 0,01
Piikki 3	6,18	0,01	0,10	6,18 ± 0,01
Piikki 4	6,11	0,01	0,12	6,11 ± 0,01
Piikki 5	6,09	0,01	0,13	6,09 ± 0,01

Taulukko 3. Laboratorion sisäisen uusittavuuden kolmannen määrittämiskerran tulokset. Tulokset on laskettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

Päivä 3.				
Migraatio-aika (min)	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	27,79	0,14	0,52	27,79 ± 0,11
Piikki 2	28,02	0,13	0,48	28,02 ± 0,10
Piikki 3	28,27	0,13	0,48	28,27 ± 0,10
Piikki 4	28,46	0,14	0,47	28,46 ± 0,10
Piikki 5	28,53	0,14	0,49	28,53 ± 0,10
pl-arvo	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	6,34	0,03	0,40	6,34 ± 0,02
Piikki 2	6,27	0,01	0,21	6,27 ± 0,02
Piikki 3	6,19	0,01	0,21	6,19 ± 0,01
Piikki 4	6,12	0,01	0,23	6,12 ± 0,02
Piikki 5	6,10	0,01	0,22	6,10 ± 0,02

CZE-menetelmän uusittavuus

Taulukko 1. Laboratorion sisäisen uusittavuuden ensimmäisen määrittämiskerran tulokset. Tulokset on laskettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

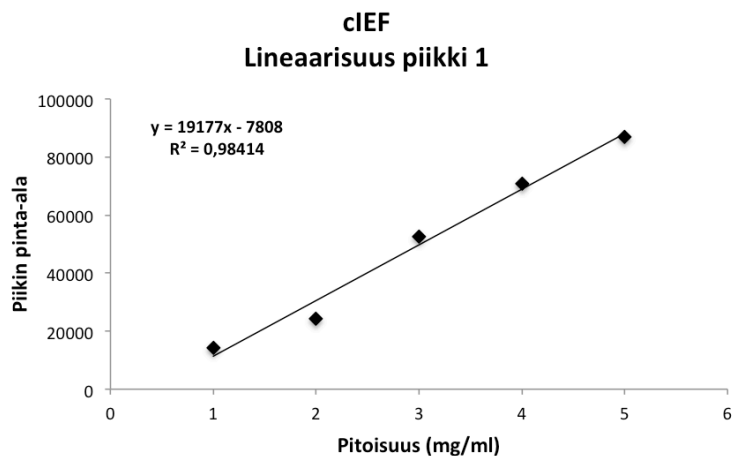
Päivä 1.				
Migraatioaika (min)	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	10,18	0,01	0,05	10,18 ± 0,01
Piikki 2	11,00	0,01	0,11	11,00 ± 0,01
Piikki 3	11,66	0,01	0,11	11,66 ± 0,01
Piikki 4	12,76	0,02	0,18	12,76 ± 0,02
Piikki 5	13,75	0,02	0,16	13,75 ± 0,02
Piikki 6	15,46	0,02	0,13	15,46 ± 0,02

Taulukko 2. Laboratorion sisäisen uusittavuuden toisen määrittämiskerran tulokset. Tulokset on laskettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli. Piikin 6 tulokset on laskettu 9 injektion keskiarvona, koska piikki 6 hävisi yhdessä injektiossa.

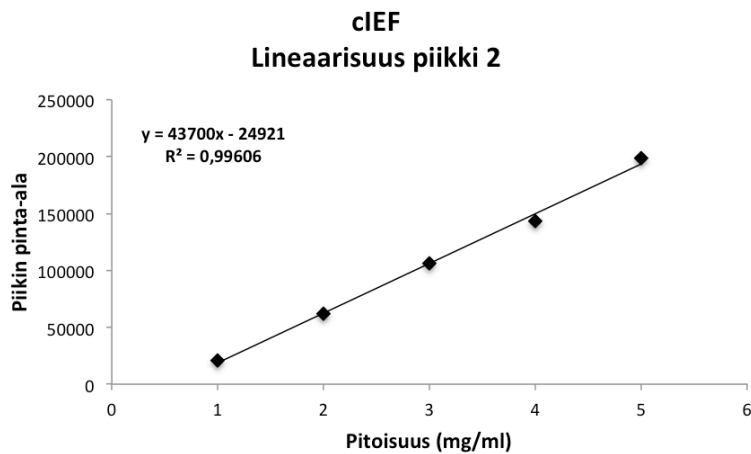
Päivä 2.				
Migraatioaika (min)	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	10,21	0,09	0,89	10,21 ± 0,07
Piikki 2	11,04	0,12	1,08	11,04 ± 0,09
Piikki 3	11,71	0,13	1,10	11,71 ± 0,10
Piikki 4	12,83	0,17	1,29	12,83 ± 0,12
Piikki 5	13,85	0,17	1,25	13,85 ± 0,13
Piikki 6	15,67	0,22	1,43	15,67 ± 0,16

Taulukko 3. Laboratorion sisäisen uusittavuuden kolmannen määrittämiskerran tulokset. Tulokset on laskettu 10 injektion keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD ja 95 %:n luottamusväli.

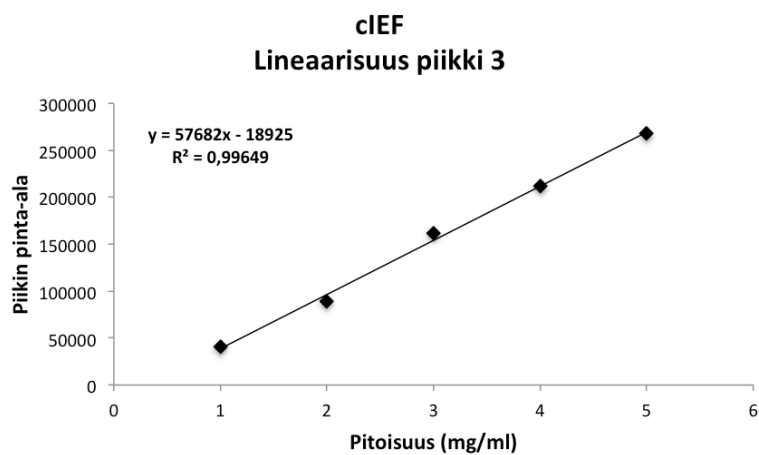
Päivä 3.				
Migraatioaika (min)	Keskiarvo	SD	RSD (%)	95 %:n luottamusväli
Piikki 1	10,36	0,02	0,20	10,36 ± 0,02
Piikki 2	11,21	0,04	0,36	11,21 ± 0,03
Piikki 3	11,89	0,05	0,38	11,89 ± 0,04
Piikki 4	13,02	0,07	0,56	13,02 ± 0,06
Piikki 5	14,06	0,08	0,56	14,06 ± 0,06
Piikki 6	15,96	0,09	0,57	15,46 ± 0,07

cIEF-menetelmän lineaarisuus

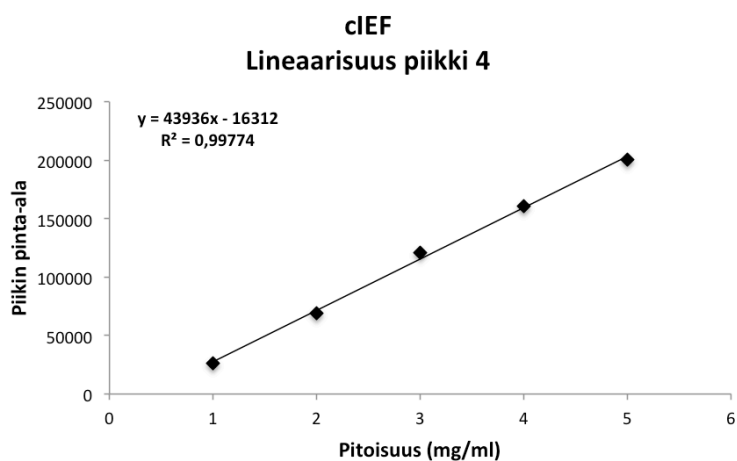
Kuva 1. Piikin 1 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin yksi injektio jokaisesta pitoisuudesta.



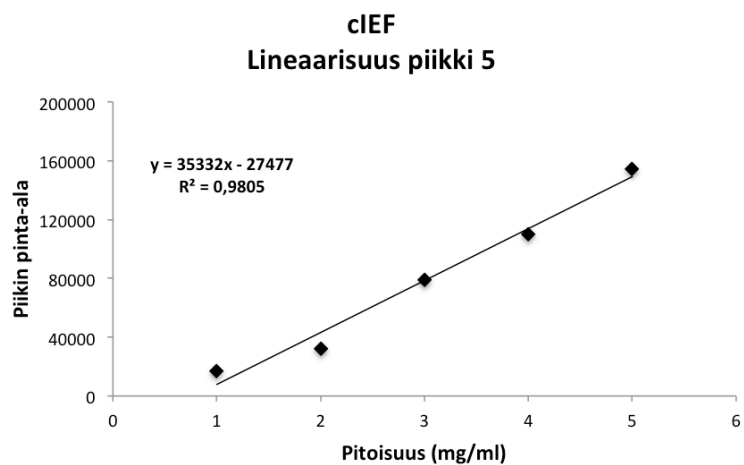
Kuva 2. Piikin 2 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin yksi injektio jokaisesta pitoisuudesta.



Kuva 3. Piikin 3 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin yksi injektio jokaisesta pitoisuudesta.

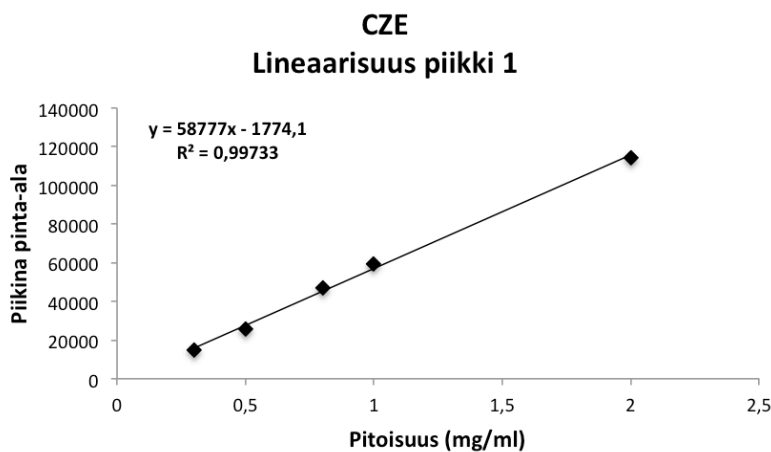


Kuva 4. Piikin 4 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin yksi injektio jokaisesta pitoisuudesta.

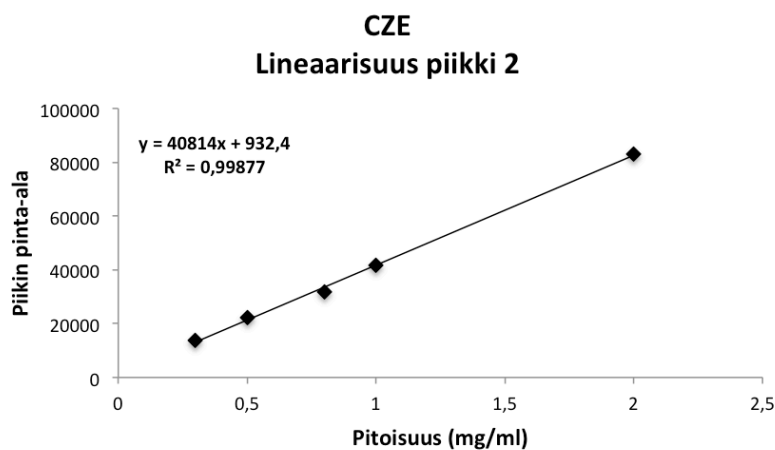


Kuva 5. Piikin 5 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin yksi injektio jokaisesta pitoisuudesta.

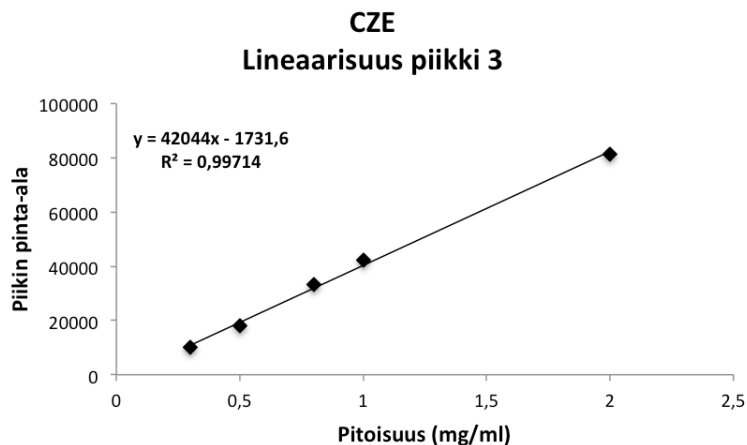
CZE-menetelmän lineaarisuus



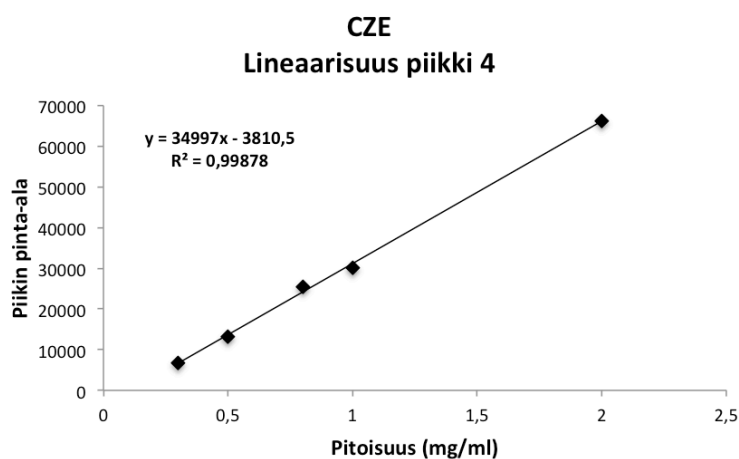
Kuva 1. Piikin 1 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta. Kaikista näytteistä tehtiin yksi injektio. Lineaarisuuskuvaaja piirrettiin kolmen määrittäksen keskiarvoista.



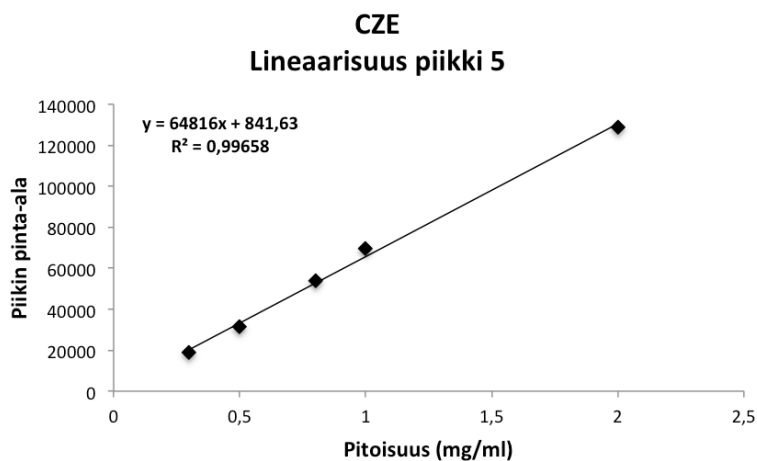
Kuva 2. Piikin 2 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta. Kaikista näytteistä tehtiin yksi injektio. Lineaarisuuskuvaaja piirrettiin kolmen määrittäksen keskiarvoista.



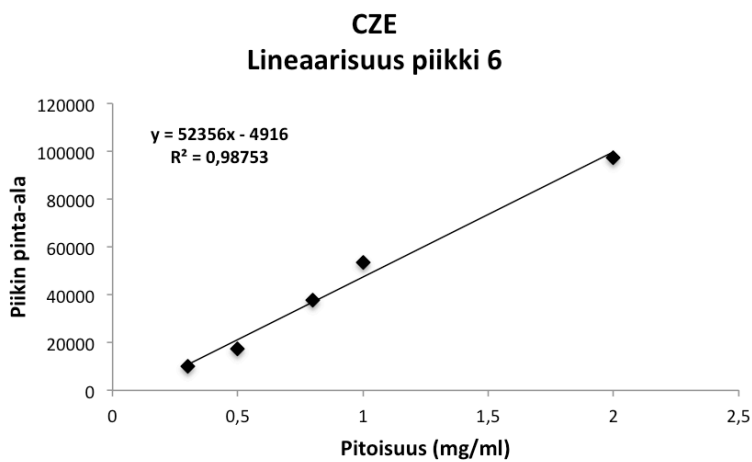
Kuva 3. Piikin 3 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta. Kaikista näytteistä tehtiin yksi injektio. Lineaarisuuskuvaaja piirrettiin kolmen määrittämisen keskiarvoista.



Kuva 4. Piikin 4 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta. Kaikista näytteistä tehtiin yksi injektio. Lineaarisuuskuvaaja piirrettiin kolmen määrittämisen keskiarvoista.



Kuva 5. Piikin 5 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta. Kaikista näytteistä tehtiin yksi injektio. Lineaarisuuskuvaaja piirrettiin kolmen määrittämisen keskiarvoista.



Kuva 6. Piikin 6 lineaarisuuskuvaaja. Standardisuoran määrittämiseksi tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta. Kaikista näytteistä tehtiin yksi injektio. Lineaarisuuskuvaaja piirrettiin kolmen määrittämisen keskiarvoista.

cIEF-menetelmän näyteliuoksen säilyvyys

Taulukko 1. Migraatioaikojen tulokset näyteliuoksen säilyvyydestä CE-laitteen näytepöydällä (huoneenlämpö). Tulokset on ilmoitettu kolmen määrittelyn keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD, keskiarvojen ero (%) ja P-arvo (t-testi, kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso).

Migraatioaika (min)					
0 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
Keskiarvo	26,63	26,82	27,03	27,19	27,31
SD	0,17	0,18	0,18	0,18	0,20
RSD (%)	0,64	0,66	0,67	0,68	0,72
1 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
Keskiarvo	27,01	27,23	27,45	27,61	27,72
SD	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03
RSD (%)	0,04	0,08	0,12	0,10	0,10
Keskiarvojen ero (%)	1,41	1,51	1,54	1,52	1,49
P-arvo	0,0604	0,0573	0,0161	0,0600	0,0695

Taulukko 2. pl-arvojen tulokset näyteliuoksen säilyvyydestä CE-laitteen näytepöydällä (huoneenlämpö). Tulokset on ilmoitettu kolmen määrittelyn keskiarvona: pl-arvo, keskiarvo, SD, RSD, keskiarvojen ero (%) ja P-arvo (t-testi, kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso).

pl-arvot					
0 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
Keskiarvo	6,32	6,25	6,18	6,12	6,08
SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
RSD (%)	0,05	0,04	0,02	0,02	0,12
1 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5
Keskiarvo	6,34	6,26	6,18	6,12	6,08
SD	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
RSD (%)	0,11	0,05	0,03	0,04	0,07
Keskiarvojen ero (%)	0,21	0,04	0,03	0,00	0,04
P-arvo	0,0448	0,3057	0,2386	0,9937	0,6226

CZE-menetelmän näyteliuoksen säilyvyys

Taulukko 1. Tulokset näyteliuoksen säilyvyydestä CE-laitteen näytepöydällä (huoneenlämpö).

Tulokset on ilmoitettu kolmen määrittelyn keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD, keskiarvojen ero (%) ja P-arvo (t-testi, kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso).

Huoneenlämpö	Migraatioaika (min)					
0 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Keskiarvo	10,92	11,82	12,54	13,74	14,85	16,78
SD	0,02	0,04	0,04	0,06	0,07	0,11
RSD (%)	0,18	0,30	0,32	0,44	0,44	0,66
1 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Keskiarvo	11,04	11,89	12,63	13,76	14,86	16,55
SD	0,06	0,04	0,06	0,08	0,07	0,09
RSD (%)	0,50	0,34	0,44	0,55	0,48	0,56
Keskiarvojen ero (%)	1,09	0,59	0,71	0,10	0,07	1,37
P-arvo	0,0246	0,0863	0,0846	0,8222	0,8660	0,0007

Taulukko 2. Tulokset näyteliuoksen säilyvyydestä jääkaapissa (+2...+8 °C). Tulokset on ilmoitettu kolmen määrittelyn keskiarvona: migraatioaika (min), keskiarvo (min), SD, RSD, keskiarvojen ero (%) ja P-arvo (t-testi, kaksisuuntainen, 95 %:n luottamustaso).

Jääkaappi	Migraatioaika (min)					
0 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Keskiarvo	10,98	11,91	12,66	13,92	15,07	17,18
SD	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	0,07
RSD (%)	0,19	0,22	0,24	0,25	0,19	0,38
1 vrk	Piikki 1	Piikki 2	Piikki 3	Piikki 4	Piikki 5	Piikki 6
Keskiarvo	10,91	11,82	12,56	13,80	14,93	16,96
SD	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,09
RSD (%)	0,14	0,17	0,20	0,25	0,24	0,55
Keskiarvojen ero (%)	0,70	0,76	0,76	0,86	0,88	1,24
P-arvo	0,0068	0,0093	0,0129	0,0139	0,0071	0,0312